

Dediferenciación de Explantes de Hojas de *Moringa Oleífera*

Montserrat Lizbeth Sánchez Martínez^a, Pedro López-Ordaz^b, Alfonso Totosaus Sánchez^a e Ignacio García-Martínez^{a*}



Acerca de los autores

^aTecnológico Nacional de México/Tecnológico de Estudios Suéiores de Ecatepec.

^bUnidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología, Instituto Politécnico Nacional, Departamento de Biotecnología Alimentaria.

Tecnológico de Estudios Superiores de Ecatepec

Resumen

Debido al impacto que tiene la *Moringa oleífera* por sus múltiples propiedades, se requiere producirla en grandes cantidades para satisfacer la demanda industrial, tomando en cuenta que debe contar con características similares, ya que los productos comercializados necesitan cumplir con un grado de estandarización (Swati, G. *et al.*, 2018). En el presente trabajo se obtuvieron células dediferenciadas de *Moringa oleífera* mediante la técnica de propagación *in vitro*, para generar una multiplicación masiva

de este árbol, induciéndolo a estrés con acción antibiótica. Se adaptó una técnica de asepsia para explantes de hojas y peciolo de *Moringa oleífera* con soluciones de hipoclorito de sodio (NaClO) al 2% y etanol al 50%, para evitar el crecimiento ventajoso de microorganismos dentro del medio de cultivo. Los explantes fueron colocados en medios basales, elaborados con medio Murashige y Skoog y Phytigel; se realizaron diez repeticiones de cada tratamiento variando el tipo de antibiótico y su concentración en 250 ppm, 400 ppm y 500 ppm. En las técnicas de asepsia, ofreció mejores resultados el tratamiento 4, debido a que el 100% de los tratamientos no mostraron daños de clorosis o necrosis en los explantes. En el tratamiento con antibióticos el que presentó una mayor actividad estimulante fue la clindamicina, obteniendo el 90% de los tratamientos con callo a una concentración de 250 ppm.

Palabras clave: *Moringa oleífera*, Antibióticos, Propagación *In vitro*, Células dediferenciadas.

Abstract

Due to the impact that Moringa oleífera has due to its multiple properties, its required to produce it in large quantities to satisfy industrial demand, taking into account that it must have similar characteristics, since the products marketed require compliance with a degree of standardization (Swati, G. et al., 2018). In the present work, dedifferentiated Moringa oleífera cells were obtained using the in vitro propagation technique, to generate massive multiplication of this tree, inducing it to stress with antibiotic action. An asepsis technique was adapted for explants of leaves and petioles of Moringa oleífera with solutions of 2% sodium hypochlorite (NaClO) and 50% ethanol,

to avoid the advantageous growth of microorganisms within the culture medium. The explants were placed in basal media, made with Murashige and Skoog and Phytigel medium; ten repetitions of each treatment were carried out, varying the type of antibiotic and its concentration at 250 ppm, 400 ppm and 500 ppm. In the asepsis techniques, treatment 4 offered better results, because 100% of the treatments did not show chlorosis or necrosis damage in the explants. In the treatment with antibiotics, the one that presented the greatest stimulating activity was clindamycin, obtaining 90% of the treatments with callus at a concentration of 250 ppm.

Keywords: *Moringa oleífera*, Antibiotics, *In vitro* Propagation, Dedifferentiated cells.

Introducción

La *Moringa oleífera* es un árbol nativo del sur de Asia, como Pakistán, Afganistán, India y Bangladesh, perteneciente a la



familia *moringaceae* (Pérez, A. *et al.*, 2010); es resistente a la sequía debido a que crece a temperaturas de -1°C - 48 °C y es cultivado en regiones áridas, así como en condiciones de estrés en un rango de pH de suelo entre 4.5 y 8 (Pérez, A. *et al.*, 2010); por lo tanto, hoy día se puede encontrar en distintas partes del mundo, como en América Central, América del Norte, Filipinas, Camboya, Sudamérica y las Islas del Caribe (Anwar, F. *et al.*, 2007). Asimismo, a la *Moringa oleífera* se le identifica con una gran variedad de nombres, dependiendo la región en la que se encuentre, como por ejemplo en América Latina es llamado árbol rábano picante, palo tambor, flor de Jacinto, árbol de perlas, entre otros; en Filipinas, Malunkai; en Haití, Ben Oleifere, etcétera. (Bonal, R. *et al.*, 2012).



