

Instituto Tecnológico de Costa Rica

Escuela de Biología

Proyecto Estudiantil

**“Establecimiento de cultivos celulares de *Nicotiana tabacum L*”**

Estudiante

**Sofía Campos Delgado**

Profesor Supervisor

**M.Sc. Giovanni Garro Monge**

II Semestre

2015

# Establecimiento de cultivos celulares de *Nicotiana tabacum* L.

Sofía Campos Delgado

## Resumen

*Nicotiana tabacum* es originaria del continente americano y con base en sus propiedades medicinales, se ha estudiado a profundidad. Las especies pertenecientes al género *Nicotiana* son esenciales para el desarrollo de estudios básicos de biotecnología vegetal y programas de mejoramiento genético, por lo que se considera un organismo modelo de investigación. El establecimiento de cultivos celulares, tanto de callo como de suspensiones, ha facilitado la obtención de diferentes productos o metabolitos secundarios bajo condiciones controladas, sin embargo estas deben ser optimizadas para cada evento específico. En este estudio se probaron dos tratamientos de inducción a callo a partir de segmentos foliares de plantas *in vitro* de *Nicotiana tabacum* L. Posteriormente se estableció el cultivo de células en suspensión. Se evaluaron diferentes parámetros (color, tamaño, frecuencia de formación y porcentaje de peso seco) al callo. Mientras que a la suspensión se evaluó por medio del porcentaje de volumen sedimentado empacado, viabilidad y concentración celular. A partir de la metodología utilizada se logró la inducción y establecimiento de callogénesis con un 100% de rendimiento. A partir de estos resultados se determinó que el tratamiento B era el más adecuado para establecer las suspensiones celulares (MS+ 0,2 mgL<sup>-1</sup> BAP+ 2mgL<sup>-1</sup> ANA) debido a que indujo a la producción de callo con las características de textura, tamaño y color requeridas para este fin. Finalmente se logró observar suspensiones celulares en las cuales se puede determinar una baja concentración celular y gran diversidad morfológica de sus células. Por lo tanto es necesario realizar ajustes en el protocolo de establecimiento y subcultivo de las suspensiones para mejorar los rendimientos y la morfología.

**Palabras clave:** *Nicotina tabacum*; callogénesis; suspensiones celulares; viabilidad.

## 1. INTRODUCCIÓN

Las especies pertenecientes al género *Nicotiana* son esenciales para el desarrollo de estudios básicos de biotecnología vegetal, programas de mejoramiento genético y más recientemente para realizar investigaciones de transformación genética. En estos estudios, *Nicotiana sp* ha servido como organismo modelo para la producción de metabolitos secundarios y el estudio de expresión o introducción de genes foráneos (Lewis & Nicholson, 2007). *Nicotiana tabacum* es originaria del continente americano y el hombre comenzó a utilizarla como agente medicinal principalmente. Gracias a sus propiedades medicinales fue que se extendió por todo el mundo y por esta razón se ha estudiado a profundidad y ha sido posible el desarrollo de diferentes protocolos de cultivo *in vitro*, lo cual permite ahora aislar y producir sus compuestos bioactivos a gran escala (Rubio & Rubio, 2006).

Con respecto al establecimiento *in vitro* de *Nicotiana sp*, la manera de introducción más fácil y efectiva es por medio de semillas, utilizando un medio de cultivo sencillo libre de reguladores de crecimiento. El proceso de callogénesis a partir de *in vitro* plantas según Ali *et al* (2007), se debe principalmente a las diferentes concentraciones de los reguladores de crecimiento en el medio de cultivo que cumplen una función de suma importancia en el control de la morfogénesis y desarrollo del tejido. Se conoce que las auxinas y citocininas son los reguladores de crecimiento que más se utilizan para promover la formación de callo. Específicamente en *Nicotiana tabacum*, este proceso ha sido esencial para el estudio morfológico y comprensión del comportamiento de las células, aparte

de su importancia en el desarrollo de poblaciones clonales, propagación masiva de plantas y manipulación genética (Ali *et al.*, 2007).

