

# Optimización de un protocolo para el cultivo *in vitro* y la micropropagación masiva del llantén (*Plantago major*)

Fecha de recepción: 08/12/2008

Fecha de aceptación: 28/03/2009

Giovanni Garro M.<sup>1</sup>

Silvanna Alvarenga V.<sup>2</sup>

## Palabras clave

Plantago major, llantén, cultivo in vitro, micropropagación.

## Key words

Plantago major, llantén, culture in vitro, micropropagation.

## Resumen

Llantén (*P. major*) posee propiedades medicinales antiinflamatorias y cicatrizantes que han sido aprovechadas en muchas latitudes desde épocas remotas. Los estudios del cultivo in vitro de esta especie son escasos, a pesar de las ventajas que este tipo de técnicas presenta en especies de uso medicinal. En este trabajo se logró desarrollar un protocolo para el establecimiento y la reproducción masiva in vitro del llantén. Se estableció un protocolo de desinfección de semillas y

se obtuvo plántulas germinadas in vitro que se utilizaron como fuente de explantes para la fase de micropropagación masiva. Se evaluó el cultivo de ápices en medios de cultivo con sales y vitaminas de M & S (1962) al 100% y al 50%, suplementados con los siguientes reguladores de crecimiento: 1,2mg/l de ANA (Ácido naftalenacético), 0,6 mg/l y 0,4 mg/l de BAP (Bencil amino purina) y 1mg/l de TDZ (Tidiazurón) en diferentes combinaciones. Los mejores resultados en la inducción de brotes fueron obtenidos en 14,9 brotes promedio por explante en el medio con las sales y vitaminas M & S (1962) reducidas al 50% de su concentración y sin reguladores de crecimiento. Con este tratamiento, un total de 150 vitroplantas provenientes de distintos tratamientos han sido llevadas a condiciones de invernadero con un 100% de sobrevivencia.

1. Investigador del Centro de Investigación en Biotecnología (CIB), Escuela de Biología del Instituto Tecnológico de Costa Rica. Apartado 159-7050, Cartago, Costa Rica. Correo electrónico: ggarro@itcr.ac.cr
2. Investigador del Centro de Investigación en Biotecnología (CIB), Escuela de Biología del Instituto Tecnológico de Costa Rica. Apartado 159-7050, Cartago, Costa Rica. Correo electrónico: salvarenga@itcr.ac.cr

Como parte de las nuevas tendencias del mundo actual, el uso de plantas con potencial bioactivo es una de las prioridades de estudio tanto de entidades públicas como privadas.

## Abstract

Llantén (*P. major*) has antiinflammatory and healing medicinal properties that have been used in many latitudes since ancient times. There are not many studies about in vitro culture *P. major*, despite the advantages that such techniques represent for species of medicinal use. In this work an effective protocol for the establishment and the mass reproduction of in vitro llantén was developed. It was established a protocol for disinfection of seeds and the seedlings sprouted in vitro were used as a source of explants to mass micropropagation. The growing tips behavior was evaluated in culture media with salts and vitamins M & S (1962) at 100% and 50%, supplemented with growth regulators: 1.2 mg/l of ANA (naftalenacetic acid), 0,6 mg/l and 0.4 mg/l BAP (Benzyl-aminopurine) and 1mg/l TDZ (thidiazuron) in different combinations. An average of 14.9 shoots per explant was the best result in the induction of shoots proliferated in M & S (1962) medium with salts and vitamins reduced to 50% of their concentration and without growth regulators. In this treatment a total of 150 vitroplants from the different treatments tested have been taken under greenhouse conditions with a 100% survival.

## Introducción

Como parte de las nuevas tendencias del mundo actual, el uso de plantas con potencial bioactivo es una de las prioridades de estudio tanto de entidades públicas como privadas. En este sentido, las plantas medicinales poseen un interés cada vez mayor por los componentes con actividad biológica como los reportados para la especie *P. major*, mejor conocida como Llantén (Recio et al., 1994; Gupta, 1995; Mederos et al., 1998; Germosén, 2005).

