

Desinfección e influencia del bencil aminopurina (BAP) y ácido naftalén acético (ANA) en la multiplicación *in vitro* de *Perezia coerulescens* Wedd, planta medicinal altoandina

Disinfection and influence of naftalen acetic acid and benzil aminopurine on the *in vitro* multiplication of *Perezia coerulescens*, high-land medicinal plant

Percy Olivera G^a, Carmen Tamariz A^a, Marcel Gutierrez-Correa^a

RESUMEN

Para el establecimiento del cultivo *in vitro* de yemas de *Perezia coerulescens* Wedd, se evaluaron seis métodos de desinfección usando hipoclorito de sodio (NaOCl) y dicloruro de mercurio (HgCl₂) a diferentes concentraciones y tiempos; se evaluó el porcentaje de contaminación, supervivencia y fenolización de las yemas. El establecimiento se realizó en medio Murashige y Skoog a la mitad de concentración de sales suplementado con sacarosa (2%), agar-agar (0,75%), un fotoperíodo de 16 horas y temperatura ambiental (16 – 20 °C). Para la multiplicación se probó cuatro tratamientos, usando bencil amino purina (BAP) y ácido naftalén acético (ANA): TO-S4 (sin hormona), T1-S4 (1 mgL⁻¹ de BAP y 0,01 mgL⁻¹ de ANA), T2-S4 (1 mgL⁻¹ de BAP), T3-S4 (2 mgL⁻¹ de BAP y 0,02 mgL⁻¹ de ANA). Se encontró que el mejor tratamiento de desinfección fue con HgCl₂ al 0,1% (p/v) por 5 minutos, el mejor método para obtener el mayor número promedio de brotes por yema (explante) fue el T3-S4 y además se encontró cierta evidencia de que el ANA a bajas concentraciones tiene influencias negativas en la producción de brotes.

Palabras clave: Cultivo *in vitro*; Fitohormonas; Reguladores de crecimiento; Auxina; Citocinina.

ABSTRACT

For establish the *in vitro* culture of *Perezia coerulescens* Weed. shoots, it was evaluated six disinfection methods using differ concentrations and exposure times of disinfection of sodium hypochlorite (NaOCl) and mercury (II) chloride (HgCl₂). It was evaluated the microbial contamination percentage, the survival and phenolization of shoots. The establishment was on half concentration of Murashige and Skoog medium supplemented with sucrose (2%), agar-agar (0,75%) with 16 hours of photoperiod and environment temperature (15-20°C). For the multiplication it was assayed four treatments using bencil amine purine (BAP) and naftalen acetic acid (NAA): TO-S4 (without hormone), T1-S4 (1 mgL⁻¹ of BAP with 0,01 mgL⁻¹ of NAA), T2-S4 (1 mgL⁻¹ of BAP), T3-S4 (2 mgL⁻¹ of BAP with 0,02 mgL⁻¹ of NAA). It was found that the best disinfection treatment was using HgCl₂ (0,1%) by 5 minutes, the best method to get more shoots by explants was T3-S4, and there is some evidence that low concentration of NAA has negative influence on shoot production.

Key words: *In vitro* culture; Phytohormones; Growth regulators; Auxin; Cytokinin

¹ Facultad de Ciencias. Universidad Nacional Santiago Antúnez de Mayolo.

^a Biólogo

INTRODUCCIÓN

Perezia coerulescens es una planta medicinal altoandina conocida como “valeriana”, “sutuma”, “sut’uma” “contrahierba” y “china valeriana” (Mostacero et al. 1996, Mantilla y Olazabal 2008), se distribuye desde el Perú, Bolivia hasta Argentina (Franquemont et al. 1990). En la medicina popular se utiliza toda la planta para aliviar una diversidad de dolencias tales como tos, heridas, post-parto, gripe, afecciones del riñón, mal viento, aerofagia; así mismo, se utiliza como febrífugo, sedante, y sudorífico (Mantilla y Olazabal 2008, Gibaja 1998). Sin embargo, al ser una planta silvestre, su recolección y comercialización en las ferias populares es informal y es una actividad económica de los pobladores altoandinos. Por lo tanto, es necesario desarrollar metodologías para que su uso sea sostenible. En términos generales, se indica que el aprovechamiento de la biodiversidad mediante la biotecnología permite lograr valorizaciones sostenibles con potencial de aumentar la productividad agrícola e industrial, mejorar la salud y nutrición, restaurar y proteger el medio ambiente (Roca 2004); es decir, las herramientas biotecnológicas son importantes para la multiplicación y el mejoramiento genético de las plantas medicinales mediante las técnicas de regeneración *in vitro* y transformación genética (Tripathi y Tripathi 2003), porque a diferencia de las técnicas tradicionales de cultivo, la propagación *in vitro* permite la propagación de grandes volúmenes de plantas en menor tiempo y espacio (Roca y Mroginski 1991).