Por otra parte, según Arias *et al* (2008), el establecimiento de suspensiones celulares es una técnica de importancia que ha facilitado la obtención de diferentes productos o metabolitos secundarios. Esta consiste en el cultivo de células generalmente provenientes de callo en un medio líquido que se encuentra en constante agitación, lo que garantiza que las células individuales se distribuyan en forma homogénea en el medio de cultivo, facilitando así la transferencia de nutrientes y oxígeno hacia el citoplasma.

Una ventaja de esta técnica es la facilidad para controlar variables externos como temperatura y humedad relativa del cuarto de crecimiento, sin embargo es muy sensible a los cambios bruscos de los factores mencionados, alterando la tasa de rendimiento y así mismo la producción de metabolitos secundarios. Sin embargo se debe tomar en cuenta que no todas las especies son viables al cultivo bajo esta técnica (Zhao & Verpoorte, 2007). El objetivo de establecer suspensiones celulares a gran escala es maximizar la producción del producto de interés y que las condiciones de la misma sean específicas. Es de suma importancia que se cuente con un sistema de operación y diseño adecuados para que la producción industrial sea exitosa (Huang & McDonald, 2009). En *Nicotiana tabacum*, el cultivo de suspensiones celulares ha sido de utilidad para la producción de proteínas recombinantes y gran cantidad de compuestos bioactivos y se considera que es fácil lograr establecer el cultivo en suspensión a gran escala (Havenith *et al*, 2014). Además, presenta ventajas como el bajo costo de producción, alta calidad de los productos obtenidos y protocolos accesibles (Santos *et al*, 2013).

Este proyecto tuvo como objetivo desarrollar una metodología eficiente para el establecimiento de cultivo de callo de *Nicotiana tabacum L.*, que conlleven a un posterior cultivo de suspensiones celulares uniformes, con miras a escalar la suspensión en un biorreactor. Todo esto con el propósito de poner a punto metodologías para la realización de otras investigaciones en *Nicotiana tabacum*, relacionadas con la producción de compuestos bioactivos y transformación genética.

## **2. METODOLOGÍA**

El proyecto se llevó a cabo durante el primer semestre del 2015 en el Centro de Investigación en Biotecnología del ITCR. Se empleó material vegetal de *Nicotiana tabacum L.* proveniente de la zona de Pérez Zeledón, San José. El material (semillas) fue facilitado por la empresa Tabacos del Valle S.A.

### 2.1 Inducción de callogénesis

Se siguió la metodología descrita por Ali *et al* (2007). Se usaron explantes foliares de 1 cm<sup>2</sup> las vitroplantas obtenidas de *Nicotiana tabacum L.* en medio semisólido MS 100% (Murashigue y Skoog 1962) al 3% m/v de sacarosa y modificado con Ácido Naftalenacético (ANA) y 6-bencilaminopurina (BAP). Se establecieron dos tratamientos según el cuadro 1.

**Cuadro 1.** Tratamientos de inducción a callo en *N. tabacum L* haciendo uso de dos reguladores de crecimiento en un medio base MS (1962).

Tratamiento	BAP	ANA
A	0,2 mgL <sup>-1</sup> BAP	1mgL <sup>-1</sup> ANA
B	0,2 mgL <sup>-1</sup> BAP	2mgL <sup>-1</sup> ANA
pH:	5.8	5.8
Gelificante: Phytigel	6gL <sup>-1</sup>	6gL <sup>-1</sup>

Los explantes se cultivaron en condiciones de oscuridad a una temperatura de 25°C a 27°C según lo indicado por Santos *et al* (2013). Se evaluó periódicamente el proceso de formación de callo en parámetros de tamaño promedio, textura (friabilidad) y color. Para cada tratamiento se determinó a partir de cual se obtuvo tejido de mayor calidad y la frecuencia de formación por medio de la siguiente fórmula:

$$FC = \frac{\# \text{ de callos obtenidos}}{\# \text{ de explantes cultivados}} * 100$$

Una vez formado, se tomaron cinco explantes al azar de cada tratamiento y se obtuvo el peso fresco y peso seco del tejido de callo luego de 72 horas en la estufa a 60°C. Se calculó a partir del peso promedio obtenido el porcentaje del peso seco obtenido para cada uno empleando la fórmula  $\% \text{ peso seco} = (\text{Peso seco} / \text{Peso fresco}) * 100$  (Havenith *et al.*, 2014). La evaluación del callo se realizó luego de cuatro semanas.