En la actualidad, la *Moringa oleífera* se ha destacado por contener una gran cantidad de propiedades y nutrientes que aportan grandes beneficios a la salud, a la industria alimenticia, farmacéutica y cosmética, debido a que se ha demostrado que todas sus partes cuentan con componentes bioactivos, que se utilizan en el forraje de animales, en la producción de biogás, en productos de limpieza, en la elaboración de medicamentos, en la producción de fertilizantes, y se ha demostrado que es un excelente floculante de metales pesados, por lo tanto, es una alternativa en la purificación de aguas; de igual forma, la corteza y la madera son útiles en la producción de colorantes y cuerdas (Muñoz, J. 2015); además, las semillas contienen aproximadamente 40% de aceite, mejor conocido como aceite “ben”, utilizado en la producción de cosméticos (Tabio, D. *et al.*, 2018 Marfori). En general, la *Moringa oleífera* es usada como suplemento alimenticio, ya que contiene grandes cantidades de vitaminas, como la A, la B (B1, B2, B3, B5, B6 y B12), la C, la D, la E y la K; cuenta con minerales como potasio, calcio, fósforo, hierro, selenio, magnesio, triptófano y zinc, así como un alto contenido de proteínas y aminoácidos esenciales, entre otros compuestos (Nieves, M. y Aspuri, E., 2011). Por otro lado, se ha utilizado en aplicaciones tradicionales y en la producción de medicamentos para el tratamiento de enfermedades de la piel, insuficiencia respiratoria, padecimientos del oído, infecciones dentales, problemas de hipertensión, diabetes, anemia y tratamiento del cáncer.

Por lo anterior, la *Moringa oleífera* se ha convertido en un árbol de gran importancia industrial y, por lo tanto, es necesario cumplir con la demanda de las industrias que comercializan productos derivados de moringa, siendo la micropropagación una alternativa para obtener grandes cantidades de moringa de forma estandarizada y a bajo costo, debido a que es una técnica utilizada para la obtención de clones somáticos y generar plantas completas con características iguales y libres de microorganismos, a partir de células vegetales cultivadas *in vitro* (Calva, G. y Pérez, J., 2005). En el presente trabajo, se obtuvieron células dediferenciadas de *Moringa oleífera* a partir de la acción de diferentes antibióticos (cefuroxima, lincomicina y clindamicina), ya que en estudios realizados se demuestra que al colocar los explantes en estrés con acción antibiótica se produce una masa amorfa de células dediferenciadas que

poseen una capacidad totipotencial, o sea, que forman una planta completa con características iguales a la plántula madre.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

La *Moringa oleífera* se obtuvo de los invernaderos de Xochimilco, ubicado al sureste de la Ciudad de México, de la cual se utilizaron explantes juveniles de hojas y peciolo, debido a que los tejidos jóvenes tienen mayor resistencia a la técnica aséptica que el tejido maduro (Magaña, 2016).

Técnica aséptica

Los explantes fueron expuestos a desinfección mediante una técnica aséptica adaptada para el tejido vegetal de la *Moringa oleífera* (Magaña, 2016; Rodríguez, N. *et al.*, 2016; Muñoz, J., 2015). Cada uno de los explantes juveniles de hojas y peciolo de *Moringa* fueron lavados a mano con detergente comercial, evitando daños en los tejidos. Posteriormente, se cubrió el vaso con una gasa y se expuso al chorro de agua durante diez minutos; el agua fue decantada, evitando tocar los explantes, se llevaron a una campana de flujo laminar horizontal marca Labconco® (Purifier™ Clean Bench), previamente limpia con cloro comercial y alcohol etílico.

Se prepararon diferentes soluciones, las cuales fueron utilizadas en la técnica de asepsia de los explantes dentro de la campana laminar de flujo horizontal, como se muestra en la siguiente tabla.