En algunos países la propagación *in vitro* se utiliza para la conservación de las especies endémicas, plantas en peligro de extinción (Izquierdo 2006, Cristea et al. 2010) y para la propagación de plantas medicinales (Tripathi y Tripathi 2003). En el Perú, a pesar de que las biotecnologías más utilizadas son las de cultivo de tejidos (multiplicación y conservación *in vitro*), los trabajos están orientados hacia los de productos de panllevar más que a uno de los sectores con mayores oportunidades como la bioprospección de plantas medicinales, debido a la existencia de una gran variedad de plantas con información de sus usos tradicionales (Roca 2004).

En este contexto, dado que la propagación *in*

vitro de las plantas tiene un gran potencial para la producción de plantas medicinales de alta calidad (Murch et al. 2000), y posee muchas ventajas comparada con los métodos convencionales de propagación vegetativa, y por otro lado que *P. coerulescens* es una especie que presenta alto grado de extravismo (De la Cruz et al. 2005), declarada como una especie vulnerable (El Peruano 2006); la presente investigación está orientada a buscar una metodología apropiada para la propagación de *Perezia coerulescens* mediante el cultivo *in vitro*, reportándose en esta ocasión los resultados de la influencia de la citocinina bencil amino purina (BAP) y la auxina ácido naftalen acético (ANA) como fitorreguladores en la multiplicación de esta especie, lo cual contribuirá finalmente a su conservación.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material biológico

Las plantas frescas de *Perezia coerulescens* Wedd. fueron adquiridas en las ferias populares de plantas medicinales en la ciudad de Huaraz, las cuales fueron determinadas botánicamente en el laboratorio de Biología de la UNASAM.

Selección de individuos para la propagación *in vitro*

Se seleccionó las plantas que no evidenciaban síntomas de enfermedades infecciosas, preferentemente sin flores y con las mejores características morfológicas, tales como: color de hojas, hojas más duras y resistentes, con yemas de aproximadamente 1cm de longitud, rizomas sin daños mecánicos y 1cm de diámetro aproximadamente, raíces de 0,3 a 0,4 cm de diámetro y 2 cm de largo aproximadamente.

Desinfección del material seleccionado

Las plantas seleccionadas fueron lavadas con agua corriente para retirar los residuos de tierra y restos de hojas secas de su superficie. Luego se retiraron las hojas grandes para dejar una yema con hojas pequeñas de 1,5 cm aproximadamente; los rizomas debajo de las yemas fueron cepillados y lavados con

agua corriente y jabón hasta retirar todas las impurezas. Las muestras obtenidas fueron sumergidas en agua de caño y guardadas a 4°C por 18h. Transcurrido este tiempo se lavaron con agua jabonosa por 20 minutos y agitación constante, luego se lavaron con agua destilada fría, agitación constante y 5 minutos por tres veces. La desinfección fue inmediata, mediante seis tratamientos como se describe a continuación:

Tratamiento 1 (D1): Hipoclorito de sodio (NaOCl) al 1% (v/v) por 10 minutos.

Tratamiento 2 (D2): Hipoclorito de sodio (NaOCl) al 1% (v/v) por 20 minutos.

Tratamiento 3 (D3): Hipoclorito de sodio (NaOCl) al 3% (v/v) por 10 minutos.

Tratamiento 4 (D4): Rifampicina más Benomil por 15 minutos, seguido de lejía al 1% por 20 minutos.

Tratamiento 5 (D5): Dicloruro de mercurio (HgCl_2) al 0,1% (p/v) por 5 minutos.

Tratamiento 6 (D6): Dicloruro de mercurio (HgCl_2) al 0,1% (p/v) por 10 minutos.
Luego las muestras fueron lavadas con agua

destilada estéril, agitación constante por 3 minutos y tres veces para retirar los restos de los desinfectantes utilizados.

Las muestras desinfectadas fueron transferidas a placas petri con papel secante estéril.

