



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**Micropropagación de *Thaumatococcus*
xanadu (Croat, Mayo & J. Boos) Sakur.,
Calazans & Mayo, vía organogénesis
directa**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIOLÓGICA

P R E S E N T A
ANA CLAUDIA CANO BOLAÑOS

ASESORA

Ing. TERESA DE JESÚS OLIVERA FLORES



Ciudad Universitaria, CD. MX., 2024



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO



**PROTESTA UNIVERSITARIA DE INTEGRIDAD Y
HONESTIDAD ACADÉMICA Y PROFESIONAL
(Titulación o Graduación con trabajo escrito)**

De conformidad con lo dispuesto en los artículos 87, fracción V, del Estatuto General, 68, primer párrafo, del Reglamento General de Estudios Universitarios y 26, fracción I, y 35 del Reglamento General de Exámenes, me comprometo en todo tiempo a honrar a la Institución y a cumplir con los principios establecidos en el Código de Ética de la Universidad Nacional Autónoma de México, especialmente con los de integridad y honestidad académica.

De acuerdo con lo anterior, manifiesto que el trabajo escrito titulado Micropropagación de *Thaumatococcus xanadu* (Croat, Mayo & J. Boos) Sakur., Calazans & Mayo, vía organogénesis directa que presenté para obtener el título/grado de Química Farmacéutica Biológica, es original, de mi autoría y lo realicé con el rigor metodológico exigido por la Facultad de Química, citando las fuentes de ideas, textos, imágenes, gráficos u otro tipo de obras empleadas para su desarrollo.

En consecuencia, acepto que la falta de cumplimiento de las disposiciones reglamentarias y normativas de la Universidad, en particular las ya referidas en el Código de Ética, llevará a la nulidad de los actos de carácter académico administrativo del proceso de titulación/graduación.

Atentamente

Ana Claudia Cano Bolaños
315201332

(Nombre completo, firma y número de cuenta)

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: M. en C. Raquel Ortega Muñoz
VOCAL: Ing. Teresa De Jesús Olivera Flores
SECRETARIO: Dr. Edgar Ricardo Vázquez Martínez
1er. SUPLENTE: Dr. Alberto García Lozano
2° SUPLENTE: Dra. María Elena Ibarra Rubio

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

Departamento de Bioquímica, Laboratorio 116 Cultivo de Tejidos Vegetales,
Conjunto E, Facultad de Química, UNAM.

ASESOR DEL TEMA:



Ing. Teresa de Jesús Olivera Flores

SUSTENTANTE:



Ana Claudia Cano Bolaños

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS	3
ÍNDICE DE TABLAS	6
ÍNDICE DE GRÁFICAS	8
ABREVIATURAS	9
I. INTRODUCCIÓN	10
II. ANTECEDENTES	12
2.1 Aspectos generales de <i>Thaumatococcus xanadu</i>	12
2.1.1 Clasificación taxonómica	12
2.1.2 Descripción botánica	12
2.1.3 Distribución geográfica	14
2.1.4 Condiciones de crecimiento	14
2.1.5 Importancia económica	15
2.2 Cultivo de Tejidos Vegetales	16
2.2.1 Medio de cultivo	16
2.2.1.1 Componentes inorgánicos y orgánicos del medio de cultivo	16
2.2.1.2 Fuente de carbono	17
2.2.1.3 Reguladores de crecimiento vegetal	18
2.2.1.4 Agentes de soporte	19
2.2.2 Condiciones de incubación	20
2.3 Morfogénesis <i>in vitro</i>	21
2.3.1 Organogénesis directa	21
2.3.2 Organogénesis indirecta	21
2.4 Micropropagación	22
2.4.1 Ventajas y desventajas de la micropropagación	24
2.5. Establecimiento aséptico y regeneración <i>in vitro</i> de <i>Thaumatococcus xanadu</i>	25

III. OBJETIVOS	30
3.1 General	30
3.2 Particulares	30
IV. MATERIALES Y MÉTODOS	31
4.1 Material biológico	32
4.2 Aspectos Generales	32
4.2.1 Preparación de medios de cultivo	32
4.3 Etapa 0. Selección y mantenimiento de las plantas madre	34
4.4 Etapa I. Establecimiento aséptico de cultivos	35
4.5 Etapa II. Multiplicación	42
4.6 Etapa III. Elongación y enraizamiento	43
4.7 Etapa IV. Aclimatización	44
V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	45
5.1 Etapa 0. Selección y mantenimiento de las plantas madre	45
5.2 Etapa I. Establecimiento de los cultivos asépticos	46
5.3 Etapa II. Multiplicación	58
5.4 Etapa III. Elongación y enraizamiento	62
5.5 Etapa IV. Aclimatización:	69
5.6 Cronograma de la micropropagación de <i>T. xanadu</i>	72
VI. CONCLUSIONES	73
VII. PERSPECTIVAS	75
VIII. REFERENCIAS	76
IX. ANEXOS	82

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Planta de <i>Thaumatococcus xanadu</i> cultivada en el estado de Morelos y mantenida bajo condiciones de invernadero	13
Figura 2.	Detalles de las hojas lobuladas de <i>T. xanadu</i>	13
Figura 3.	Distribución geográfica de <i>T. xanadu</i> . Plants of the World Online. Kew Backbone Distributions [Fotografía]. Consultado el 26 de enero de 2023, en https://powo.science.kew.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:77178495-1#distributions	14
Figura 4.	Diagrama general del proceso de micropropagación de <i>T. xanadu</i> .	31
Figura 5.	Plantas de <i>Thaumatococcus xanadu</i> correspondiente al A) primer lote, B) segundo lote, ambas cultivadas en el Estado de Morelos.	32
Figura 6.	Planta madre de <i>T. xanadu</i> correspondiente al segundo lote	34
Figura 7.	Brote individualizado junto con una porción del rizoma de la planta.	35
Figura 8.	Planta madre de <i>T. xanadu</i> retirada del sustrato y con sus raíces expuestas.	35
Figura 9.	Rizoma de la planta posterior al lavado con agua y jabón.	36
Figura 10.	Ápice individualizado con una pequeña porción del rizoma.	36
Figura 11.	Ápices individualizados y colocados en una solución antioxidante para su posterior desinfección.	36
Figura 12.	Tipos de explantes; A) Explante de rizoma disectado, B) Explante de ápice, ambos sembrados en el medio Ph-2, posterior a 4 días de su cultivo	39
Figura 13.	Brotes individualizados con aprox. 1 cm de alto	42
Figura 14.	A) Cúmulos de brotes múltiples después de 6 semanas (2 subcultivos) en el medio 2 (MS con 2 mg BAP), B) Disección de los brotes múltiples para su elongación en un medio MS con AG ₃ .	43