TABLA 1
SOLUCIONES

Solución	Preparación
Antibióticos	Se prepararon 200 ml con agua desionizada de solución antibiótica en un matraz Erlenmeyer con 0.003 g de cefalexina, 0.04 g de ampicilina y 0.04 g tetraciclina; esta solución fue esterilizada a 120 °C durante 20 minutos en una olla de presión marca Presto de aluminio.
Hipoclorito de sodio	Se preparó una solución con hipoclorito de sodio comercial al 2% con agua desionizada, la cual fue esterilizada a 120 °C durante 20 minutos en una olla de presión Presto de aluminio
Alcohol etílico	Se formó una solución de etanol al 50%, la cual fue preparada dentro de la campana de flujo laminar horizontal marca Labconco® (Purifier™ Clean Bench), con agua desionizada previamente esterilizada 120 °C durante 20 minutos, en una olla de presión Presto de aluminio.
Antioxidante	Se prepararon 200 ml de solución de antioxidantes en un matraz Erlenmeyer con agua desionizada, 0.03 g de ácido ascórbico y 0.02 g de ácido cítrico; ésta fue esterilizada 120 °C durante 20 minutos en una olla de presión Presto de aluminio.

Dentro de la campana de flujo laminar horizontal marca Labconco® (Purifier™ Clean Bench), se introdujeron los explantes previamente lavados en un vaso de precipitado estéril, junto con 200 ml de solución antibiótica, la cual se dejó actuar durante 30 minutos en agitación constante; posteriormente, se enjuagó con agua desionizada estéril y se añadió la solución de etanol al 50% preparada dentro de la campana; se dejó durante 20 segundos; se enjuagó nuevamente con agua desionizada estéril; se agregó la solución de cloro al 2% y se dejó actuar por diez minutos; se volvió a enjuagar con agua desionizada estéril y se llevaron a cabo cuatro enjuagues con la solución de antioxidantes, en lapsos de un minuto, manteniéndose en agitación constante. Esta técnica fue adaptada con base en la revisión de trabajos realizados previamente (Barbosa, I. y Chaparro, A., 2011; Bhau, B. y Wakhlu, A., 2001; Nieves, M. y Aspuri E., 2011; Marfori, E., 2010).

Solución de hipoclorito de sodio

Se adaptó una solución de hipoclorito de sodio para la desinfección de explantes, debido a que las hojas de *Moringa oleifera* son pequeñas y delgadas, por lo tanto, pueden ser dañadas con mayor facilidad; se realizaron cuatro pruebas de tratamiento con dicha solución, como se muestra en la Tabla 2 para determinar mediante prueba y error la concentración óptima en la cual los explantes no presentan alguna enfermedad, como clorosis o necrosis.

TABLA 2
TRATAMIENTOS PARA PRUEBA CON HIPOCLORITO DE SODIO

Concentración de NaClO	T	Tratamientos	Concentración de Antioxidantes	
			Ácido Ascórbico	Ácido Cítrico
4%	20 min	10	0.03 g. /200ml	0.02 g./200ml
4%	10 min	10	0.03 g. /200ml	0.02 g./200ml
2%	20 min	10	0.03 g. /200ml	0.02 g./200ml
2%	10 min	10	0.03 g. /200ml	0.02 g./200ml



Medio de cultivo

Se prepararon tres diferentes medios de cultivo, donde se utilizaron 21.2 g/ 500 ml de medio basal Murashige y Skoog (SIGMA- ALDRICH ®), 2 gL⁻¹ de Phytigel, y se les adicionó un antibiótico distinto en cada medio, variando su concentración, como se muestra en la Tabla 3. El pH se ajustó a 5.7 3 5.8 con ácido clorhídrico 1N y con hidróxido de sodio 1N. Se prepararon 500 ml de medio de cultivo para cada sistema, del cual se dosificaron 50 ml en diez frascos de vidrio de 150 ml; posteriormente, los frascos fueron esterilizados en una olla de presión Presto de aluminio, a 120 °C, durante 20 minutos.

TABLA 3
CONCENTRACIONES DE TRATAMIENTO DE ANTIBIÓTICOS.