Incubación pre-establecimiento

Las muestras desinfectadas fueron colocadas en viales pequeños con 1mL solución peptonada al 0,1% (p/v) y pH de 5,7 estéril por una semana para descartar las muestras contaminadas.

Establecimiento

Las yemas que no presentaron contaminación fueron trasladadas a un medio semisólido para el establecimiento. Se utilizó para ello el medio basal Murashige – Skoog (SIGMA) a concentración completa de sales (4,4 g/L) y a la mitad (2,2 g/L), en ambos casos suplementados con 3% (p/v) de sacarosa y 0,07% de agar – agar, por 15 días.

Multiplificación

La multiplicación para la proliferación de nuevas yemas se realizó en el medio Murashige Skoog (1962) a mitad de sales (MS/2), suplementado con sacarosa al 3% y 0,7% de agar – agar y tratamiento hormonal como se presenta en el Cuadro 1.

Tabla 1. Tratamientos para la inducción de brotes en yemas con rizomas de *P. coerulescens* con Bencil aminopurina (BAP) y Ácido Naftalenacético (ANA).

Tratamiento	BAP (mgL ⁻¹)	ANA (mgL ⁻¹)
T0-S4	0	0
T1-S4	1	0,01
T2-S4	1	0
T3-S4	2	0,02

La exposición a los tratamientos fue de cuatro semanas. Al cabo de este tiempo los explantes fueron trasplantados a medio MS/2 pero sin hormonas. Las evaluaciones finales fueron a los tres meses, considerándose el porcentaje de yemas con brotes y promedio de brotes por yema. Las condiciones de temperatura e iluminación para todas las etapas de cultivo fueron temperatura ambiental entre 15-20°C y fotoperíodo de 16 h.

RESULTADOS

Desinfección

Se evaluó presencia de contaminantes, supervivencia y fenolización de las yemas. Respecto a la eliminación de contaminantes microbianos, se encontró mediante la prueba t ($P < 0,05$) que existen diferencias significativas entre los tratamientos, siendo el tratamiento D1 (NaOCl al 1% v/v por 10 minutos) el que presenta mayor número de yemas contaminadas, mientras que el tratamiento D6 (HgCl₂ al 0,1% p/v por 10 minutos) presenta menor número.

Para el caso de supervivencia de las yemas, la prueba t ($P < 0,05$) indica que existen diferencias significativas entre los tratamientos, donde el tratamiento D5 (HgCl₂ al 0,1% p/v por 5 minutos) presenta el mayor porcentaje de yemas vivas.

Respecto a la fenolización, los tratamientos D3 (NaOCl al 3% v/v por 10 minutos) y D6 (HgCl₂ al 0,1% p/v por 10 minutos) presentan el mayor porcentaje de yemas fenolizadas, y de acuerdo a la prueba t ($P > 0,05$) no existen diferencias significativas entre ambos.