*P. major* es una planta herbácea de la familia Plantaginaceae con una altura aproximada

de 15 cm y cuyas hojas crecen en forma de roseta y van desde formas ovaladas hasta elípticas. Sus flores son pequeñas, en tonos que varían del color café al verde y se ubican en espigas que luego de ser polinizadas, dan origen a gran cantidad de semillas diminutas contenidas en cápsulas con alrededor de 20.000 semillas por planta (Samuelsen, 2000).

En Costa Rica, el uso de esta planta se ha transmitido por medio de la medicina folclórica, aplicándose a variedad de dolencias en forma de cataplasmas sobre heridas en la piel o infusión de las hojas como antiinflamatorio (Samuelsen, 2000). Asimismo, se reporta su uso en Noruega, donde se aplica como cicatrizante desde hace muchos años y en Japón, donde se usa como antidiarreico (Samuelsen et al., 1999). Diversas propiedades medicinales se le atribuyen al llantén. Autores como Mederos y colaboradores (1998) y Germosén-Robineau (2005) destacan su efectividad en el tratamiento de tumores, conjuntivitis, dispepsias, inflamaciones y cicatrizaciones. Su acción desinflamatoria parece relacionarse con la presencia de flavonoides, polifenoles y alcaloides. En Panamá se usa la infusión de las hojas contra enfermedades renales y hepáticas, cáncer y enfermedades de la vejiga; por su parte, en Colombia se aplica la infusión o decocción en casos de fiebres, úlceras intestinales, gastritis crónica y afecciones hepáticas, entre otras. Asimismo, en El Salvador, las semillas son utilizadas como laxante y decocciones de raíz o de hojas se emplean en afecciones hepáticas. Otras propiedades destacables son las de antipirético, diurético, astringente, antiviral, coadyuvante en la disolución de cálculos renales, antihipercolesterolémico y antihemorragico (Gupta, 1995), además de mostrar actividad antibacteriana contra siete bacterias patógenas en plantas y contra *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* (Ravn y Brimer, 1988; Karma y Hassawi, 2006).

El objetivo de este trabajo fue el establecimiento de un protocolo para la micropropagación masiva in vitro de *P. major*, así como la selección del tratamiento que indujera la mayor producción de brotes para emplearlo en la micropropagación.

En la semilla se ha determinado la presencia de triterpenos, iridoideos, aceites fijos, alcaloides monoterpénicos y carbohidratos (Germosén, 2005). Los carbohidratos más comunes son: glucosa, fructuosa, ramnosa, xilosa, sacarosa y planteosa, y esta última actúa como carbohidrato de reserva en la semilla. La hoja contiene rafinosa, que también funciona como carbohidrato de reserva (Samuelsen, 2000).

Los lípidos encontrados en esta especie se distribuyen principalmente en las semillas y Samuelsen (2000) reporta la presencia de los ácidos palmítico, esteárico, oleico, linoleico, araquídico y mirístico, entre otros. Este mismo autor presenta datos de alcaloides como la plantagonina, flavonoides como luteolinas, hispidulinas, baicaleina, plantaginina y homoplantaginina, algunos de los cuales tienen propiedades antioxidantes; glicósidos iridoideos como la aucubina son los responsables tanto de la capacidad antiinflamatoria (Recio et al., 1994, citado en Samuelsen, 2000) como de la acción antiespasmolítica (Ortiz de Urbina, 1994, citado en Samuelsen, 2000).

La literatura disponible sobre el cultivo in vitro de esta planta es limitada. Sin embargo, se ha encontrado reportes recientes realizados por Mederos et al. (1998) y Li et al. (2005), donde se menciona parámetros generales para el cultivo in vitro de tejidos vegetales de esta especie. En este sentido, resulta de gran importancia la implementación de estos sistemas de cultivo in vitro para especies con potencial de actividad farmacológica.

El cultivo in vitro de plantas medicinales es una estrategia que permite la conservación del germoplasma de plantas élite. Cuanta mayor diversidad vegetal se conserve y se tenga disponible para su uso, más posibilidades habrá de satisfacer las necesidades futuras del mundo (IPGRI, 2002). Se puede afirmar que existe mucho

interés en la conservación y utilización de plantas silvestres con propiedades medicinales que están presentes en nuestro ecosistema de forma natural, con el fin de incrementar su utilidad y valor económico.