	Sistemas de 500 ml								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Medio MS (g)	21.2	21.2	21.2	21.2	21.2	21.2	21.2	21.2	21.2
Cefuroxima (ppm)	250	400	500	-	-	-	-	-	-
Lincomicina (ppm)	-	-	-	250	400	500	-	-	-
Clindamicina (ppm)	-	-	-	-	-	-	200	400	500
Phytigel (g)	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Frascos totales	10	10	10	10	10	10	10	10	10

Los experimentos realizados con lincomicina y clindamicina fueron variados en gotas, debido a la falta de material, por lo tanto, se añadió una gota para 250 ppm, dos gotas para 400 ppm y tres gotas para 500 ppm de ambos antibióticos.

Siembra de explantes

Los explantes de hojas y peciolo que fueron enjuagados con la solución de antioxidantes se tomaron con pinzas de bisección estériles y se colocaron dentro de los frascos con medio de cultivo estéril, cuidando el no dañar al medio de cultivo ni al tejido vegetal; los frascos fueron tapados y sellados con parafilm (Laboratory Film).

Todo el material utilizado para sembrar, fue previamente esterilizado a 120 °C durante 20 minutos en una olla de presión Presto de aluminio, esto para evitar la contaminación en el medio de cultivo.

Condiciones de incubación

Los frascos fueron incubados a temperatura ambiente, expuestos a un fotoperiodo constante con lámparas fluorescentes blancas frías, a 8,86 m mol⁻¹ m⁻² PAR, durante 21 días, para verificar el crecimiento de células dediferenciadas en los explantes de *Moringa oleífera*.

RESULTADOS

Técnica aséptica

Se efectuaron cuatro tratamientos con solución de hipoclorito de sodio, a diferentes concentraciones y tiempos de acción sobre los explantes de Moringa, posteriormente se realizaron enjuagues con una solución de antibióticos; esto para contrarrestar el daño causado por el hipoclorito de sodio y por la solución de etanol, disminuyendo radicales que hayan quedado libres con la acción anterior; esto se muestra en la Tabla 4.

TABLA 4
PORCENTAJE DE TRATAMIENTOS DAÑADOS POR HIPOCLORITO DE SODIO.

Porcentaje	Tiempo	Concentración de Antioxidantes g/200 mL		Tratamientos (No. Frascos)	Porcentaje de clorosis o necrosis en los tratamientos
		Ácido Ascórbico	Ácido Cítrico		
1) 4%	20min.	0.03	0.02	10	100%
2) 4%	10 min.	0.03	0.02	10	70%
3) 2%	20 min.	0.03	0.02	10	20%
4) 2%	10 min.	0.03	0.02	10	0%

Por lo tanto, se observó que los explantes dañados presentaron clorosis, debido a que iniciaron a tornarse amarillentos y traslucidos, sin embargo, no se tuvo la presencia de necrosis en los mismos.

En los tratamientos con concentración al 4% los explantes de moringa tuvieron un mayor daño, en comparación con los expuestos a la concentración de 2%; el primer tratamiento se estableció con un tiempo de acción de 20 minutos, en donde se produjo un daño total en los explantes cultivados *in vitro*, con las características antes mencionadas; el segundo, con un tiempo de 10 minutos, el daño a los explantes disminuyó un 30%; por el contrario, en los tratamientos con una concentración del 2%, decreció notablemente la presencia de clorosis; así, los tratamientos con un tiempo de 20 minutos de acción mostraron un 20% de hojas amarillentas y traslucidas, y en los tratamientos con duración de 10 minutos, se obtuvo un comportamiento favorable, ya que las hojas y peciols seguían manteniendo su color y no presentaron cambios. Por lo

tanto, se utilizó una solución de hipoclorito de sodio al 2%, puesto que es la concentración donde hubo ausencia de clorosis en los explantes, como lo señala el artículo escrito por Posada Pérez, L. *et al.* (2004).

Acción antibiótica en cultivo *In vitro* de *Moringa oleífera*.

Se cultivaron hojas y peciolo como explantes de *Moringa oleífera*, con la acción de tres diferentes antibióticos (lincomicina, clindamicina y cefuroxima), con los cuales se realizaron 10 tratamientos de cada uno y se dejaron actuar durante 20 días, con los siguientes resultados.

TABLA 5
OBTENCIÓN DE CALLOS EN TRATAMIENTOS *IN VITRO* DE *MORINGA OLEÍFERA*.