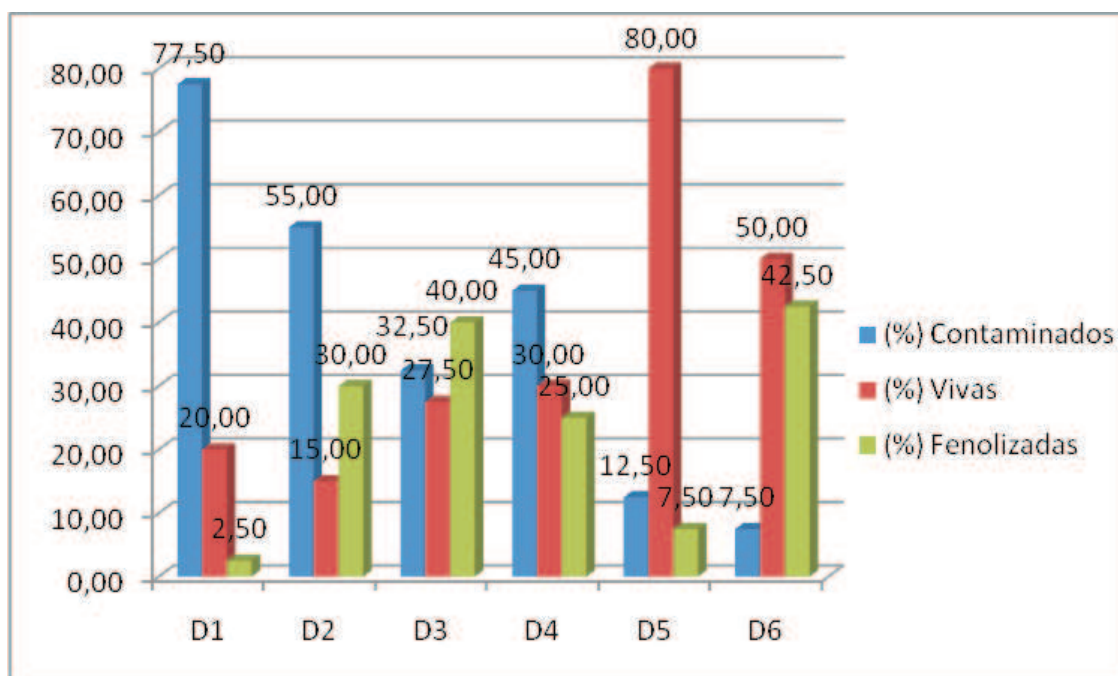


Figura 1. Comparación entre los porcentajes de yemas contaminadas, vivas y fenolizadas luego de cada uno de los tratamientos de desinfección.

Establecimiento

Las yemas sembradas en medio MS con sales completas presentaron problemas de fenolización en aproximadamente un 90%, a diferencia de las yemas sembradas en medio MS a la mitad de concentración de sus sales (MS/2) donde no se observó este problema.

Multiplificación

El tratamiento sin hormonas (T0) no presentó formación de brotes, mientras que los tratamientos a los que se les aplicó fitohormonas sí presentaron formación de brotes, donde los resultados del análisis de varianza muestran que no existen diferencias significativas ($P > 0,05$) en el porcentaje de yemas con brotes entre los tratamientos T1, T2 y T3 (Figura 2).

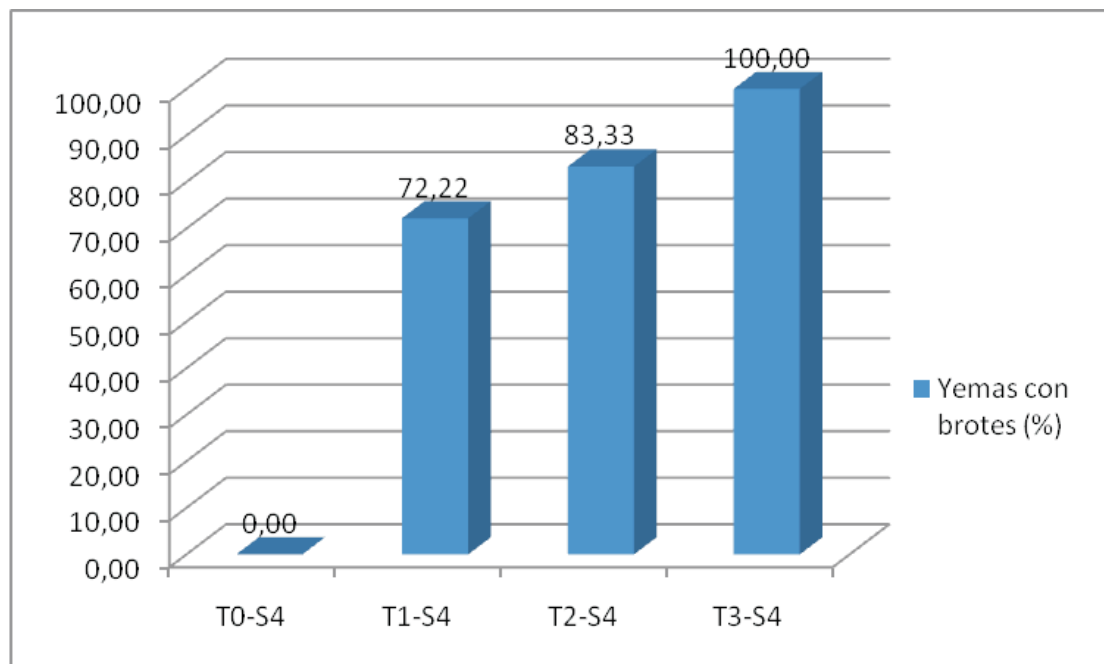


Figura 2. Comparación entre el porcentaje de yemas con brotes con los tratamientos T0-S4, T1-S4, T2-S4 y T3-S4 evaluados a los tres meses.

Respecto al tratamiento con mejor promedio de brotes por yema, el análisis de varianza muestra que existen diferencias significativas ($P < 0,05$) entre los tratamientos, siendo el tratamiento T3-S4 el que presenta los mejores resultados (Figura 3 y 4).