Figura 15.	Plantas de <i>T. xanadu</i> . A y C, antes del tratamiento fitosanitario y de fertilización, B y D, después de dos meses de tratamiento fitosanitario y de fertilización. A-B) Corresponden al primer lote, C-D) Corresponden al segundo lote.	45
Figura 16.	Explantos contaminados por hongos, posterior a 7 días de su cultivo en el medio correspondiente, A) Rizoma con un hongo de aspecto grisáceo, B) Ápice con un hongo de aspecto blanquecino.	50
Figura 17.	Yemas asépticas de <i>T. xanadu</i> , correspondientes al cuarto tratamiento de desinfección y posterior a 7 días de su cultivo en el medio Ph-2 (MS con 2 mg/L de BAP).	51
Figura 18.	Escala de oxidación de explantes de rizoma y ápice (E) de <i>T. xanadu</i> posterior a 21 días de su cultivo en el medio correspondiente. A) Corresponde a <10% de oxidación del rizoma, B) 10-20%, C) 20-40%, D) 40-60%, E) 60-80% y F) 80-100% del tejido.	52
Figura 19.	Tipos de callos observados en explantes de rizoma posterior a 14 días, A) Rizoma con callo duro de color blanco en medio Ph-4, B) Rizoma con callo friable de color verde o ligeramente amarillo en el medio Ph-3.	55
Figura 20.	Respuesta morfogénica de los ápices de <i>T. xanadu</i> , de acuerdo con el medio de cultivo correspondiente. A, C, E, G) Corresponde a los 7 días de su cultivo. B, D, F, H) Corresponde a los 14 días de su cultivo.	56
Figura 21.	Brotos regenerados después de 3 semanas en el medio de cultivo correspondiente. A) Control, B) Medio 1 con 1 mg/L de BAP, C) Medio 2 con 2 mg/L de BAP y D) Medio 3 con 1 mg/L de BAP + 1 mg/L de Kinetina.	60

Figura 22.	Brotos regenerados posterior a 3 subcultivos (9 semanas), observados bajo un microscopio estereoscópico, A) Brotos en el medio de cultivo 1 con 1 mg/L de BAP, B) Brotos en el medio 2 con 2 mg/L de BAP, y C) Brotos en el medio 3 con 1 mg/L de BAP + 1 mg/L de Kinetina.	61
Figura 23.	Brotos provenientes del medio de cultivo 2, posterior a 3 semanas en el medio para su elongación.	63
Figura 24.	Detalles de las raíces de una planta regenerada de manera <i>in vitro</i> , proveniente del medio 3 (1 mg/L de BAP + 1 mg/L de Kinetina).	67
Figura 25.	Elongación de los brotos provenientes de los 4 medios de cultivo; control, 1, 2 y 3.	68
Figura 26.	Plantas de <i>T. xanadu</i> provenientes de los cuatro medios de cultivo y posterior a 14 semanas en la Etapa III, previo a la Etapa IV. Acclimatización. A) Planta proveniente del medio control, B) Planta proveniente del medio 1, C) Planta proveniente del medio 2, D) Planta proveniente del medio 3.	69
Figura 27.	Plantas aclimatizadas de <i>T. xanadu</i> . A y B) Sustrato de tierra negra y agrolita (2:1), A) 24 h posterior del pase a suelo, B) Un mes después del pase a suelo, C y D) Sustrato de agrolita, C) 24 h posterior al pase a suelo y D) Un mes después del pase a suelo.	71
Figura 28.	Cronograma de la micropropagación de <i>T. xanadu</i> .	72

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Procedimientos de desinfección empleados para el establecimiento aséptico de diferentes especies de <i>Thaumatococcus</i> (<i>Philodendron</i>).	25
Tabla 2.	Propagación <i>in vitro</i> de diferentes especies de <i>Thaumatococcus</i> (<i>Philodendron</i>) por medio de la vía regenerativa organogénesis directa.	27
Tabla 3.	Composición por litro del medio basal empleado en la Etapa I, II y III de la micropropagación de <i>T. xanadu</i> .	33
Tabla 4.	Tratamientos de desinfección.	37
Tabla 5.	Concentración de NaOCl empleada en el laboratorio con el 100% (v/v) y concentración real con 6% (v/v) de NaOCl.	39
Tabla 6.	Tratamientos de desinfección aplicados a explantes que presentaron contaminación después de la primera desinfección.	40
Tabla 7.	Composición por litro de los medios de cultivo empleados para la Etapa I. Inducción.	41
Tabla 8.	Composición por litro de los medios de cultivo empleados para la Etapa II.	42
Tabla 9.	Fertilización de las plantas <i>T. xanadu</i> en la Etapa IV. aclimatizadas bajo condiciones de invernadero.	44
Tabla 10.	Número de brotes por explante \pm desviación estándar después de 12 semanas en el medio de cultivo correspondiente. Letras distintas (^a) indican diferencias significativas.	59
Tabla 11.	Parámetros de evaluación; Altura, no. de hojas y no. de raíces por planta \pm desviación estándar después de 6 semanas en el medio de cultivo para elongación. Medias con letras iguales (^a) en una columna no son estadísticamente diferentes.	65

Tabla 12.	Tamaño de las raíces de acuerdo con 3 categorías: pequeñas, medianas y grandes, posterior a 6 semanas de cultivo en el medio para elongación.	66
Tabla 13.	Parámetros de evaluación; Altura, no. de hojas y no. de raíces por planta \pm desviación estándar después de 8 semanas en el medio de cultivo con sales MS al 50% y sin RCV. Medias con letras iguales (^a) en una columna no son estadísticamente diferentes.	67

ÍNDICE DE GRÁFICAS

Gráfica 1.	Porcentaje de asepsia de explantes de rizoma y ápices de <i>T. xanadu</i> a los siete y catorce días posterior a la siembra en el medio de cultivo correspondiente.	47
Gráfica 2.	Porcentaje de oxidación de los explantes de rizoma y ápices, correspondiente al primer y segundo tratamiento de desinfección, posterior a 14 días de su cultivo.	53
Gráfica 3.	Respuesta morfogénica de explantes de rizoma y ápices, de acuerdo con el medio de cultivo y posterior a 14 días de su cultivo.	54
Gráfica 4.	Número de brotes totales de acuerdo con el medio de cultivo correspondiente	58
Gráfica 5.	Elongación de los brotes durante 6 semanas en el medio de cultivo para elongación, provenientes del medio de cultivo control, 1, 2 y 3.	62
Gráfica 6.	Número de hojas por explante durante 6 semanas en el medio de cultivo para elongación, provenientes del medio de cultivo control, 1, 2 y 3.	64
Gráfica 7.	Número de raíces por explante durante 6 semanas en el medio de cultivo para elongación, provenientes del medio de cultivo control, 1, 2 y 3.	64

ABREVIATURAS

AG ₃	Ácido giberélico
AIA	Ácido indol-3-acético
AIB	Ácido indol-3-butírico
ANA	Ácido α-naftalenacético
BAP	6-Bencilaminopurina
CO ₂	Dióxido de carbono
CTV	Cultivo de Tejidos Vegetales
MS	Medio de cultivo Murashige & Skoog
NaOCl	Hipoclorito de sodio
PVP	Polivinilpirrolidona
RCV	Regulador de Crecimiento Vegetal
TDZ	Thidiazuron
mm	milímetro
cm	centímetro
cm ²	centímetro cuadrado
cm ³	centímetro cúbico
m	metro
mL	mililitro
L	litro
mg	miligramo
g	gramo
Kg	kilogramo
°C	grados Celsius
mdp	millones de pesos
PIB	Producto Interno Bruto

I. INTRODUCCIÓN

El género *Thaumatococcus*, anteriormente conocido como *Philodendron*, es el segundo miembro más grande de la familia Araceae (Mayo *et al.*, 1997). Los filodendros, como comúnmente se conocen, se caracterizan por el atractivo de sus hojas, las cuáles, en el caso de *T. xanadu* son lobuladas y de color verde brillante, lo que le ha permitido ser parte del paisajismo en interiores e incluso en arreglos florales, aumentando la demanda de plantas de este género, posicionándolas dentro de la diez más populares.