### 2.3 Inducción y establecimiento de suspensiones celulares a nivel de Erlenmeyer (matraz.)

Las suspensiones celulares se establecieron empleando callo previamente obtenido, el cual se cultivó para eliminar tejido no funcional (presencia de raíces) y para lograr mayor estabilidad de las células. Se tomó un inóculo inicial de aproximadamente 5g a 10g y se empleó medio de cultivo líquido del mejor tratamiento utilizado para la inducción de callo en matraces de 250 ml con 50 ml de medio. Seguidamente se colocaron en agitador orbital a 100 rpm. Luego de ocho días se procedió a tamizar la suspensión para eliminar los grumos celulares y cultivar en matraces de 250ml con medio fresco para lo cual se inculó con el 10% del volumen total de la suspensión (Santos *et al.*, 2013).

Se determinó el volumen sedimentado de la suspensión celular una vez que se tamizó la suspensión y previo al primer subcultivo (seis semanas después) para medir el crecimiento celular siguiendo la metodología empleada por Havenith *et al* (2014) con algunas modificaciones. Se tomó un tubo falcon de 15ml, se agregó 15 ml de la suspensión a evaluar y se dejó reposar por 15 minutos. Se usó la fórmula  $VE = (\text{Vol. efectivo} / \text{Vol. total}) * 100$  para determinar el volumen sedimentado de la suspensión.

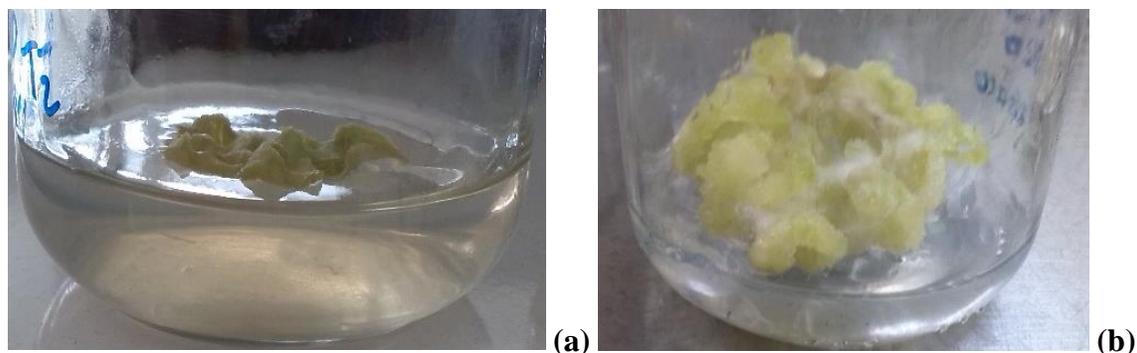
Se evaluó la viabilidad de las suspensiones celulares previo al primer subcultivo una vez que alcanzaron una turbidez apropiada por medio de tinción con azul de Evans (Sánchez & Alvarenga, 2015) para lo cual con una micropipeta se tomaron 500 µl de la suspensión celular y se colocaron un tubo Eppendorf de 1 ml, luego se tomaron 50 µl de azul de Evans y se colocaron en el mismo Eppendorf, incubándose por 10 min para después centrifugarse a 1000 rpm durante 10 min. Posteriormente, se descartó el sobrenadante y se adicionaron 500 µl de agua destilada estéril, se agitó y se tomaron 15 µl a partir de esta mezcla, colocándose en un portaobjetos, la muestra se observó al microscopio de luz a un aumento de 40X. Se consideraron viables aquellas células que no se tiñeron, por lo que se excluyen las teñidas (Santos *et al.*, 2013). Finalmente, se realizó conteo en hematocitómetro para determinar la concentración celular total, empleando la fórmula:

$$\# \text{ células totales contadas} \times 10^4 \times FD = \# \text{ células/ml}$$