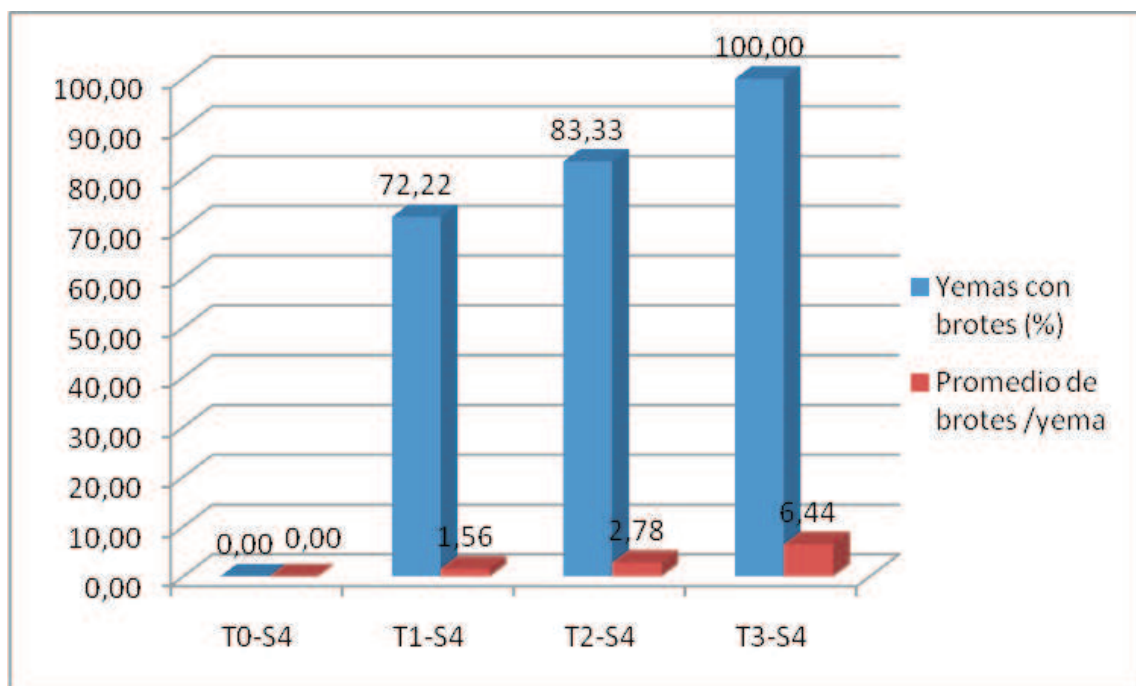


Figura 3. Comparación entre los porcentajes de yemas con brotes y los promedios de brotes por yemas después de cuatro semanas de tratamiento y evaluados a los tres meses.