Existen métodos convencionales por el cual puede propagarse este tipo de especies, como serían los esquejes de tallo, sin embargo, es un proceso lento, el cual genera un bajo número debido a los pocos esquejes que se pueden obtener por planta. Aunado a eso, este género presenta savia que puede generar dermatitis de contacto (Chen *et al.*, 2012).

En México, los principales productores de plantas ornamentales se encuentran en el Estado de México y Morelos, siendo el FIRA (Fideicomisos Instituidos en Relación con la Agricultura) el principal proveedor de plantas de este género. Sin embargo, en el año 2018, esta institución dejó de proveerlos, generando un gran desabasto en ambas regiones (comunicación directa con la Ingeniera María Hortensia Cerón). Esto generó la búsqueda de otras alternativas e instituciones capaces de producir una alta cantidad de plantas para cubrir con sus demandas. Una de estas alternativas es el uso de Cultivo de Tejidos Vegetales.

El Cultivo de Tejidos Vegetales es una herramienta biotecnológica que, entre sus usos, se encuentra la propagación *in vitro* de manera masiva e intensiva, mejor conocida como *micropropagación*, la cual, en comparación con los métodos tradicionales, es capaz de generar plantas en un menor tiempo y espacios reducidos, además, permite la generación de plantas genéticamente homogéneas y libres de patógenos.

Desde un punto de vista comercial, la micropropagación, ha tomado gran relevancia en países como Estados Unidos, Holanda, Alemania, Inglaterra, Japón, etc., pues ha generado grandes beneficios económicos, sociales y ambientales. Algunas

especies que han sido micropropagadas por esta técnica son la *Vanilla planifolia*, *Solanum tuberosum*, *Phalaenopsis spp* y *Agave salmiana*, solo por mencionar algunas (González *et al.*, 2012).

Hasta el día de hoy, la literatura que se encuentra disponible acerca de la micropropagación de esta especie es escasa, sin embargo, se ha empleado el Cultivo de Tejidos Vegetales (CTV) con éxito para micropropagar otras especies del mismo género tales como: *T. corcovadense* (Blanco & Valverde, 2004), *T. Imperial Green, Red, Rainbow* (Chen *et al.*, 2012), *T. bipinnatifidum* Schott ex Endl. (Alawaadh *et al.*, 2020) y *T. xanadu* (Lara-Ascencio *et al.*, 2021, 2023), sin embargo, éste último no muestra todas las etapas de la micropropagación.

Con base en lo anterior, el presente trabajo tuvo como objetivo general diseñar un protocolo para la micropropagación de *Thaumatococcus xanadu*. Para lograr el cumplimiento del objetivo, se establecieron diferentes ensayos conforme a las etapas de la micropropagación, lográndose la regeneración de *Thaumatococcus xanadu* vía organogénesis directa, definiendo el proceso para cada una de las Etapas 0 – IV. Finalmente, se logró contar con un protocolo accesible y rentable para que en un futuro se logre producir esta especie en el laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales del Conjunto E, de la Facultad de Química.

II. ANTECEDENTES

2.1 Aspectos generales de *Thaumatophyllum xanadu*

2.1.1 Clasificación taxonómica

Philodendron xanadu, es el basiónimo de *Thaumatophyllum xanadu* el cual fue publicado por primera vez en *Airodeana- International Aroid Society* por Croat *et al.* en el año 2002. Más tarde, para el año 2018 Sakuragui *et al.*, reportaron su reclasificación nombrandola *Thaumatophyllum xanadu*. Por lo que, es correcto referirnos a esta especie por ambos nombres, siendo actualmente el más común, *Philodendron xanadu*.

De acuerdo con el Índice Internacional de Nombres de Plantas (IPNI, por sus siglas en inglés), la clasificación taxonómica de *Thaumatophyllum xanadu* es la siguiente:

Reino	Plantae
Phylum	Tracheophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Alismatales
Familia	Araceae
Género	<i>Thaumatophyllum</i>
Especie	<i>Thaumatophyllum xanadu</i>

(International Plant Names Index [IPNI], 2023)

2.1.2 Descripción botánica

Thaumatophyllum xanadu (Figura 1), es una planta ornamental que puede alcanzar hasta 1.5 m de diámetro por 1.5 m de longitud, se caracteriza por tener láminas pinnatisectas de color verde oscuro brillante, con una longitud de 25-31 cm por 17-25 cm de diámetro, ambas mitades de las láminas se encuentran dirigidas hacia arriba en un ángulo de 20-30° con respecto a la nervadura central, presenta lóbulos laterales primarios, usualmente 10 de cada lado, débilmente falcados hacia el ápice y ligeramente redondeados (Figura 2), presenta peciolo envainados de 3.5-5.5 cm de diámetro por 43-51 cm de largo, tallos de 1 m e incluso más, con entrenudos cortos de color marrón oscuro, de no más de 1.5 mm de largo y savia acre. Presenta raíces de 9-14 mm de diámetro de color rojizo-marón con fisuras longitudinales e

inflorescencia solitaria con un pedúnculo de 3.0-5.5 cm de longitud por 1.0-1.3 cm de diámetro, acompañada de una espata 12.8- 18 cm de longitud por 2.8-3.3 cm de diámetro, así como un espádice de 8.5-12.5 cm de largo, esta planta florece principalmente durante la primavera por un periodo de tiempo más corto en comparación con otras especies como *Thaumatophyllum bipinnatifidum*, anteriormente conocida como *Philodendron bipinnatifidum* (Croat et al., 2002).



Figura 1. Planta de *Thaumatophyllum xanadu* cultivada en el estado de Morelos y mantenida bajo condiciones de invernadero.

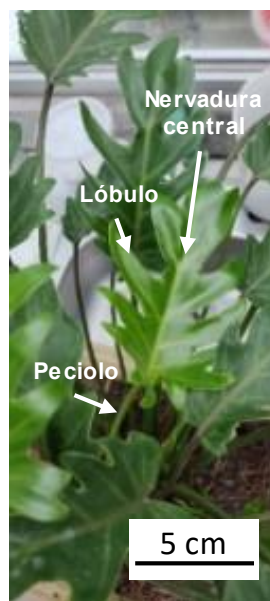


Figura 2. Detalles de las hojas lobuladas de *T. xanadu*

2.1.3 Distribución geográfica

Esta especie tiene una distribución nativa desde el sur de Brasil hasta Paraguay (Figura 3) (Plants of the World Online, 2023). Originalmente se creyó que ésta había surgido en un vivero en Australia, dándole el nombre de *Philodendron* 'Winterbourn'. En 1987, está fue introducida al mercado americano en donde se le otorgo una patente como un cultivo proveniente de *Philodendron selloum* (*P. bipinnatifidum*), sin embargo, más tarde encontraron que no tenía relación con esta especie. Así mismo, tampoco presentaron argumentos sobre su origen híbrido, debido a que era incapaz de ser polinizada por otras especies de *Philodendron*, por lo que se cree, se trató de un error a la hora del etiquetado de semillas (Croat *et al.*, 2002).