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 3.1. *Inducción a callogénesis*

La Fig. 1 muestra el proceso de formación de callo del tejido foliar de *N. tabacum*, luego de una y dos semanas de su introducción, sin embargo, luego de 4 semanas se observó que ambos tratamientos permitieron la formación de callo. La frecuencia de formación para el tratamiento **A** fue del 100%, sin embargo, promovió la formación de raíces y tejido de color blanco (Fig. 2). Para el tratamiento **B** se obtuvo, de igual forma, una frecuencia de formación de 100% y tejido de color blanco-amarillo (Fig.3) pero en este caso la formación de raíces fue menor. Por otro lado, el porcentaje promedio de peso seco fue de 3,47% y 2,66% para el tratamiento A y B, respectivamente. El Cuadro 2 muestra los datos de textura y color.



**Figura 1.** Explante foliar de *N. tabacum* luego de una (a) y dos (b) semanas.



**Figura 2.** Callo obtenido a partir de hojas de *N. tabacum L.* del tratamiento A, luego de cuatro semanas.



**Figura 3.** Callo obtenido a partir de hojas de *N. tabacum L.* del tratamiento B luego, de cuatro semanas.

**Cuadro 2.** Frecuencia de formación de callo, tamaño, porcentaje de peso seco color y textura luego de 4 semanas.

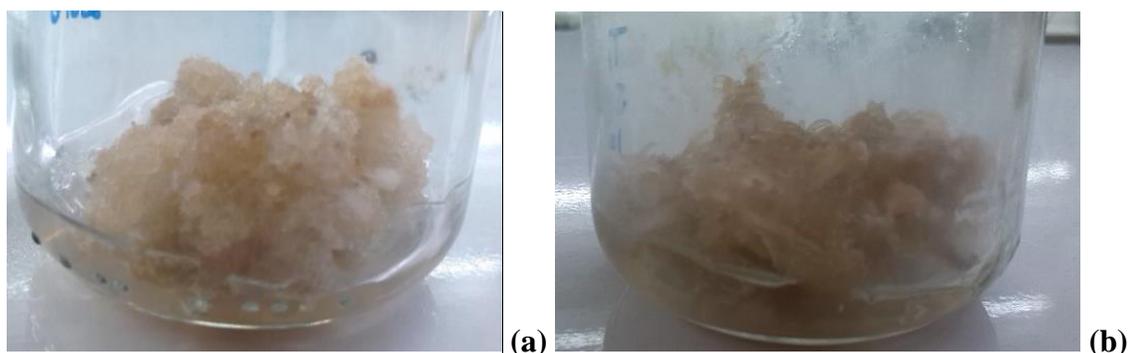
Tratamiento	Frecuencia de formación	Tamaño (diámetro)	Porcentaje de peso seco	Color	Textura
A:0,2mgL <sup>-1</sup> BAP+1mgL <sup>-1</sup> ANA	100%	4 cm	3,47%	Blanco	Muy suave y muy friable (esponjoso)
B:0,2 mgL <sup>-1</sup> BAP+ 2mgL <sup>-1</sup> ANA	100%	4,5cm	2,66%	Blanco-Amarillo	Suave y friable

BAP (6-bencilaminopurina), ANA (ácido naftalenacético).

Cabe destacar que, a pesar de que se obtuvo una frecuencia de formación de callo del 100% para ambos tratamientos se observó el inicio de necrosis por parte de las células que poseían

contacto directo con el medio de cultivo luego de seis semanas, por lo que es necesario realizar subcultivos frecuentes cada tres o cuatro semanas para evitar la aparición de la necrosis.

Se determinó que el tejido de callo obtenido del tratamiento **B** poseía las mejores características para establecer las suspensiones celulares (color crema, textura friable) y también con base en que el medio A favoreció en mayor medida la formación de raíces como se muestra en la Fig. 4. La friabilidad, según Muñoz *et al* (2003), es una característica deseable a la hora de establecer las suspensiones celulares debido a que facilita la disgregación de las células, y por ende, favorece un mayor contacto e intercambio de nutrientes entre las células y el medio de cultivo.