El llantén es una planta silvestre que crece en todo el mundo y es considerada maleza, y aunque se piense que es una planta abundante, actualmente se ve perjudicada por actividades agronómicas, explotación, extrativismo y otros factores que pueden conducir a la erosión genética de esta especie.

El objetivo de este trabajo fue el establecimiento de un protocolo para la micropropagación masiva in vitro de *P. major*, así como la selección del tratamiento que indujera la mayor producción de brotes para emplearlo en la micropropagación. Además, se desarrolló la metodología de aclimatación de las vitroplantas en condiciones de invernadero.

## Materiales y métodos

### Ubicación del lugar de estudio y obtención de material vegetal

Los ensayos se desarrollaron en el Centro de Investigación en Biotecnología (CIB) del Instituto Tecnológico de Costa Rica. En el invernadero se estableció un semillero con el fin de contar con un banco de material y en el laboratorio de cultivo de tejidos se realizó las pruebas in vitro.

El material vegetal se colectó en los alrededores de la Zona Norte de Cartago (Llano Grande y Oreamuno) y se utilizó para el establecimiento en el invernadero.

Se sembró semillas en bandejas utilizando la técnica a chorrillo; 30 días después de la germinación se individualizó las plantas y se las plantó por separado en bandejas más grandes. Transcurridos nuevamente 30 días desde el transplante, se cosechó hojas y semillas para ser utilizadas como fuente de explante.

## Desinfección y germinación in vitro de semillas de *P. major*

El protocolo empleado para la desinfección e introducción in vitro de semillas de plantas colectadas en los alrededores de Cartago fue el siguiente: se coló las semillas para separarlas de la cubierta externa y se pesó 0,5 g de semillas; posteriormente, fueron envueltas en un rollito de gasa y se dejaron remojando una hora en agua destilada; se sumergieron en 1g/L de Agry-micín-Benlate® o en Bizolex® por 30 minutos. Las semillas fueron llevadas a la cámara de flujo laminar, donde se les aplicó tres lavados con agua destilada estéril. Se sumergieron en hipoclorito de sodio comercial al 3% i.a durante 40 minutos. Posteriormente, se colocaron en una solución de hipoclorito de sodio comercial al 1,25% i.a por 25 minutos. Se hizo tres lavados con agua estéril en cámara y se sembraron en un medio de cultivo con las sales y vitaminas M & S (1962) al 50%, complementado con 15 g de sacarosa y 2 g de Phyta-Gel.

Se colocó las semillas en el cuarto de crecimiento a una temperatura de 24°C ± 2°C, expuestas a luz directa.

## Introducción de ápices a partir de material in vitro

Las semillas cultivadas in vitro germinaron a las seis o siete semanas de la siembra.

Estas plántulas constituyeron la fuente de explantes para la introducción de ápices de *P. major*. Una vez que alcanzaron un tamaño aproximado de 10 cm, se eliminó la parte foliar y las raíces fibrosas, dejando aproximadamente 0,5 mm de la raíz primaria y un segmento del tallo central de tamaño similar para proteger el meristemo, además de eliminar las partes dañadas o marchitas para utilizar la yema apical como explante.

Seguidamente, se colocó tres explantes por frasco en un medio de cultivo con las sales y vitaminas de M & S (1962) al 100% o al 50% de concentración, 3% ó 1,5% de sacarosa y 2 g/l de Phyta-Gel, con la adición de otros suplementos nutricionales o reguladores de crecimiento (Cuadro 1). Se probó los tratamientos A, B, C, D, E, y F que se muestran en el Cuadro 1. El tamaño de la muestra utilizada en todos los tratamientos fue de 45 explantes. Se evaluó condiciones tales como necrosis y producción de brotes.

Todos los tratamientos emplearon el medio con sales y vitaminas M & S (1962) al 100% de concentración, excepto los tratamientos D y F, en los que las sales y vitaminas del medio se redujeron al 50%.