Figura 3. Distribución geográfica de *T. xanadu*. Plants of the World Online. Kew Backbone Distributions [Fotografía]. Consultado el 26 de enero de 2023, en <https://powo.science.kew.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:77178495-1#distributions>

2.1.4 Condiciones de crecimiento

Thaumatococcus xanadu crece principalmente en el bioma tropical (Plants of the World Online, 2023), por lo que para su cultivo requiere de luz solar indirecta con un rango de temperatura de 18-28 °C, siendo 23°C la temperatura óptima, una humedad de 50-70% y el suelo en el cual debe encontrarse debe tener un pH entre 5.6- 7.5, poroso y bien drenado (Mayers, 2023).

2.1.5 Importancia económica

Actualmente, en México existen 4,220 especies con potencial ornamental, de las cuales 3,434 son nativas y 786 introducidas. Su valor ornamental depende de la forma o estructura de la planta, las hojas o el follaje, las flores e inclusive los frutos y dependiendo del interés decorativo, estas cualidades tienen una temporalidad (Rendón & Neyra, 2020).

Para el año 2021, se tenía estimado que un millón 200 mil personas se dedicaban al cultivo y comercialización de la floricultura y plantas ornamentales. En México se siembran entre 22 mil y 23 mil hectáreas convirtiéndolo en el tercer país en el mundo con mayor superficie cultivable de ornamentales con 32 mil productores dedicados al cultivo de flores y plantas ornamentales, resaltando principalmente el Estado de Morelos y el Estado de México (Lino, 2021).

Se estima que la producción de plantas ornamentales en el estado de Morelos es de alrededor de 3,000 hectáreas con un valor de producción de alrededor de 1.2 millones de pesos (mdp) por hectárea al año, representando por lo menos el 30% del Producto Interno Bruto (PIB) agrícola de ese estado (Representación AGRICULTURA Morelos, 2020). Algunas especies como el *Philodendron* spp (*Thaumatopyllum*) son producidas de manera *in vitro* en el Centro de Desarrollo Tecnológico Tezoyuca, perteneciente a la oficina regional del Fideicomiso Instituido en Relación a la Agricultura (FIRA) (Ramírez-Rojas *et al.*, 2016). Sin embargo, para el día de hoy, no se cuenta con el material suficiente y necesario para cubrir con las demandas de los productores, lo que los ha orillado a buscar otras instituciones capaces de desarrollar el cultivo de tejidos vegetales (Lara-Ascencio *et al.*, 2023), pues tan solo en 1994, se había reportado la producción de más de 500 millones de plantas al año, empleando el CTV, mientras que para el año 2009, la producción aumento hasta más de mil millones de plantas, esto solo para especies ornamentales (González *et al.*, 2012).

2.2 Cultivo de Tejidos Vegetales

El Cultivo de Tejidos Vegetales (CTV) también conocido como cultivo *in vitro*, es una herramienta biotecnológica que permite el establecimiento, mantenimiento y la regeneración de plantas completas a partir de un explante, es decir, pequeñas porciones de tejidos, las cuales pueden provenir de hojas, raíces, tallos, pétalos, etc. Esta capacidad se debe a la totipotencialidad celular, un término que hace referencia a la capacidad que tienen las células vegetales para regenerar plantas completas a partir de células individuales o bien, de un grupo de células de un tejido u órgano, provenientes de una planta madre. Para ello, es necesario otorgarle de manera artificial las condiciones físicas (luz, temperatura) y químicas (medio de cultivo) necesarias para un buen desarrollo, bajo condiciones asépticas controladas (González *et al.*, 2012; Loberant & Altman, 2010; SAGARPA-CONADESUCA, 2017; Suárez, 2020)

2.2.1 Medio de cultivo

Un medio de cultivo tiene como finalidad aportar los nutrientes necesarios para lograr una respuesta morfogénica deseada, estimular la diferenciación y llevar a cabo el crecimiento de los tejidos vegetales *in vitro* (Sharry *et al.*, 2015).

En la literatura y de forma comercial existen numerosas formulaciones de medios de cultivo, sin embargo, uno de los medios de cultivo más utilizado es el medio de Murashige y Skoog (MS) el cual fue desarrollado para el crecimiento del callo del tabaco (George *et al.*, 2008). Actualmente es ampliamente usado para la propagación *in vitro* de muchas especies de plantas (Morales *et al.*, 2016).

2.2.1.1 Componentes inorgánicos y orgánicos del medio de cultivo

Los principales componentes de un medio de cultivo son los componentes inorgánicos; macronutrientes y micronutrientes, los orgánicos como vitaminas y aminoácidos, fuente de carbono, reguladores de crecimiento vegetal y agentes gelificantes, estos últimos solo en el caso de que se trate de medios de cultivo semisólidos (Sharry *et al.*, 2015).

En cuanto a los macronutrientes, se encuentran el carbono (C^{4+}), oxígeno (O^{2-}), hidrógeno (H^+), nitrógeno (N^{4+}), fósforo (P^{3+}), potasio (K^+), sodio (Na^+), magnesio (Mg^{2+}), azufre (S^{6+}) y calcio (Ca^{2+}), se les denomina de esta forma debido a que son elementos esenciales y son requeridos en grandes cantidades. Por otra parte, los micronutrientes son metales esenciales como el manganeso (Mn^{2+}), hierro (Fe^{2+}), zinc (Zn^{2+}), boro (B^{3+}), cobre (Cu^{2+}), cobalto (Co^{2+}) y molibdeno (Mo^{6+}), que son componentes de las proteínas de las células vegetales de importancia metabólica y fisiológica y son requeridos en menor cantidad, usualmente en orden de mg/L (George *et al.*, 2008). Tanto los macronutrientes como los micronutrientes se agregan a los medios de cultivo en forma de sales inorgánicas, con la finalidad de satisfacer las demandas de las células y lograr el crecimiento, desarrollo y diferenciación de los tejidos vegetales.

Los componentes orgánicos como las vitaminas y los aminoácidos benefician el crecimiento y morfogénesis del material vegetal, debido a que actúan como coenzimas. Entre las vitaminas más empleadas encontramos a la tiamina (vitamina B1), ácido nicotínico (niacina o vitamina B3) y la piridoxina (vitamina B6) y el myo-Inositol, si bien no es una vitamina sino una azúcar alcohol, presenta un efecto similar a la de una vitamina. Mientras que los aminoácidos, aun cuando no está bien demostrado que sean necesarios (Bhojwani & Dantu, 2013), son añadidos debido a que son una fuente efectiva e inmediata de nitrógeno en su forma reducida (NH_4^+), entre los más empleados encontramos la L-glicina, L-glutamina, L-asparagina, L-arginina y L-prolina, según Nitsch y Nitsch señalan que las formas L son más adecuadas para el CTV, ya que las formas D son tóxicas (Sharry *et al.*, 2015).