	Antibióticos	Concentraciones		
		250 ppm (1 gota)	400 ppm (2 gotas)	500 ppm (3 gotas)
	Lincomicina	20%	40%	0%
	Clindamicina	90%	70%	0%
	Cefuroxima	20%	0%	0%

El antibiótico clindamicina es un derivado de la lincomicina; ambos pertenecen al grupo de las lincosamidas, lo cual explica el por qué las dos mostraron una mayor presencia de callos, en comparación con la cefuroxima, que pertenece al grupo de las cefalosporinas.

Acción con lincomicina

Los tratamientos con Lincomicina presentaron una mayor formación de células dediferenciadas, a una concentración de 400 ppm, el doble de lo producido a menor concentración (250 ppm); en cambio, la concentración de 500 ppm, no mostró presencia de callos y el explante cobró una tonalidad amarillenta y sin rigidez en su consistencia (ver Tabla 5).

Acción con clindamicina

Los tratamientos con clindamicina ofrecieron una excelente adaptación, al darse una estimulación en la generación de células ápices (raíces y callos) en los extremos de los explantes con un 90% de producción en los frascos, a una concentración de 250 ppm; asimismo, se obtuvo un 70% de producción de callos en los frascos, a una concentración de 400 ppm, sin embargo, a 500 ppm no hubo presencia de callos, aunque en los meristemas se apreciaba la presencia diminuta de una masa amorfa, de color amarillento y, por consiguiente, las hojas también fueron invadidas (Figura 5).

Acción con cefuroxima

En los tratamientos realizados con cefuroxima se obtuvieron únicamente dos frascos con crecimiento de células apicales, a una concentración de 250 ppm, ya que las hojas y peciolo se encontraban con un tono amarillento-transparente.

DISCUSIÓN

Acción antibiótica

La producción de callos de *Moringa oleifera* fue estimulada por los tres antibióticos embebidos en cada medio de cultivo. La adición de clindamicina produjo un mayor brote de callos a una concentración de 250 ppm y de 400 ppm, seguido de lincomicina a 400 ppm; de igual forma, se observó un crecimiento nulo a 500 ppm en los tres tratamientos con diferentes antibióticos, y una baja producción de callos en el tratamiento con cefuroxima a una concentración de 250 ppm. Por lo anterior, se comprueba que los antibióticos podrían ser utilizados como reguladores de crecimiento, debido a que estimulan la proliferación de células dediferenciadas, como lo menciona Turrialba Catie (1987), quien explica la existencia compuestos generalmente sintéticos que actúan como reguladores de crecimiento, debido a que retrasan o inhiben los procesos fisiológicos o bioquímicos, como los antibióticos. En este caso, se utilizan dos grupos de antibióticos, el primero son las lincosamidas (clindamicina y la lincomicina) la cuales actúan inhibiendo la síntesis proteica de la células, afectando a los ribosomas, aunque aún se desconoce el mecanismo de acción, el cual favorece la generación de



células dediferenciadas; en estudios realizados han demostrado que existen antibióticos que también poseen la capacidad de inhibir la síntesis proteica que estimulan la generación de callos, como es el caso del cloranfenicol, descrito por Bhau, B. y Wakhlu, A., 2001, quienes señalan que al adicionar 100 mg de cloranfenicol en el medio de cultivo, se favoreció la callogénesis. Así también, se observa que de las dos lincosamidas utilizadas, la clindamicina tuvo un mayor efecto, debido a que la clindamicina es un compuesto derivado de la lincomicina, ya que dicho compuesto se mejoró adicionando cloro, en vez de un grupo hidroxilo (Sanchez, L., *et al.*, 2004); por ello, se supone que el cloro actúa provechosamente en el crecimiento de la *Moringa oleífera*. Von Uexkull, H.R. (1991) menciona que las plantas absorben el cloro de forma rápida y que es utilizado en la activación de enzimas y logrando un mayor beneficio en el crecimiento de la planta.