Los tratamientos B, C, D y E fueron sometidos a dos etapas de inducción de brotación, la primera de las cuales consistía en un período de exposición de 2 semanas en el tratamiento A, para posteriormente subcultivar los explantes en medios con modificaciones específicas durante 4 semanas. Se los cultivó a una temperatura de 24°C ± 2°C, expuestos a luz directa.

## Aclimatación de plantas en el invernadero

Los frascos que contenían vitroplantas regeneradas a partir de ápices, una vez que éstas alcanzaron una altura de 8 cm a 10 cm, fueron trasladados al invernadero. Se les quitó el plástico que sellaba la tapa y se dejaron en el invernadero durante una semana. Posteriormente, se procedió

Cuadro 1. Tratamientos empleados para la inducción de brotes en *P. major*

Tratamiento	Sales MS %	Sacarosa%	Reguladores (mg/l)		
			ANA	BAP	TDZ
A	100	3	1,2	0,6	0
B	100	3	0	0,6	0
C	100	3	0	0,4	0
D	50	3	0	0	0
E	100	3	0	0	1
F	50	1,5	0	0	0
Control	100	3	0	0	0

a extraer las plántulas y se eliminó el medio lavando la raíz cuidadosamente. Se las sembró en bandejas con un sustrato compuesto por tierra esterilizada con 3 g/l de Vitavax® y se las colocó en la cámara húmeda durante 15 días. Después se las sacó de la cámara húmeda y se las mantuvo bajo una cubierta plástica en el invernadero.

## Resultados y discusión

### Obtención de plantas madre en invernadero

La germinación de las semillas se observó a los 22 días de la siembra (Fig.1-A). Posteriormente, se realizó un raleo de las plántulas, las cuales fueron trasplantadas en bandejas de crecimiento sembrando una planta por pozo. Las plantas se desarrollaron vigorosamente alcanzando tamaños entre los 10 cm y los 25 cm. Se obtuvo un 100% de éxito en su desarrollo hasta completar el ciclo de vida (Figura 1-B y C).

### Desinfección y germinación *in vitro* de semillas de *P. major*

Las semillas cultivadas *in vitro* tuvieron una germinación superior al 90% en un lapso de dos semanas a partir de la siembra. Estas plántulas constituyeron la fuente de explantes para la introducción de

ápices de *P. major*. A partir de plantas de aproximadamente seis o siete semanas de germinación *in vitro*, se extrajeron explantes para evaluar los tratamientos.

### Introducción de ápices a partir de material *in vitro*

Los principales resultados del presente trabajo se alcanzaron a partir de plantas germinadas en condiciones *in vitro*, debido a que los materiales provenientes del campo presentaron niveles de contaminación muy altos.

En el tratamiento A, que contenía 1,2 mg/l de ANA y 0,6 mg/l de BAP, la totalidad de los ápices generaron brotes a partir de la primera y hasta la cuarta semana después de introducidos *in vitro*. En la fase inicial de la organogénesis, se produjo una callosidad en la base de los explantes, con regeneración de novo de plántulas. La etapa de aclimatación fue exitosa, ya que un 100% de los explantes adaptados a condiciones de invernadero fueron cultivados hasta la etapa reproductiva.

Con los resultados obtenidos de este tratamiento, se logró verificar que el empleo de yemas apicales como explante fue acertado, ya que como indican varios autores, la proliferación de yemas axilares *in vitro* es usualmente empleada como una ruta viable y conveniente para la



Figura 1. A. Semillas germinadas a los 22 días. B. Plantas trasplantadas individualmente en bandejas después de 6 y 7 semanas de cultivo. C. Plantas a las 12 semanas de cultivo en floración.

micropropagación, pues no incluye la etapa de callo, por lo que es considerada más segura al preservar las características de los clones. El cultivo de yemas axilares en un medio enriquecido activa las yemas, guiando a la proliferación de brotes laterales que después pueden ser cultivados como plantas individuales (Altman y Loberant, 1998; Narender y Kartha, 1994).