2.2.1.2 Fuente de carbono

En cuanto a la fuente de carbono, se ha demostrado que la mayoría de las plantas cultivadas de manera *in vitro* no pueden realizar la fotosíntesis debido a la baja calidad y cantidad de luz disponible en las cámaras de crecimiento, la ausencia de clorofila, cloroplastos poco desarrollados y el escaso intercambio de CO_2 , por lo que es necesario agregar una fuente de carbono necesaria para diversas actividades

metabólicas, así como fuente de energía y como agente osmótico. El carbohidrato más empleado es la sacarosa y se usa en una concentración de 2-5% (p/v) (Bhojwani & Dantu, 2013; George *et al.*, 2008).

2.2.1.3 Reguladores de crecimiento vegetal

Los reguladores de crecimiento vegetal (RCV) pueden formar parte de la formulación de un medio de cultivo pues, aunque los explantes producen algunos de ellos de manera endógena, es necesario su adición exógena para desencadenar y acelerar ciertas respuestas morfogénicas. El tipo y concentración de estos reguladores va a variar de acuerdo con la especie (Taiz & Zeiger, 2006), tipo de tejido y la etapa de cultivo en la cual se encuentra (inicio de callo, inducción de embriogénesis somática, multiplicación de brotes, etc.) (Bhojwani & Dantu, 2013).

Los reguladores de crecimiento vegetal se clasifican en cinco grupos:

1. **Auxinas:** Se encargan de controlar procesos básicos como la división y alargamiento celular, por lo que participan en la formación de meristemos, mientras que en las plantas completas se encargan de establecer y mantener la polaridad, la elongación de tallos y entrenudos, así como la dominancia apical y enraizamiento. Las auxinas más utilizadas son: el ácido indol-3-ácético (AIA), ácido indol 3-butírico (AIB), ácido 1-naftalenacético (ANA), ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), las dos primeras auxinas son naturales, por lo que su efecto es poco y con poca duración, debido a la presencia de enzimas oxidasas en los tejidos (Sharry *et al.*, 2015; George *et al.*, 2008).
2. **Citocininas:** Son empleadas para estimular la división celular y controlar la morfogénesis, así como de la inducción de la diferenciación de brotes adventicios y su proliferación, mediante la liberación de yemas axilares, por medio de la modificación de la dominancia apical. Por otra parte, en las plantas completas, son capaces de favorecer la maduración de los cloroplastos y retrasar la senescencia de las hojas (Bhojwani & Dantu, 2013; George *et al.*, 2008). Entre las citocininas más empleadas se encuentra la 6-

furfurilaminopurina (Kinetina), 6-bencilaminopurina (BAP), thidiazuron (TDZ), 2-isopenteniladenina (2-iP), 6-(4-hidroxy-3-metilbut-2-enolamina) (zeatina), estas dos últimas son citocininas naturales (Bhojwani & Dantu, 2013).

3. **Giberelinas:** Estos reguladores se encuentran de manera natural en las plantas, sin embargo, pueden adicionarse de manera exógena. Se encargan de producir un alargamiento de las células, elongación de los entrenudos, la inducción de la ruptura de dormancia de embriones aislados o semillas, así como, el desarrollo de inflorescencias (Sharry *et al.*, 2015). Actualmente, se han identificado más de 125 giberelinas, sin embargo, se ha demostrado que sólo algunas son biológicamente activas, siendo las más usadas, (ácido giberélico) AG₃, AG₄ y AG₇ (Bhojwani & Dantu, 2013; Taiz & Zeiger, 2006).
4. **Ácido abscísico:** Se encarga de controlar la apertura y cierre de estomas, inhibe la elongación y división celular e induce la dormancia de las semillas, además ayuda a la sincronización y maduración de embriones somáticos (Suárez, 2020).
5. **Etileno:** Es un gas que se produce en la mayoría de los tejidos y se ha observado que en las plantas es capaz de inducir la senescencia y abscisión de hojas y flores, es decir, la pérdida programada de un órgano, además, elimina la dormancia de semillas y yemas, aunque difícilmente es empleado en el CTV (Suárez, 2020).

2.2.1.4 Agentes de soporte

Finalmente se encuentra el mecanismo de soporte, el cual es empleado en medios semisólidos y sólidos, su función es brindarle cierta dureza al medio, la cual es generada por los agentes gelificantes. El tipo y cantidad de estos agentes dependerá del tipo de tejido, composición del medio, costos, etc. (Suárez, 2020).

Algunos de ellos son agar, agarosa y goma gellan, solo por mencionar algunos. Éste último, es conocido comercialmente como Gelrite®, Phytigel, Kelcogel o Gelzan®, es un tetrasacárido lineal, conformado por D-glucosa, L-ramnosa y ácido D-glucurónico (2:1:1), unidos por un enlace glicosídico β (1 \rightarrow 4). En presencia de cationes de K⁺, Ca²⁺, Mg²⁺, forma un gel duro, el cual, fragua a una temperatura

aproximada de 35-50 °C. Es incoloro y transparente, permitiendo la visualización de los tejidos vegetales, así como de los agentes microbianos. En el caso del Gelzan® su concentración ronda entre los 3-3.5 g/L, dispersándose fácilmente en agua, sin embargo, esto puede variar dependiendo de la casa comercial de donde provenga, así como de su combinación con alguna otra fuente de carbono, la etapa de los cultivos *in vitro* o la especie con la que se está trabajando.

En comparación con otros agentes gelificantes, como el agar, éste se utiliza en menor concentración, por lo que el costo por litro de medio de cultivo es menor. Así mismo, se ha observado que, en algunas especies, los resultados son favorecidos en Gelrite® en lugar de otros agentes gelificantes (George *et al.*, 2008; Sigma-Aldrich, s.f.).

2.2.2 Condiciones de incubación

Una vez que los explantes son cultivados de manera *in vitro*, éstos deben ser incubados en ambientes donde se controle la temperatura, calidad e intensidad de la luz, fotoperiodo y humedad, con la finalidad, de simular lo mayormente posible a las condiciones *ex vitro*. Para ello se requiere un área o cuarto de incubación el cual se encuentra adaptado con todo lo necesario para brindar las condiciones requeridas, es decir, aire acondicionado, lámparas, buena circulación del aire y libre de la humedad del ambiente.

Generalmente, los cultivos son incubados a una temperatura de 25-28 °C, con un fotoperiodo de 16 h de luz y 8 h de oscuridad, con una intensidad lumínica de 32 $\mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$ (Lara-Ascencio *et al.*, 2023), con una humedad entre el 50-80% para el cuarto de incubación, mientras que dentro de los cultivos se espera que sea entre el 98-100% (Loberant & Altman, 2010).

2.3 Morfogénesis *in vitro*

La morfogénesis es un término que hace referencia a la formación o génesis de órganos comprendiendo el crecimiento y la diferenciación celular. La respuesta morfogenética puede generarse siguiendo dos posibles rutas alternativas; organogénesis o embriogénesis somática (Gisbert, 2011).