**Figura 4.** Callos (a y b) obtenidos a partir de hojas de *N. tabacum L* del tratamiento A con formación de raíces luego de 4 semanas de subcultivo.

La formación del callo puede explicarse como la influencia de varios factores, iniciando por el explante empleado, en este caso las hojas se han reportado como un explante apropiado para la inducción de callo en *N. tabacum* (Ali *et al.*, 2007). Una vez que el mismo fue cultivado en el medio adecuado e incubado bajo condiciones de luz y temperatura controladas en el cuarto de crecimiento, conducen al explante a la formación de una masa amorfa de células que se encuentran en continua división. El callo pierde la estructura y organización tisular debido al proceso de desdiferenciación celular. Una vez que se formó este debe subcultivarse periódicamente en medio fresco con el fin de mantener su uniformidad y ser utilizado luego en otros procesos como embriogénesis, organogénesis o establecimiento de suspensiones celulares (Ali *et al.*, 2007; García, 2013). Según Feeney *et al* (2007) la frecuencia de formación de callo puede variar de acuerdo a la composición del medio, sin embargo en este caso no fue así ya que la ambos tratamientos poseen concentraciones similares en cuanto a ANA y BAP.

La formación de raíces se ve estimulada por la presencia reguladores de crecimiento de tipo auxínico y otras condiciones de crecimiento. En este caso el ácido naftalenacético (ANA) es una auxina sintética que se caracteriza por favorecer el enraizamiento dependiendo de la concentración que se utilizó. Además, la ausencia de luz y una temperatura constante a 25°C-27°C, propician las condiciones adecuadas para que se da la formación de las raíces (Ramírez & Urdaneta, 2004). Los mismos autores explican que la respuesta de enraizamiento se debe a que las auxinas participan en la división de las primeras células que dan origen a la raíz, promueven el transporte de carbohidratos a la zona de enraizamiento, influyen en la actividad

de las enzimas involucradas con el metabolismo de los carbohidratos e intervienen en la iniciación de la síntesis de ADN y en la transcripción del ARN, sin embargo, Soh, Choi & Cho (1998) mencionan que la formación de raíces adventicias en explantes de callo se da cuando se presenta un cambio morfológico en un medio con auxinas y citoquininas, no así cuando el medio de cultivo cuenta con solo citoquininas. Esto se debe a que las citoquininas tienen un efecto estimulante para formar los primordios radicales en el tejido de callo, mientras que la auxina promueve la elongación de las mismas. Se debe de tener siempre en cuenta que el comportamiento del tejido va a depender del genotipo de las plantas empleadas en el ensayo (Soh, Choi & Cho, 1998). Lo anterior coincide con lo obtenido en el presente proyecto en donde ambos tratamientos de inducción a callo cuentan reguladores auxínicos y citoquininas, sin embargo, la formación de raíces se expresó más en el tratamiento A.

El color del tejido puede verse como un indicador del grado de dediferenciación obtenido, por lo que si el callo se torna verde, el tejido se está diferenciando y sus células por consecuente se encuentran más organizados. En casos de que aparezcan partes color café, estas deben de eliminarse ya que indica que las células han muerto. En este caso la coloración café se dio luego de las 6 semanas de cultivo debido al consumo del medio de cultivo. Se ha determinado que el callo debe ser color crema, razón por la que se seleccionó el callo obtenido del tratamiento B para proceder a establecer las suspensiones celulares (Moon & Stomp, 1997).

Con respecto a la friabilidad de los callos obtenidos ambos poseían características muy similares, sin embargo el tratamiento A mostró callos muy suaves, por lo que se determinó que el mejor fue el obtenido a partir del tratamiento B, esto se debe a que según García (2013), los friables son aquellos que permanecen débilmente asociadas pudiendo disgregarse fácilmente, lo que los vuelve idóneos para formar suspensiones celulares ya que al inocular un fragmento en un matraz con medio de cultivo líquido se liberan células aisladas.