Los resultados de estas pruebas coinciden con los obtenidos por Mederos y colaboradores, quienes con el empleo de una concentración de 0,1mg/l de BAP en un medio de cultivo M & S (1962) modificado (412,5 mg/l de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  y 340 mg/l de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) y 5% de sacarosa, obtuvieron siete brotes por explante de yemas apicales de P. major cultivadas y las vitro plantas alcanzaron una altura de 55 mm. (Mederos et al.; 1998) La respuesta morfogénica favorable de los explantes fue probablemente ocasionada por la acción del BAP, ya que este regulador del crecimiento promueve la división celular y la elongación de las yemas (Salisbury y Ross, 1994).

Respecto al proceso de enraizamiento de los explantes, se ha informado del efecto de la concentración de ANA sobre la rizogénesis de P. major y la longitud de las raíces en un medio de cultivo con sales y vitaminas M & S (1962) al 50% de concentración, 5% de agar y 0,2 mg/l

de ANA, pues concentraciones mayores (2 mg/l y 18 mg/l) de ANA indujeron una menor tasa de producción de raíces (Mederos et al.; 1998). Sin embargo, en este trabajo todos los tratamientos empleados indujeron la formación de raíces largas y vigorosas, por lo que no se realizaron pruebas para obtención de raíces, ya que, como se mencionó antes, se obtuvo un 100% de éxito en la aclimatación de las vitro plantas.

A partir de estos resultados preliminares, se estableció los tratamientos B, C, D, E y F, en los que se presentó una regeneración de novo que superó los resultados obtenidos previamente (Cuadro 2), así como los reportados por Mederos et al. (1998) y Ping et al. (2005).

Como se observa en el Cuadro 2, todos los tratamientos indujeron la producción de brotes. El incremento en el promedio de brotes fue constante durante las cuatro semanas de evaluación. Los tratamientos que fueron sometidos a dos etapas de inducción (B, C, D y E) mantuvieron un promedio de dos brotes por explante, siendo el tratamiento E (con 1mg/l de TDZ) el que presentó los valores más altos (2.29 brotes) de este grupo. El tratamiento control tuvo un promedio de 7, 29 brotes, en tanto que con el tratamiento F, que contenía un 50% de sales, vitaminas M & S (1962) y 1,5% de sacarosa sin reguladores de crecimiento, se obtuvo un promedio de 14,9 brotes por explante, lo cual constituyó el mayor promedio de brotes obtenido en este ensayo (Figura 2). Este resultado de 14,9 brotes promedio por explante producidos con el tratamiento F, se destacó además por la formación del sistema radical, en algunas ocasiones muy denso, y la rizogénesis no se presentó en los tratamientos con reguladores. Además, el material que se regeneró en estas condiciones fue muy sano y vigoroso; las vitroplantas se mantuvieron así incluso después de terminado el ciclo de evaluación (4 semanas). El subcultivo de los materiales

Cuadro 2. Promedio de brotes por explante generados semanalmente en los diferentes tratamientos durante el período inicial de un mes de cultivo.

Semana	Promedio de brotes obtenidos por explante en cada tratamiento					
	B	C	D	E	F	Control
1	0,83	1,07	1,07	0,93	8,4	4,73
2	1,29	1,71	1,56	1,76	10,07	6,67
3	1,62	1,81	1,56	2	12,57	5,88
4	2,24	2,2	2	2,29	<b>14,9</b>	7,29

El comportamiento del control también resultó interesante durante los tratamientos, pues presentó un promedio de brotación muy superior al de los tratamientos con reguladores.

en un medio con las mismas condiciones mejoró la vigorosidad e incrementó la cantidad de brotes, con lo que se alcanzó una longitud adecuada de las vitroplantas para aclimatarlas en el invernadero.