En la organogénesis, se dará origen a una estructura monopolar, conocida como órgano (brote o raíz), el cual presenta una conexión con el tejido vascular en el explante, mientras que, en la embriogénesis somática, se formará un embrión somático, una estructura bipolar, el cual posee tanto el meristemo apical como el radicular y a diferencia de la organogénesis, este proceso carece de la conexión con el tejido vascular en el explante. Ambas vías morfogenéticas, pueden llevarse a cabo de manera directa o indirecta. (Tamayo & Monja, 2021)

2.3.1 Organogénesis directa

En el caso de la organogénesis directa, ésta consiste en la regeneración de brotes mediante la activación de yemas axilares o de forma adventicia directamente de los tejidos del explante (Sharry *et al.*, 2015). Esta vía tiene la ventaja de que las plantas regeneradas a partir de la activación de yemas preformadas muestran una gran estabilidad genética, debido a que solo ocurre el proceso de diferenciación celular, en su contraparte, en los brotes adventicios ocurre una desdiferenciación seguido de su rediferenciación celular, lo que podría generar una disminución en su estabilidad genética.

2.3.2 Organogénesis indirecta

Por otra parte, la organogénesis indirecta consiste en la regeneración de plantas por medio de la proliferación celular a través de la formación de callo (masa de células indiferenciadas) y la posterior formación de brotes adventicios o raíces (Sharry *et al.*, 2015). Este proceso puede mostrar mayor variabilidad genética, en comparación con la organogénesis directa, debido a que ocurre un proceso de desdiferenciación celular en un tejido bien diferenciado, para poder dar origen a la formación del callo y posteriormente llevar a cabo la rediferenciación de las células indiferenciadas.

2.4 Micropropagación

La micropropagación es actualmente una parte de la biotecnología vegetal con mayor importancia comercial, debido a que el uso del CTV, es decir, el establecimiento, mantenimiento y la regeneración de plantas completas, va a permitir generar de manera masiva e intensiva, plantas genéticamente homogéneas y libre de patógenos, esto en menor tiempo y en espacios reducidos, en comparación con los métodos tradicionales. De manera general la micropropagación puede dividirse en cinco etapas críticas y ordenadas (Lobertant & Altman, 2010):

- **Etapa 0. Selección y mantenimiento de la planta madre**

Durante esta etapa se seleccionan y acondicionan las plantas madre que serán usadas para iniciar los cultivos *in vitro*, para ello se busca que la planta madre cumpla con los siguientes requisitos:

- Se encuentre bien identificada taxonómicamente
- Se encuentre libre de enfermedades o cualquier otro patógeno
- Sea una especie viable
- Esté en un buen estado fisiológico y en etapa vegetativa

- **Etapa I. Establecimiento aséptico de los cultivos**

Durante esta etapa se selecciona el tipo de explante con el cual se va a trabajar y se establecen las condiciones asépticas para poder inducir el tejido vegetal. Además, es en esta etapa cuando se pueden probar diferentes agentes oxidantes y algunos antibióticos y/o antifúngicos que permitan obtener la asepsia de los explantes, así mismo, se selecciona el medio de cultivo para dar la inducción a la ruta morfogénica deseada. Para la micropropagación, generalmente se realiza por medio de la organogénesis directa, aunque en algunos casos, como el café se emplea la embriogénesis.

- **Etapa II. Multiplicación**

Una vez que se asegura la asepsia de los explantes y la inducción morfogénica, se realiza la regeneración y propagación de las plantas. Para ello, existen tres vías

de regeneración de plantas *in vitro* (Pérez-Molphe *et al.*, 1999; González *et al.*, 2012):

1. *Activación de yemas preformadas*: las cuales se desarrollarán en tallos, posterior a su contacto con el medio de cultivo.
2. *Embriogénesis somática*: formación de embriones somáticos, es decir, que no provienen de la fusión de los gametos masculino y femenino.
3. *Organogénesis*: formación de órganos adventicios (hojas, tallo o raíces)

Dependiendo de la especie y los explantes, se seleccionará alguna de estas vías, dando inicio al proceso morfogénético, sumado a ello, los RCV, principalmente, auxinas y citocininas, serán capaces de modular la respuesta morfogénética, generando un aumento exponencial en el número de individuos, sin embargo, deberá hacerse de manera escalonada para contar con plantas durante todo el año o en el momento que se desee.

- ***Etapa III. Elongación y enraizamiento***

En esta etapa se busca detener la multiplicación rápida e inducir el establecimiento de una plántula completamente desarrollada, es decir, el alargamiento de los brotes y la formación de raíces. Para ello, los brotes obtenidos en la Etapa II, son individualizados y colocados en medios de cultivo suplementados con bajas concentraciones de citocininas o bien, libre de RCV, con la finalidad de favorecer su elongación, mientras que, para inducir la formación de raíces se emplean auxinas. En el caso de embriones somáticos, es en esta etapa donde se dará la germinación y maduración de los mismos (González *et al.*, 2012).

- ***Etapa IV. Aclimatización***

Finalmente, durante esta etapa, las plántulas obtenidas de manera *in vitro* son expuestas a un proceso de adaptación a las condiciones ambientales para poder asegurar su crecimiento y supervivencia de manera *ex vitro*. Inicialmente comienza con poca luz, temperatura y humedad muy similares a las condiciones *in vitro*, posteriormente la luz se aumenta gradualmente, la temperatura y la humedad se regulan para ser similares a las del ambiente del invernadero y finalmente se

trasplantan a un sustrato con un pH adecuado y lo suficientemente poroso para un correcto drenaje y aireación. Es importante destacar que la sobrevivencia de las plantas depende, en gran medida, del sustrato seleccionado según la especie y, por otro lado, el control adecuado de los hongos y bacterias que se puedan producir, para ello, se pueden emplear agroquímicos como el Captán ®, Benomil ® y/o Agri-mycin ®.

2.4.1 Ventajas y desventajas de la micropropagación

Entre las ventajas de este proceso, se encuentra la propagación de plantas a partir de un pequeño explante, de manera rápida, masiva, libres de patógenos, con gran uniformidad del material clonado, garantizando un alto grado de similitud con las características de la planta madre, ya sea, tamaño, forma, color, presencia de metabolitos, entre otros. Así mismo, disminuye los tiempos de multiplicación y del espacio requerido, en comparación con los métodos tradicionales. Además, al ser propagadas dentro de un laboratorio bajo condiciones controladas, lo vuelve independiente de las condiciones ambientales, permitiendo su producción durante todo el año (González *et al.*, 2012; Sharry *et al.*, 2015).

En cuanto a las desventajas se encuentra el permanente riesgo de contaminación y con ello, el establecimiento de cultivos asépticos, pues muchas veces este proceso se vuelve complicado en especial si el material vegetal con el que se cuenta es limitado. Otra de ellas, pueden ser los niveles superiores a los aceptables de variación somaclonal, que podría generarse por algún estrés generado en las plantas, lo cual, a menudo se observa hasta que se obtienen plantas maduras, traduciéndose en pérdidas económicas y pérdidas en la producción; sumado a esto, se encuentran las pérdidas durante la transición de la Etapa III a la Etapa IV, es decir, las plantas obtenidas bajo condiciones *in vitro* pasan a condiciones *ex vitro*. Finalmente, una posible desventaja para ciertos productos o mercados, serían los altos costos de producción generados por las instalaciones, aparatos, mano de obra e insumos (Loberant & Altman, 2010).