Finalmente, según Havenith *et al* (2013) los bajos porcentajes de peso seco se debe a que en el periodo de cultivo las células absorbieron mucha agua del medio. Es posible que por la diferencia de osmolaridad entre el medio de cultivo y las células, provoca que estas estallen, por lo que el peso seco disminuye considerablemente debido a la ruptura de la célula. Por tanto, haber obtenido porcentajes bajos con respecto al peso fresco del callo, indica el alto contenido de agua en sus células, en donde la edad del callo es un factor importante a considerar ya que puede influir en la producción de biomasa.

### 3.2 Inducción y establecimiento de suspensiones celulares a nivel de Erlenmeyer (matraz)

La Fig. 5 muestra las suspensiones celulares luego de 8 días de establecidas (previo a ser tamizadas y subcultivadas). Es posible observar una coloración amarilla de los grumos sin disgregar del tejido de callo de *N. tabacum L.* Una vez que se midió el volumen sedimentado, se obtuvo en promedio 9,56%/ 15 min. Luego de 6 semanas se procedió a medir el volumen sedimentado nuevamente y se obtuvo 0,2 % .

Además se evaluó la viabilidad en donde se observa la presencia de células irregulares de gran tamaño, viables (incoloras) y no viables (color azul), así como fue posible observar la presencia de fibras no viables (Fig. 6).

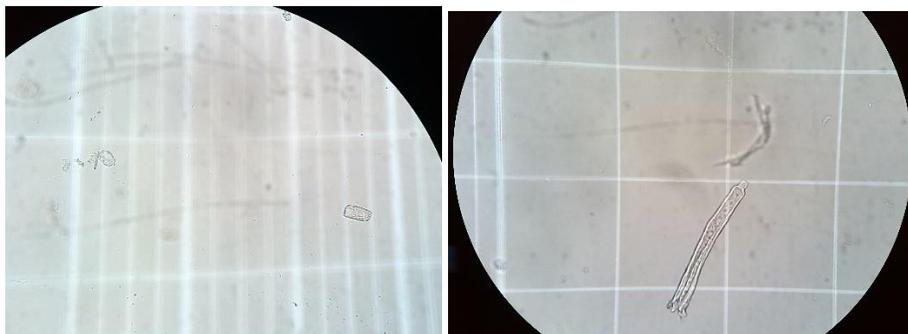
Una vez que se realizó el conteo celular se determinó que la concentración de células fue de  $7,5 \times 10^3$  células totales/ml. La Fig. 7 muestra células de gran tamaño y agrupaciones de las mismas lo cual dificultó el conteo celular.



**Figura 5.** (a) Callo empleado para establecer las suspensiones celulares. (b) (c) Suspensiones celulares iniciales de *N. tabacum* luego de 8 días de establecimiento



**Figura 6.** Prueba de viabilidad de células en suspensión de *N. tabacum L* luego de 6 semanas de subcultivo. 10x



**Figura 7.** Conteo en hematocímetro de células en suspensión de *N. tabacum L*, luego de 6 semanas de subcultivo. 40x.

Estas suspensiones celulares deben permanecer en agitación orbital para garantizar un aporte equitativo de los nutrientes y del oxígeno a todas las células en suspensión, pudiendo mantenerse de forma relativamente sencilla en matraces al subcultivarlas periódicamente en medio fresco (García, 2013).

Según Sánchez & Alvarenga (2015), el porcentaje de volumen celular sedimentado obtenido antes del primer subcultivo se considera normal, sin embargo el volumen empacado tiende a aumentar y alcanzar hasta a un 60% cerca de la cuarta semana de cultivo. En este caso se dio una disminución el porcentaje de volumen sedimentado, lo cual según las mismas autores, significa que hay una menor concentración celular y por ende se infiere que hay una tasa de división celular muy baja. También la baja concentración celular puede deberse a que la fase de latencia o de adaptación tardó mucho tiempo, lo que impidió el desarrollo adecuado de las células en suspensión.