El segundo, son las cephalosporinas (Cefuroxima) que ofrecen una baja producción de células de 250 ppm y no muestran crecimiento a 400 y 500 ppm, por lo tanto, se define que tienen un efecto inhibitorio en el desarrollo de la *Moringa oleífera* a concentraciones arriba de 250 ppm. No obstante, estudios realizados anteriormente, demuestran que algunos β -lactámicos son estimuladores en el crecimiento de células dediferenciadas. Borrelli, G. y colaboradores, en 1992, mencionaron que la adición de cefotaxima a 50 ppm y 100 ppm aumentó el crecimiento de la planta de creso, y que al adicionar 200 ppm de cefotaxima en el medio de cultivo, se tuvo un efecto tóxico para la planta, Con lo anterior, podemos definir que la cefuroxima tiene una mayor producción de callos a una concentración menor de 200 ppm, ya que el crecimiento se inhibe al aumentar la concentración. Por otro lado, Honford, P. y Newbury, H., 1992, mencionan que tanto la penicilina, como la carbenicilina son compuestos β -lactámicos, los cuales generaron un aumento en la producción de callos a 250 ppm, incluso mayor que el tratamiento control; así también, analizaron sus estructuras moleculares y definieron que en la descomposición de estos antibióticos, se obtiene PAA de la bencil penicilina y PAA o PMA de la cabenicilina, aumentando la concentración de auxinas en el medio, estimulando el crecimiento celular, ya que las auxinas son consideradas como reguladoras naturales de crecimiento en las plantas, que en conjunto con las citocininas (hormonas naturales en plantas) inducen la elongación de tallos, promueven la división celular y cuando hay una mayor concentración de auxinas que de citocininas en el medio, se promueve la generación de callos; por lo tanto, en el trabajo escrito por Honford, P. y Newbury, H. (1992) se obtuvo una mayor formación de células dediferenciadas en el medio a concentraciones altas de estos antibióticos.

Se requieren más estudios para comprobar si existen otros antibióticos que al descomponer su estructura, forman auxinas o algún otro regulador de crecimiento que justifique que los antibióticos estimulan el crecimiento de células dediferenciadas, sin la necesidad de utilizar hormonas.

CONCLUSIONES

En la técnica aséptica, los explantes de *Moringa oleífera* no mostraron necrosis. Se utilizó el tratamiento 4 con una concentración al 2% de hipoclorito de sodio, con un tiempo de acción de 10 minutos, el cual ofreció excelentes resultados, ya que los diez tratamientos estuvieron en ausencia de clorosis y necrosis; en cambio, los tratamientos a una concentración del 4% provocaron un mayor daño a los explantes, debido a la presencia de clorosis, siendo el tratamiento 1 el que presentó clorosis en su totalidad.

La adición de antibióticos en el medio de cultivo para la generación de callos en la *Moringa oleifera* mostró que de los tres antibióticos utilizados, la clindamicina produjo una mayor actividad estimulante, aunque se desconoce su mecanismo de acción en el crecimiento de células dediferenciadas, pero se podría deducir que posiblemente brinda una mayor facilidad en la absorción y acción, debido al cloro que contiene en su estructura, ya que es considerable la diferencia en la producción de callos entre la clindamicina y lincomicina. Asimismo, se generó un bajo número de brotes de callos con la cefuroxima, debido a que a concentraciones mayores de 200 ppm se inhibe el crecimiento de las células dediferenciadas de *Moringa oleifera*.