Otro fenómeno importante que se observó fue la formación de callo en la base de todos los tratamientos con reguladores, no así en el control ni en el tratamiento F (sales M & S (1962) reducidas al 50% de su concentración), esto como resultado del proceso organogénico inducido por las fitohormonas artificiales. El tamaño del callo fue notablemente superior bajo las condiciones del TDZ (Figura 3. B), además no sufrió oxidación como sí ocurrió con el callo generado en los otros tratamientos. El comportamiento del control también resultó interesante durante los tratamientos, pues presentó un promedio de brotación muy superior al de los tratamientos con reguladores y aproximadamente la mitad del valor obtenido en el medio con las sales y vitaminas M & S (1962) reducidas al 50% de su concentración. De esto se infiere que el llantén responde de manera positiva ante la exposición a un medio sin modificaciones y que esta respuesta se incrementa al doble si se disminuye la concentración de las sales del medio a la mitad. Es importante mencionar también

el contraste entre las respuestas de los explantes a los tratamientos D y F, los cuales tenían casi la misma composición, excepto que el F tenía la mitad de sacarosa (1,5 g/l) y además, el ensayo D tuvo una etapa previa de inducción que significó un estímulo bastante notable frente al tratamiento F, que produjo una mayor tasa promedio de brotes; además las vitro plantas tuvieron un crecimiento y vigorosidad mayores.

Se observó que en los explantes del tratamiento F, las condiciones de sales disminuidas estimularon la formación de estructuras florales, pero fue un comportamiento aislado en algunas de las plantas (Figura 3.C). Otros parámetros controlados durante el tratamiento fueron la necrosis y la incapacidad de producir brotes de los explantes, eventos que se presentaron de manera aislada y sin mayor trascendencia.

Resultados similares a los obtenidos en esta investigación son reportados por Ping y colaboradores (2005) en el cultivo de yemas apicales en un medio con las sales y vitaminas M & S (1962), adicionado con 0,1mg/l de TDZ y mg/l de AIA. Después de cinco semanas de cultivo se logró la producción de 14,6 brotes por explante por organogénesis directa. Se observó que el

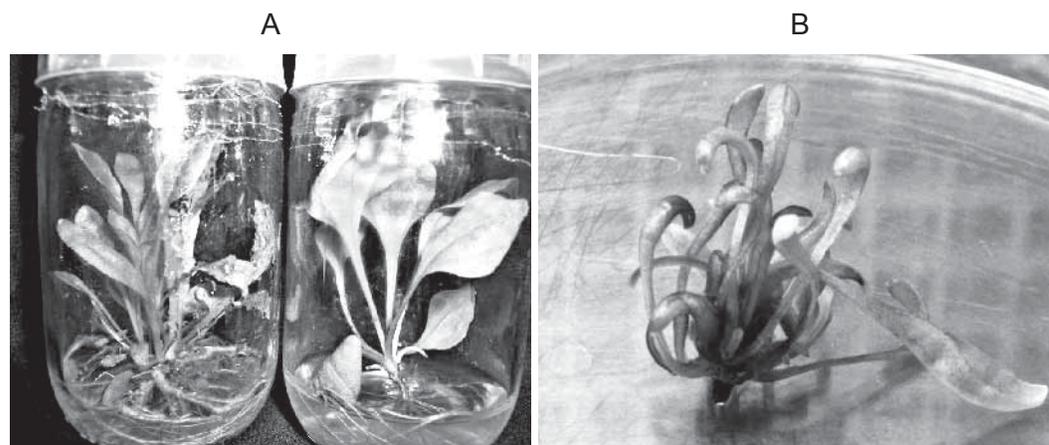


Figura 2. A. Brotes producidos con el tratamiento E (1mg/l de TDZ). En B. se observó la proliferación de múltiples brotes a partir de un mismo explante.