2.5. Establecimiento aséptico y regeneración *in vitro* de *Thaumatococcus* *xanadu*

Como se mencionó anteriormente, una de las etapas cruciales para la propagación *in vitro* es el establecimiento aséptico de los cultivos, ya que esto va a permitir poder avanzar a las etapas posteriores. En el caso del género *Thaumatococcus*, los procedimientos de desinfección publicados son muy escasos, a pesar de ello, la mayoría de los artículos disponibles concuerdan con el procedimiento de desinfección, usando como explantes, ápices, yemas o brotes. Además, todos ellos coinciden con el uso de fungicidas y bactericidas tales como; Benlate®, Agrimycin®, Ridomil®, Mancozeb® y Tokat®.

Adicionalmente, también coinciden con el uso de etanol, en una concentración del 96% (v/v) o al 70% (v/v), durante 1 minuto, el lavado con agua y jabón, así como el uso de hipoclorito de sodio (NaOCl) como solución desinfectante, manejando un rango de concentración de 0.16 % - 3.5 % (v/v), acompañado o no, de Tween®-20 como surfactante durante 5-20 minutos (Tabla 1).

Tabla 1. Procedimientos de desinfección empleados para el establecimiento aséptico de diferentes especies de *Thaumatococcus* (*Philodendron*).

Especie	Explantes	Procedimiento de desinfección	Autores
<i>P. sp</i> (posible <i>P. corcovadense</i>)	Ápices	1. Benlate® (2g/L) y Agrimycin® (2 g/L) por 30 min	(Blanco & Valverde, 2004)
	caulinares y tallo con yemas laterales	2. Etanol 95% v/v por 1 min 3. NaOCl 3.5% v/v + 1 gota de Tween®-20 por 10 min	
		4. 2 enjuagues con agua destilada estéril	

Especie	Explantes	Procedimiento de desinfección	Autores
		5. NaOCl 1% v/v con 1 gota de Tween®-20 por 15 min 6. 3 enjuagues con agua destilada estéril	
<i>Philodendron</i> ‘Imperial Green, Red y Rainbow’	Yemas laterales	1. Ridomil® MZ y Mancozeb® por una semana. 2. Lavar con agua de la llave por 15 minutos, cortar segmentos individuales con una yema lateral c/u 3. Etanol 70% v/v por 1 min 4. NaOCl 1% v/v + varias gotas de Tween®-20 por 20 min. 5. 3 enjuagues con agua estéril	(Chen <i>et al.</i> , 2012)
<i>P. xanadu</i>	Brotes axilares	1. Lavar con agua y jabón 2. Tokat® (1 mL/L) y Agry-Gent Plus 5000® (2 g/L) por 30 min. 3. Etanol 70% v/v por 1 min. 4. NaOCl 0.16% v/v por 5 min. 5. 3 enjuagues con agua desionizada estéril	(Lara-Ascencio <i>et al.</i> , 2021)

Por otra parte, para determinar la vía de regeneración, es necesario, seleccionar el tipo de explante, medio de cultivo y reguladores de crecimiento adecuados. De acuerdo con la revisión de la literatura, se encontró muy poca información acerca de la propagación *in vitro* de este género, sin embargo, la mayoría de los autores concuerda en el uso de brotes o yemas axilares o apicales como explantes para inducir una respuesta vía organogénesis directa, haciendo uso del medio de cultivo Murashige & Skoog (MS) adicionado con reguladores de crecimiento. El tipo y la concentración de los reguladores de crecimiento empleados, varía de acuerdo con el autor, dependiendo de la etapa en la cual esta, tal y como se muestra en la Tabla 2.

En el caso del establecimiento, la mayoría la mayoría de los artículos consultados hacen uso de BAP en un rango de concentración entre 0.1-10 mg/L, y en algunos casos, se usa en combinación con alguna auxina como AIA, AIB o ANA, cuando pasa a la etapa de multiplicación, este rango disminuye, siendo de 0.5-7.0 mg/L, y también se sustituye con kinetina en una concentración de 0.5-3 mg/L, y en algunas especies, se recomienda que el medio de cultivo carezca del uso de auxinas para promover la proliferación de brotes.

Tabla 2. Propagación *in vitro* de diferentes especies de *Thaumatococcus* (*Philodendron*) por medio de la vía regenerativa organogénesis directa.

Especie	Explantos	Medio/Reguladores de crecimiento	Autores
INDUCCIÓN			
<i>P. bipinnatifidum</i>	Brotes	MS con BAP (1 mg/L)	(Alawaadh, <i>et al.</i> , 2020)
<i>P. canifolium</i>	Brotes	MS con BAP (2-5 mg/L)	(Hee Han & Mo Park, 2008)
<i>P. sp (posible P. corcovadense)</i>	Yemas apicales y laterales	MS con BAP (0.8 mg/L) con AIA (2 mg/L)	(Blanco & Valverde, 2004)

Especie	Explantes	Medio/Reguladores de crecimiento	Autores
<i>P. pertusum</i>	Yemas axilares	MS con BAP (10 mg/L) y con AIB (0.2 mg/L)	(Kumar <i>et al.</i> , 1998)
<i>Philodendron</i> 'Imperial Green, Red y Rainbow'	Yemas axilares	MS con ANA (0.1 mg/L) con BAP (1 mg/L)	(Chen <i>et al.</i> , 2012)
<i>P. xanadu</i>	Brotos axilares	MS con sulfato de adenina, tiamina, glicina, piridoxina (80 mg/L), ácido nicotínico (0.5 mg/L) e inositol (100 mg/L)	(Lara-Ascencio <i>et al.</i> , 2021)
MULTIPLICACIÓN			
<i>P. bipinnatifidum</i>	Puntas de brotes	MS con BAP (1 mg/L) con IBA (0.5 mg/L)	(Alawaadh <i>et al.</i> , 2020)
<i>P. cannifolium</i>	Brotos	MS con BAP (1-3 mg/L)	(Hee Han & Mo Park, 2008)
<i>P. sp</i> (posible <i>P. corcovadense</i>)	Yemas apicales y laterales	MS con BAP (7 mg/L) y Kinetina (3 mg/L)	(Blanco & Valverde, 2004)
<i>P. pertusum</i>	Yemas axilares	MS con Kinetina (3 mg/L) y BAP (1 mg/L)	(Kumar <i>et al.</i> , 1998)
<i>P. selloum</i>	Brotos	MS con BAP (5 mg/L) y CuSO ₄ (35 o 70 mg/L)	(Seliem <i>et al.</i> , 2021)
<i>Philodendron</i> 'Imperial Green, Red y Rainbow'	Yemas axilares	MS con Kinetina (0.5 o 1 mg/L) o MS con BAP (0.5 o 1 mg/L)	(Chen <i>et al.</i> , 2012)

Especie	Explantes	Medio/Reguladores de crecimiento	Autores
ENRAIZAMIENTO			
<i>P. bipinnatifidum</i>	Puntas de brotes	MS con ANA (1-2 mg/L)	(Alawaadh <i>et al.</i> , 2020)
<i>P. sp (posible P. corcovadense)</i>	Yemas apicales y laterales	MS con 2,4-D (0.1-2.0 mg/L) o AIA (10-50 mg/L)	(Blanco & Valverde, 2004)
<i>Philodendron 'Imperial Green, Red y Rainbow'</i>	Yemas axilares	MS con AIB (0.5-1 mg/L)	(Chen <i>et al.</i> , 2012)
<i>P. selloum</i>	Brotes	MS sin RCV con CuSO ₄ (35 mg/L)	(Seliem <i>et al.</i> , 2021)

III. OBJETIVOS

3.1 General

Diseñar un protocolo para micropropagar *Thaumatococcus xanadu* vía organogénesis directa.