Fotografías

<https://inci.guide/plant-extracts-derivatives/moringa-oleifera-seed-extract>

<https://pixabay.com/es/photos/planta-moringa-oleifera-2307261/>

<https://www.istockphoto.com/es/foto/sales-de-ba%C3%B1o-gm153502384-17013681>

<https://www.istockphoto.com/es/foto/sales-de-ba%C3%B1o-gm153502384-17013681>

<https://www.istockphoto.com/es/foto/sales-de-ba%C3%B1o-gm153502384-17013681>

Referencias

- Anwar, F.; Latif, S.; Ashraf, M., y Gilani, A.H. (2007). "Moringa oleifera: A Food Plant with Multiple Medicinal Uses". *Phytotherapy Research*. (21): 17-25. DOI: 10.1002/ptr.2023.
- Barbosa Cepeda, I. D. y Chaparro Giraldo, A. (2011). Concentración mínima inhibitoria de higromicina b en callos embriogénicos de arroz (*Oryza sativa L.*). *Revista Colombiana de Biotecnología* (13)2: 193 - 198.
- Bhau, B.S., Wakhlu, A.K. (2001). "Effect of some antibiotics on the in vitro morphogenetic response from callus cultures of caryophantho elephantidens". *Biología Plantarum*.44:1:19-24.
- Bonal Ruiz, R.; Rivera Odio, R.M., y Bolívar Carrión, M. E. (2012). "Moringa oleifera: una opción saludable para el bienestar". *Medisan*. 1596-1599.
- Borrelli, G.M.; Difonzo, N. and Lupotto, E. (1992). "Efecto de la cefotaxima sobre el cultivo de callos y la regeneración de plantas en trigo duro". *Revista de Fisiología Vegetal*. 140(3):372-374.
- Calva, G. y Pérez, J. (2005). "Cultivo de células y tejidos vegetales: fuente de alimentos para el futuro". *Revista Digital Universitaria*. 6(11): 2-16.
- Marfori, E.C. (2010). "Clonal Micropropagation of *Moringa Oleifera L. Philippine*". *Agricultural Scientist*. 93(4): 454-457.
- Holford, P. and Newbury, H.J. (1992). "The effects of antibiotics and their breakdown products on the in vitro growth of *Antirrhinum majus*". *Plant Cell Reports*. 11: 93-96.
- Magaña, M. Developing a standardized in vitro sterilization method for field-grown *Moringa Oleifera* explants (Bachelor thesis) (2016) Department of Science Faculty of Science and Technology University of Belize, Belize.
- Muñoz, J. (2015). Desarrollo de un sistema de propagación *in vitro* y transformación genética en plantas de *Moringa Oleifera Lam*). Tesis de Maestría. Universidad Autónoma de Aguascalientes, Aguascalientes.
- Nieves, M.C., y Aspuri, E.T. (2011). "Callus Induction in Cotyledons of *Moringa Oleifera Lam*". *Philipp Agric Scientist*. 94:3: 239-247.
- Pérez, A.; Sánchez, T., Armegol, N., y Reyes, F. (2010). "Características y potencialidades de *Moringa Oleifera*. Lamark. Una alternativa para la alimentación animal". *Pastos y Forrajes*. 33:4.
- Posada Pérez, Laisyn; Gómez Kosky, Rafael; Gallardo Colina, Jorge; Reyes Vega, Maritza, y Herrera Ofarril, Idalia. (2004). "Establecimiento *in vitro* de ápices de plantas de campo híbrido cubano de papaya IBP 42-99". *Biología Vegetal*. 4:3:153- 58.
- Rodríguez, N.; Zárata, A., y Nilo, V. (2016). "Desarrollo de un protocolo para la micropropagación clonal de *Moringa (Moringa Oleifera)*". *Memorias Congreso Internacional Agroalimentario*, 1139- 1159.
- Sánchez, L.; Sáenz, E.; Pancorbo, J.; Lanchipa, P., y Zegarra Del Carpio, R. (2004). "Antibióticos sistémicos en dermatología: Segunda parte: Tetraciclinas, lincosaminas, fluoroquinolonas, sulfonamidas, rifamicinas, cloranfenicoles, ácido fusídico, metronidazol y nuevos antibióticos". *Systemic Antibiotics in Dermatology*. 14: 3: 161- 179.
- Swati Gupta, Jain R.; Kachhwaha, S. & Kothari, S. L. (2018). "Nutritional and medicinal applications of *Moringa Oleifera Lam.*—review of current status and future possibilities". *Journal of Herbal Medicine (11)1-11*. <https://doi.org/10.1016/j.hermed.2017.07.003>
- Tabio, D.; Díaz, Y.; Rondón, M., y Fernández, E. (2018). "Proceso de extracción de aceite de semillas de *Moringa Oleifera*". *Investigación y Ciencia*. 26(74) 32-38
- Turrialba, Catie (1987). *Memoria del Curso de Cultivo de Tejidos*. Costa Rica.
- Von Uexkull, H. R. (1991). "El cloro en la nutrición de la palma aceitera". *Informaciones Agronómicas*. No. 24