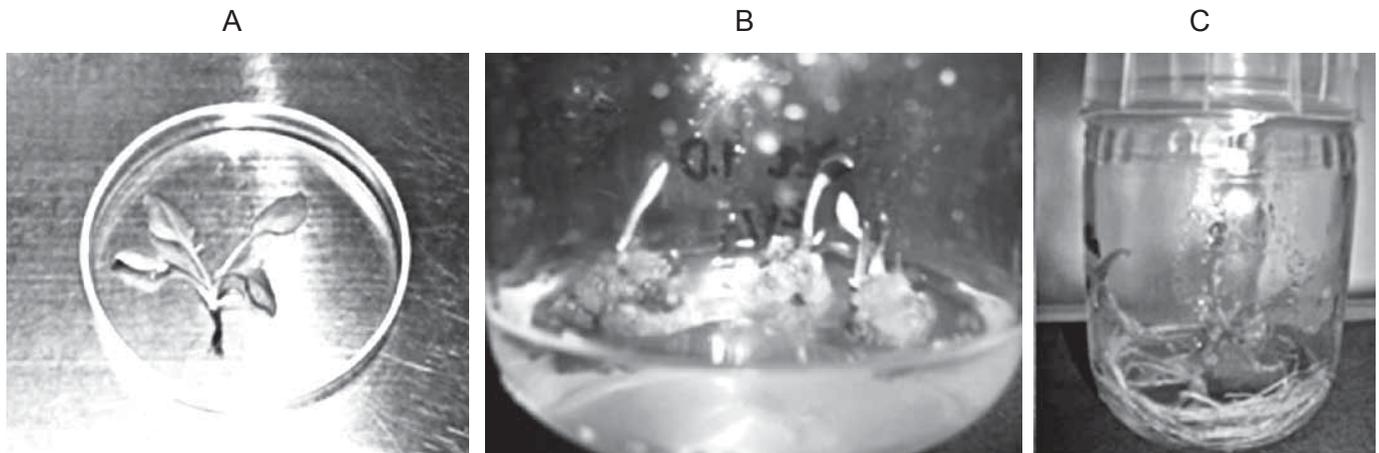


Figura 3. **A.** Brotes en un ápice luego de una semana de sometido al tratamiento F. **B.** Callo en la base de ápices del tratamiento E. **C.** Brote floral en un ápice del tratamiento F.

incremento en la concentración del TDZ a 2 mg/l y 4 mg/l produjo un decrecimiento en la producción de brotes adventicios (Ping et al.; 2005).

En estudios realizados en esta especie, citados anteriormente, se observó que concentraciones mayores a 0,1mg/l de BAP (0,2 mg/l y 0,4 mg/l) indujeron la producción de menor número de brotes (3 y 2 respectivamente) (Mederos et al.; 1998).

Los resultados obtenidos en los tratamientos B y C que contenían las sales y vitaminas M & S (1962) y en forma adicional 100 mg/l de myo-Inositol y 4 mg/l de Piridoxina-HCl, 0,4 mg/l y 0,6 mg/l de BAP, produjeron un promedio de dos explantes por brote.

La alta tasa de producción promedio de brotes alcanzada en este estudio con el tratamiento F, fue similar a la obtenida por Ping y colaboradores (1998). Sin embargo, el tratamiento empleado en este trabajo de investigación contenía la mitad de las sales de M & S (1962) y el 50% de la concentración de sacarosa usual, y carecía de reguladores del crecimiento. Estos resultados se podrían explicar porque P. mayor crece en campos abiertos, bosques y a orillas de caminos, hasta es considerada como mala hierba en zonas cultivadas, siendo abundante en suelos erosionados y

pobres, por lo que probablemente sea una especie adaptada a condiciones de baja demanda de compuestos nutricionales.

A la luz de los resultados obtenidos, se podría inferir que las concentraciones de 0,6 mg/l y 0,4 mg/l de BAP empleadas en este ensayo, incidieron en una baja producción de brotes y concentraciones de 0,1mg/l produjeron un promedio de 7 brotes por explante, en tanto que a concentraciones mayores de 0,2 mg/l y 0,4 mg/l, se obtuvo menor cantidad de brotes y el empleo de 0,2 mg/l produjo la misma cantidad de brotes reportada en este trabajo.

Es posible que debido al nivel de reguladores endógenos presente en estos explantes, no requirieran de reguladores exógenos en el medio de cultivo, como se determinó en el tratamiento control y en el tratamiento F.

Se observó que los explantes que no regeneraron se encontraban maltratados producto de la manipulación durante la introducción, esto porque algunas de las vitro plantas utilizadas presentaban aún tejidos muy jóvenes y la cantidad de fibras, tanto de tallos como de raíces, dificultan cortes limpios y que no dañen los meristemos, ubicados en la base de las plántulas.