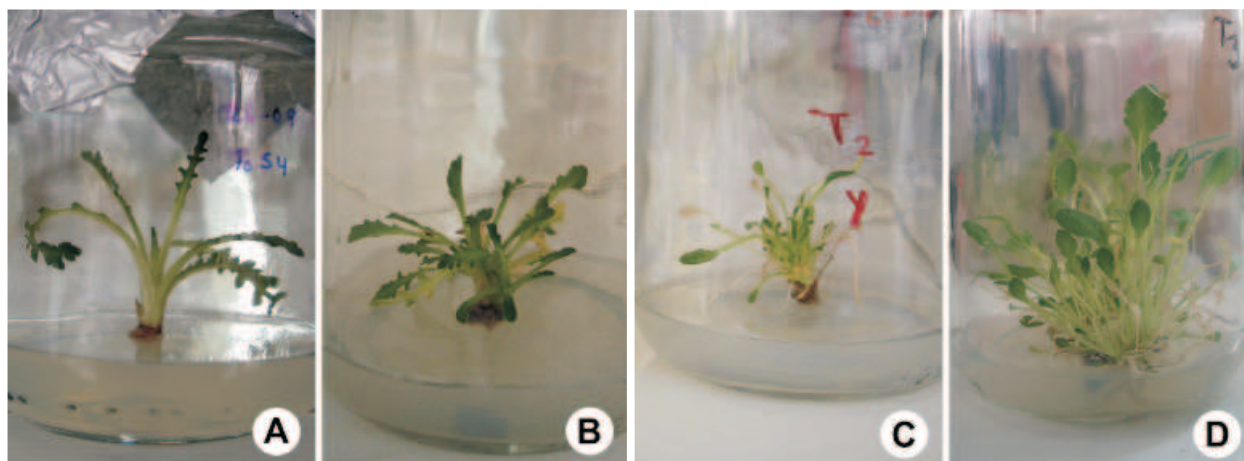


Figura 4 . Tratamientos evaluados a los tres meses. (A) TO, sin hormonas. (B) T1, 1mgL⁻¹ de BAP y 0,01 mgL⁻¹ de ANA. (C) T2, 1 mgL⁻¹ de BAP. (D) T3, 2 mgL⁻¹ de BAP y 0,02 mgL⁻¹ de ANA.

DISCUSIÓN

La desinfección es un aspecto básico que se debe tener en cuenta para el éxito, no solamente en el establecimiento de los cultivos sino también en la incubación y manipulación *in vitro*, debido a que la asociación explante – medio y las condiciones físicas en las que normalmente se incuban los cultivos conforman un ambiente propicio para la proliferación de bacterias y hongos, los cuales pueden destruir y competir con el explante o modificar la composición del medio de cultivo (Roca y Mroginski 1991). El interior de las plantas intactas y sanas es aséptico y la tarea principal de limpieza del material para explantes está limitada a la esterilización superficial para eliminar los microorganismos con el menor daño posible a los explantes (Roca y Mroginski 1991). Como cada tipo de explante tiene sus propias características tisulares y la carga microbiana depende del ambiente del que proviene se debe evaluar el método específico, es decir, la selección del tipo y concentración del desinfectante; así como el tiempo de desinfección debe ser establecido experimentalmente por ensayo y error (Roca y Mroginski 1991). A pesar de que existe una basta gama de agentes químicos utilizados para éste propósito, entre ellos se encuentran el hipoclorito de sodio (NaOCl) (Roca y Mroginski 1991, Cerna y Tafur, 2009, Severín et al. 2008), el dicloruro de mercurio (HgCl₂), peróxido de hidrógeno (H₂O₂), (Roca y Mroginski 1991), entre otros. En el presente trabajo se evaluó 4 tratamientos con hipoclorito de sodio como germicida porque es más

común en el cultivo de tejidos, tres de ellos solo (1% por 10 min., 1 % por 20 min. y 3% por 10 min.) y otro con rifampicina más benomil (antibacteriano y fungicida respectivamente) por 15 minutos antes de la desinfección con NaOCl al 1% por 20 min., pero los resultados fueron negativos en todos los casos. Entonces se evaluó el efecto del dicloruro de mercurio al 0,1% - menos utilizado por ser un agente muy tóxico (Roca y Mroginski 1991- obteniéndose resultados positivos en la desinfección para los dos tratamientos y considerándose al tratamiento D5 (HgCl₂ al 0,1% por 5 min.) como el más efectivo porque produjo menos daño en el tejido (fenolización) y mayor número de sobrevivencia. La necesidad del uso de éste desinfectante se explica por el hábitat de *P. coerulescens*, que al ser una planta arrosetada crece al ras del suelo y rodeada de materia orgánica en descomposición, lo que la predispone a tener una alta carga microbiana.

En la evaluación de la eficiencia del medio de cultivo se debe tener en cuenta la fenolización, que es la presencia de compuestos fenólicos oxidados asociados a los tejidos vegetales sometidos a situaciones de estrés por el efecto abrasivo del desinfectante, los cortes que sufre el explante y composición del medio de cultivo (Olmos et al. 2004, Azofeifa 2009). Estos compuestos fenólicos inhiben el crecimiento de los explantes dañándolos y matándolos (Olmos et al. 2004, Royero 2007); produce cambios en la coloración del tejido y la emisión de pigmentos rojizos o carmelitas hacia el medio de cultivo (Concepción et al. 2005). Este factor se consideró para evaluar el medio más efectivo para el establecimiento de las yemas de *P. coerulescens*, donde se observó que el medio MS

con sales completas, produce hasta en un 90% la fenolización; mientras que en medio MS a la mitad de concentración de sus sales no se observó el problema de fenolización. Esto podría deberse a que los medios ricos en nitrógeno pueden favorecer la necrosis de los tejidos (Margara 1988). Este medio fue escogido para las siguientes etapas porque además se conoce que en algunos casos la disminución de la concentración de los medios de cultivo favorece el desarrollo y vigor de los explantes (Uribe et al. 2008).