Según Havenith *et al* (2013), el conteo de las células vegetales en suspensión es muchas veces difícil debido a que su morfología no siempre es homogénea y tienden a formar agregados celulares. En el caso de las células de *N. tabacum* es importante tener en cuenta que aparte de tener altas tasas de crecimiento, la morfología de las mismas ha mostrado ser muy diversa en comparación con suspensiones celulares de otras especies. La formación de los agregados se da debido que no hay una división adecuada de las células y la presencia de los mismos no permitió un conteo exacto, además, estos agregados pueden algunas veces interferir en la producción de metabolitos secundarios y favorece a la diferenciación celular (Arias *et al.*, 2008).

Por otra parte, según Ruiz, Higareda & Pardo (2010), en las suspensiones celulares de *N. tabacum* se han caracterizado morfológicamente por tener células redondas formando agregados en forma de racimos y alargadas que forman cadenas lineales que probablemente son procedentes del tejido parenquimático de empalizada de hoja (Sánchez & Alvarenga, 2015). Por tanto lo encontrado en estos ensayos concuerda con lo reportado en la literatura.

## CONCLUSIONES

1. Bajo las diferentes condiciones de laboratorio y la metodología desarrollada, se logró la inducción de callogénesis a partir de segmentos foliares de *N. tabacum L* de manera exitosa en un medio MS+ 0,2 mgL<sup>-1</sup> BAP+ 2mgL<sup>-1</sup> ANA a una temperatura de 25-27°C.
2. Se estableció el cultivo de suspensiones celulares a nivel de matraz para *N. tabacum L* a partir de tejido de callo obtenido.
3. El estudio de las células en suspensión obtenidos permitió determinar la morfología celular, así como la viabilidad de las mismas.
4. Se demostró que *N. tabacum L.*, es una especie con gran potencial para realizar ensayos con aplicación biotecnológica, así como investigación fisiológica y bioquímica de los diferentes sistemas de producción, esto gracias a su eficiente generación y fácil manejo de los explantes empleados para la inducción a callogénesis y el establecimiento propiamente de las células en suspensión.

## RECOMENDACIONES

Se recomienda optimizar la concentración de los reguladores de crecimiento del medio empleado para el establecimiento de las suspensiones celulares de *N. tabacum L* con el fin de evitar la diferenciación a raíces adventicias y lograr un tejido en suspensión uniforme y de crecimiento continuo (García, 2013).

Dado que es común encontrar gran variedad de morfologías de las suspensiones celulares vegetales, se recomienda acortar los ciclos de cultivo, esto con el fin de lograr mayor uniformidad del crecimiento de las mismas (Szabados, Mroginski & Roca, 1991)

Se recomienda llevar un control más estricto de la concentración celular y realizar una curva de crecimiento, con el fin de realizar subcultivos en el momento adecuado, lo que favorecería a tener una densidad homogénea de la suspensión. Todo esto con el fin de tener un cultivo apto para el desarrollo de proyectos que conlleven su empleo, con fines de obtener compuestos bioactivos y proteínas recombinantes.

## Agradecimientos

Agradezco al profesor MSc. Giovanni Garro por el apoyo y orientación brindada durante el desarrollo del proyecto. Así mismo, a la Ing. Karol Jiménez y la profesora MSc. Catalina Rosales, por la ayuda y el interés mostrado hacia el presente proyecto estudiantil. Se le agradece a la empresa Tabacos del Valle S.A. por facilitar el material de semillas a partir de las cuales se obtuvieron las vitro plantas y establecer los cultivos celulares.