## Conclusiones

Los mejores resultados en la inducción de brotes fueron de 14,9 brotes promedio por explante en el medio con las sales y vitaminas M & S (1962) reducidas al 50% de su concentración, 1,5% de sacarosa y sin reguladores de crecimiento.

Los tratamientos que no contenían 100 mg/l de myo-Inositol y 4 mg/l de Piridoxina-HCl adicional, mostraron una mayor tasa de producción de brotes, incluyendo el tratamiento control.

Los resultados obtenidos con los tratamientos F y de control, mostraron que no se requirió un tratamiento de inducción para la brotación ni de un medio promotor del enraizamiento.

Se logró implementar un proceso eficiente de aclimatación de las plantas a condiciones de invernadero, en el cual las plantas se comportaron de forma homogénea hasta la floración. Sin embargo, las condiciones agronómicas para el desarrollo óptimo de las mismas con fines comerciales debe ser evaluado.

Las plantas germinadas in vitro resultaron ser una fuente apropiada para la obtención de explantes, aunque las condiciones de cultivo in vitro optimizadas en este trabajo pueden ser evaluadas en condiciones de plantas obtenidas del campo y que previamente hayan pasado por un período de desinfección en condiciones de invernadero.

## Bibliografía

Altman, A.; Loberant, B. 1998. Micropropagation: Clonal plant propagation *In Vitro*. Agricultural Biotechnology. Marcel Dekker, Inc. Madison, U.S.A. 145 p.

Germosén-Robineau, L(ed.).2005. Farmacopea vegetal caribeña. 2ª ed. Editorial Universitaria UNAM-León. 486 p.

Gupta, M. P. (ed.). 1995. *270 plantas medicinales iberoamericanas*. Primera edición. Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo. 617 p.

International Plant Genetic Resources Institute (IPGRI). 2002. Consultado en Disponible en: [http:// www.ipgri.cgiar.org/](http://www.ipgri.cgiar.org/)

Kharma, A.; Hassawi, D. 2006. Antimicrobial activity of some medicinal plants against *Candida albicans*. Journal of Biological Sciences 6 (1): 109-114.

Li, P; Chen, H; LI YX. 2005. Establishment and optimization of *in vitro* regeneration system for *Plantago major* L. Chinese Journal of Biotechnology 21(6):916-22.

Mederos, S.; Martin, C.; Navarro, E.; AYUSO, M. J. 1998. Micropropagation of a medicinal plant, *Plantago major* L. Rev Biología Plantarum 40(3): 465-468.

Narender, S. N.; Kartha, K. K. 1994. Plant cell and tissue culture. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, Netherlands. 604 p.

Ping, L.; Chua, C.; Yin-xin, L. 2005. Establishment and optimization of *in vitro* regeneration system for *Plantago major*. Chinese Journal of Biotechnology 21(6):916-922.

Piqueras, A.; Debergh, P. C.1999. Morphogenesis in plant tissue cultures. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, Netherlands. 520 p.

Ravn, H., Brimer, L., 1988. Structure and antibacterial activity of plantamajoside, a caffeic acid sugar ester from *Plantago major* subsp. *major*. Phytochemistry 27: 3433-3437.

Recio, M. C.; Giner, R.m.; Rios, J. L. 1994. Structural considerations on the iridoids as antiinflammatory agents. Planta Médica 60: 232-234.

Roca, W. M y Mroginski, L. A. 1991. Cultivo de tejidos en la agricultura. Fundamentos y aplicaciones. Cali, Colombia. 969 p.

Salisbury, F. B.; Ross, C. W. 1994. Fisiología vegetal. Traducido por Virgilio González. Grupo Editorial Iberoamérica. Mexico DF, Mexico. 759 p.

Samuelsen, A B.;lund, I.; Djshromi, J. M.; Paulsen, B.Wold J.k.; Knutsen, S. H. 1999. Structural features and anti-complementary activity of some heteroxylan polysaccharide fractions from the seeds of *Plantago major* L. Carbohydrates Polymers 38:133-143.

Samuelsen, A. 2000. The traditional uses, chemical constituents and biological activities of *Plantago major* L. A review of Journal of Ethnopharmacology (71): 1-21.