Para la formación de brotes o yemas, algunas plantas no requieren la aplicación de fitohormonas al medio de cultivo (Izquierdo 2006, Cerna y Tafur 2009, Khan et al. 2006, Severín et al. 2008); sin embargo los resultados en *P. coerulescens* indican la necesidad de fitoreguladores para esta etapa. Los tipos de reguladores de crecimiento, sus combinaciones, y rangos de concentraciones deben ser optimizados para cada especie, genotipo y etapa de multiplicación determinada (Olmos et al. 2004). Las citocininas estimulan la división celular en tejidos no meristemáticos y la inducción de brotes, siendo las más usadas el BAP (Bencil amino purina), KIN (6-furfuril- aminopurina) y ZEA (zeatina). Por otro lado, las auxinas promueven el crecimiento, la diferenciación celular y la diferenciación de raíces, y las más usadas son el IBA (ácido indol-3-butírico) y el ANA (ácido naftalén acético) que sirven para el enraizamiento (Roca y Mroginski 1991). En el presente trabajo se evaluó la influencia del BAP solo y en combinación con una baja concentración de ANA. Todos los tratamientos con hormonas generaron brotes, lo cual indicaría una respuesta positiva al BAP, mientras que se observa que la incorporación del ANA en el tratamiento T1 disminuye la brotación respecto al tratamiento T2 (BAP a la misma concentración pero solo). Los resultados del tratamiento T1 no concuerdan con lo reportado para otras especies que responden a concentraciones bajas de BAP (Oviedo y Guevara 1988, Begum et al. 2002).

El tratamiento que presenta el mejor resultado es el T3-S4 con 2 mg/L de BAP y 0,02 mg/L de ANA, y concuerdan con resultados reportados para otras plantas (Sarker et al. 2006, Anis et al. 2003). Sin embargo, existen especies que requieren concentraciones mayores de BAP (Anand y Jeyachandran 2004, Farzana et al. 1998, Lara et al. 2003). Por lo que sería necesario evaluar el efecto de la misma concentración de BAP o mayores concentraciones solo y en combinación con el ANA para determinar y verificar la influencia negativa del ANA que se observa en los tratamientos T1 y T2.

CONCLUSIONES

1. El tratamiento de desinfección con Dicloruro de mercurio (HgCl_2) al 0,1% (p/v) por 5 minutos permite obtener el mayor número de yemas vivas.
2. El medio Murashige y Skoog a la mitad de concentración de sales no produce fenolización en las yemas de *Perezia coerulescens*.
3. Con el tratamiento **T3-S4 (2 mg/L de BAP y 0,02 mg/L de ANA)** se obtiene el mayor promedio de brotes por yema.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Anand, S. y R. Jeyachandran. 2004. "In vitro multiple shoot regeneration from nodal explants of *Zehneria scabra* (L.f.) sonder – an important medicinal climber". *Plant Tissue Culture* 14(2): 101-106.
- Anis, Mohammad., Mohammad Faisal and S. Singh. 2003. "Micropropagation of Mulberry (*Morus alba* L.) through *in vitro* culture of shoot tip and nodal explants". *Plant Tissue Culture* 13(1): 47-51.
- Azofeifa, Álvaro. 2009. "Problemas de oxidación y oscurecimiento de explantes cultivados *in vitro*". *Agronomía Mesoamericana* 20(1): 153-175.
- Cerna, Marco y Valdano Tafur. 2009. "Cultivo *in vitro* de *Scoparia dulcis* L. (Scrophulariaceae)". *La Granja* 9(1): 44-51.
- Concepción, O., Lelurlys Nápoles, Aurora Pérez, Martha Hernández, Ninel Peralta y R. Trujillo. 2005. "Efecto de tres antioxidantes en el cultivo *in vitro* de ápices de guayaba (*Psidium guajava* L.). Relación entre el origen del explante y el contenido de compuestos fenólicos". *Cultivos Tropicales* 26(1): 33-39.
- Cristea, Victoria., Alexandra-Timea Brummer, Liliana Jarda and Mihai Miclaus. 2010. "In vitro culture initiation and phytohormonal influence on *Dianthus henteri* – a Romanian endemic species". *Romanian Biotechnological Letters* 15(1): 25-33.
- De la Cruz, Horacio., Percy Zevallos y Graciela Vilcapoma. 2005. "Status de conservación de las especies vegetales silvestres de uso tradicional en la Provincia de Canta, Lima – Perú". *Ecología Aplicada* 4(1-2): 9-16.
- El Peruano. 2006. "Aprueban categorización de Especies amenazadas de flora silvestre: Decreto Supremo N° 043-2006-AG". *Normas Legales*, 13 Julio.
- Farzana, Khanum., Tayyab Husnain and Sheikh