## BIBLIOGRAFÍA

- Arias, M., Aguirre, A., Angarita, M., Montoya, C., Restrepo, J. 2008. *Aspectos Ingenieriles del Cultivo in vitro de células vegetales para la Producción de Metabolitos Secundarios*. Universidad Nacional de Colombia. Colombia, Medellín. 109-121pp.
- Feeney, M., Bhagwat, B., Mitchell, J., Lane, D. 2007. *Shoot regeneration from organogenic callus of sweet cherry (Prunus avium L.)*. Plant Cell Tissue and Organ Culture. Vol. 90. 201–214pp.
- García, J. 2013. Cultivos celulares de *Nicotiana tabacum* L. cv. BY-2 como sistema modelo en el estudio de la adaptación al estrés salino. Tesis de grado. Universidad de Murcia. Facultad de Biología. España. 265pp.
- Havenith, H., Raven, N., Di Fiore, S., Fischer, R., Schillberg, S. 2014. *Image-based analysis of cell-specific productivity for plant cell suspension cultures*. Plant Cell Tissue Organ Culture (PCTOC). Vol 117. No 3. 393–399pp.
- Huang, T., McDonald, K. 2009. *Bioreactor engineering for recombinant protein production in plant cell suspension cultures*. Biochemical Engineering Journal. Vol 45. Universidad de Davis. California, USA. 168-184pp
- Lewis, R., Nicholson, J. 2007. Aspects of the evolution of *Nicotiana tabacum* L. and the status of the United States *Nicotiana* Germplasm Collection. Genetic Resources and Crop Evolution. Vol. 54. No 4. 727–740 pp.
- Moon, K., Stomp, A. 1997. *Effects of medium components and light on callus induction, growth, and frond regeneration in lemna gibba (Duckweed)*. In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant. Vol 33. 20-25 pp.
- Muñoz, J., Valerín, K., Alvarenga, S. & Alan, E. 2003. Cultivo in vitro de tempate (*Jatropha curcas*). *Tecnología en Marcha*. Vol. 16 (4): 53-59
- Ramírez, M., Urdaneta, A. 2004. *Efecto del ácido naftalenacético y de diferentes sustratos sobre el enraizamiento de acodos aéreos del guayabo (Psidium guajava L.)*. Revista de la Facultad de Agronomía (LUZ). Vol. 21. No (4). 28-34pp
- Rubio, H., Rubio, A. 2006. *Breves comentarios sobre la historia del tabaco y el tabaquismo*. Revista del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias Ismael Cosío Villegas. Vol. 19. No 4. 297-300 pp.
- Ruiz, L., Higareda, A. & Pardo, M. 2010. *Sincronización de Células de Tabaco (Nicotiana tabacum) NT-1*. Información tecnológica. Vol 21. No 2. 3-11pp.
- Sánchez, L., Alvarenga, S. 2015. *Callogénesis y establecimiento del cultivo de células en suspensión de Uncaria tomentosa (Willd.) D.C. (uña de gato)*. *Tecnología en Marcha*. Vol. 28. No 1. 105-120pp.
- Santos, D., Germán, L., Cruz, A., Fuentes, C., Milán, J., Reyes, C., Valdez, A. 2013. *Expression of the acidic-subunit of amarantin, carrying the antihypertensive biopeptides VY, in cell*

- suspension cultures of Nicotiana tabacum NT1*. Plant Cell Tissue Organ Culture (PCTOC). Vol 113. No 2. 315–322pp.
- Soh, W. Y., Choi, P. S., & Cho, D. Y. 1998. *Effects of cytokinin on adventitious root formation in callus cultures of Vigna unguiculata (L.) walp.* In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant. Vol. 34. No. 3. 189-195 pp.
- Sun, J., Li, L., Liu, M., Wang, M., Ding, M., Deng, S., Lu, C., Zhou, X., Shen, X., Chen, S. 2010. *Hydrogen peroxide and nitric oxide mediate K<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup> homeostasis and antioxidant defense in NaCl-stressed callus cells of two contrasting poplars.* Plant Cell Tissue Organ Culture (PCTOC). Vol 103. No 2. pp 205-215.
- Szabados, L., Mroginski, L. & Roca, W. 1991. *Suspensiones celulares: descripción, manipulación y aplicaciones.* Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones. Capítulo 8. 173-210 pp.
- Zhao, J., Verporte, R. 2007. *Manipulating indole alkaloid production by Catharanthus roseus cell cultures in bioreactors: from biochemical processing to metabolic engineering.* Rev.