- Riazuddin. 1998. "Effect of age seedling and phytohormones on micropropagation of indica rice (*Oryza sativa* L.) from meristem culture". *Journal of Plant Biology* 41(2): 93-96.
- Gibaja, Segundo. 1998. *Pigmentos naturales quinónicos*. Lima: Fondo Editorial UNMSM.
 - Izquierdo, Pablo. 2006. "Development of micropropagation protocols for two species critically endangered Asteraceae endemic of the Galapagos Island". *Lyonia* 9(2): 57-62.
 - Khan, Saifullah., Sheeba Naz, Kashif Ali and Samreen Zaidi. 2006. "Direct organogenesis of *Kalanchoe tomentosa* (Crassulaceae) from shoot-tips". *Pakistan Journal of Botany* 38(4): 977-981.
 - Mantilla, Justo y Oscar Olazabal. 2008. "Pachamama hampi qhoranchiskuna: las plantas medicinales de nuestra tierra". Cusco: Instituto de Ecología y Plantas Medicinales.
 - Margara, J. 1988. "Multiplicación vegetativa y cultivo *in vitro*. Los meristemos y la organogénesis". Madrid: Ediciones Mundi-Prensa.
 - Mostacero, José., Freddy Mejía y Freddy Peláez. 1996. *Fitogeografía del norte del Perú*. Lima: Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONCYTEC).
 - Murashige, Toshio y Folke Skoog. 1962. "A revised medium for rapid grow and bioassays with tobacco cultures". *Physiologia Plantarum* 15(3): 472-497.
 - Murch, S., Krishna Raj, P. Saxena. 2000. "Tryptophan is a precursor for melatonin and serotonin biosynthesis in in-vitro regenerated St. John's wort (*Hypericum perforatum* L. cv. Athos)". *Plant Cell Report* 19: 698-704.
 - Olmos, Sofia., Graciela Luciani y Ernestina Galdeano. 2004. "Métodos de propagación y conservación de germoplasma". En: *Biotechnología y mejoramiento vegetal*, eds. Viviana Echenique, Clara Rubinstein y Luis Mroginski, pp. 161-172. Buenos Aires: Ediciones INTA.
 - Oviedo, Yvonne y Eric Guevara. 1988. "Propagación in vitro de la estaticea *Limonium sinatum* CV. Mindnigth blue". *Agronomía Costarricense* 12(1): 113-122.
 - Roca, William y Luis Mroginski. 1991. "Cultivo de tejidos en la agricultura: Fundamentos y aplicaciones". Lima: Centro Internacional de Agricultura Tropical.
 - Roca, William. 2004. "Tendencias en el desarrollo de capacidades biotecnológicas e institucionales para el aprovechamiento de la biodiversidad en los países de la Comunidad Andina". Lima. <http://www.caf.com/attach/9/default/Tendencias-desarrollo-capacidadesbiotecnol%C3%B3gicas-institucionales-aprovechamiento-biodiversidad-ComunidadAndina.pdf>.
 - Sarker, R., Sabina Yesmin and M. Hoque. 2006. "Multiple shoot formation in eggplant (*Solanum melongena* L.)". *Plant Tissue Culture* 16(1): 53-61.
 - Severin, Cecilia., Osvaldo Di Sapio, Angel Scandizzi, Luciano Taleb, Graciela Giubileo y Susana Gattuso. 2008. "Efecto de algunos fitorreguladores y estudio histológico sobre la regeneración *in vitro* de *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC". *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y aromáticas* 7(1): 18-24.
 - Tripathi, Leena y Jaiindra Tripathi. 2003. "Role of biotechnology in medicinal plants". *Tropical Journal of Pharmaceutical Research* 2(2): 243-253.
 - Uribe, Matilde., Catherine Delaveau, Marcelo Garcés y René Escobar. 2008. "Efecto de asepsia y fitohormonas en el establecimiento *in vitro* de *Berberidopsis corallina*, a partir de segmentos nodales". *Bosque* 29(1): 58-64.

Correspondencia:

Percy Olivera Gonzales
Facultad de Ciencias - UNASAM
Huaraz - Perú
943682608
olivgon2002@yahoo.com