3.2 Particulares

- Establecer asépticamente explantes de ápices y rizoma de las plantas madre.
- Determinar el tratamiento para el control de la oxidación de los explantes de rizoma para su inducción morfogénica.
- Seleccionar el tipo y concentración de reguladores de crecimiento vegetal para la inducción y proliferación de brotes múltiples.
- Individualizar los brotes regenerados para su elongación mediante AG₃ y Kinetina.
- Seleccionar el tipo y concentración del regulador de crecimiento para el enraizamiento de los brotes y obtención de plantas completas.
- Probar dos tipos de sustratos diferentes y evaluar el porcentaje de supervivencia durante la aclimatización.
- Definir cada etapa de la micropropagación.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

El presente trabajo se realizó en el laboratorio 116 Cultivo de Tejidos Vegetales, Departamento de Bioquímica de la Facultad de Química de la UNAM.

Cabe señalar que el desarrollo del presente trabajo es parte de un proyecto en vía de registro bajo la Facultad de Química para la micropropagación de dos especies ornamentales (*Thaumatococcus xanadu* y *Spatiphyllum sensation*) solicitados por la Ingeniera María Hortensia Cerón, ya que se tiene previsto la venta de especies ornamentales a viveristas del estado de Morelos, a través de la Ing. Cerón.

Para el cumplimiento de los objetivos del presente trabajo, se siguió la ruta crítica presente en la Figura 4.

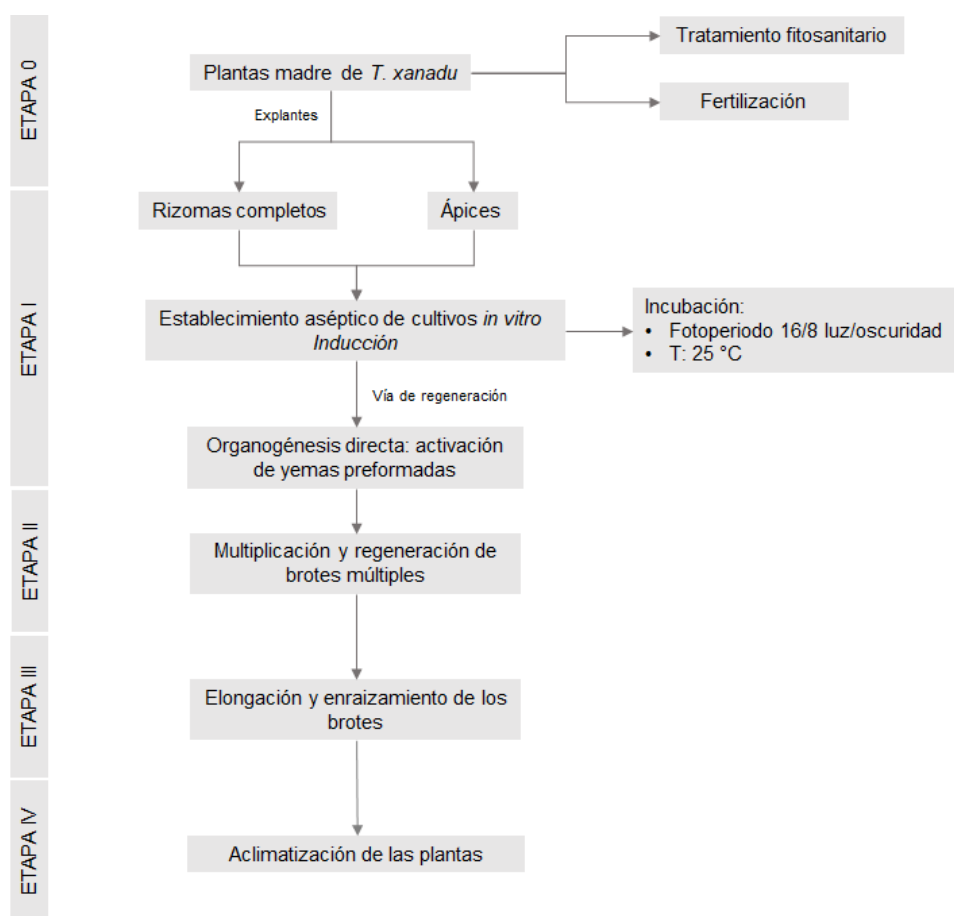


Figura 4. Diagrama general del proceso de micropropagación de *T. xanadu*

4.1 Material biológico

La presente investigación dio inicio con un primer lote de 3 plantas de *Thaumatococcus xanadu* cultivadas en un invernadero del Estado de Morelos, México, proporcionadas por la Ingeniera María Hortensia Cerón en octubre de 2022, su apariencia indicó que eran plantas adultas. Posteriormente en enero de 2023 fue proporcionado otro lote de 5 plantas, éstas con una apariencia de plantas más jóvenes (Figura 5).



Figura 5. Plantas de *Thaumatococcus xanadu* correspondiente al A) primer lote, B) segundo lote, ambas cultivadas en el Estado de Morelos.

4.2 Aspectos Generales

4.2.1 Preparación de medios de cultivo

La preparación de los medios de cultivo empleados se realizó haciendo uso de soluciones madre concentradas (100X) (Anexo 1), empleando como base las sales inorgánicas Murashige & Skoog (1962), adicionado con vitaminas, aminoácidos, reguladores de crecimiento, sacarosa y como agente gelificante se empleó Gelzan®. Además, durante la Etapa I, se emplearon diferentes antibióticos y antifúngicos, los cuáles fueron adicionados en la campana de flujo laminar, posterior a la esterilización del medio de cultivo. En las etapas posteriores o en los casos en

los que ya no se requerían antibióticos, los medios de cultivo fueron dosificados antes de su esterilización.

La composición por litro del medio de cultivo basal empleado en este trabajo se muestra en la Tabla 3, más adelante se mostrarán los reguladores de crecimiento empleados, así como su concentración y combinación para cada etapa.

El pH de los medios de cultivo fue ajustado a 5.7- 5.75, empleando dos soluciones, una de hidróxido de sodio (NaOH) y la otra de ácido clorhídrico (HCl), ambas en concentraciones de 0.1, 0.5, 1 y 4 N según fuera necesario y fueron esterilizados en una autoclave vertical a 122°C, 1.5 Kg/cm², durante 18 minutos, fueron dosificados en frascos de vidrio de alimento infantil (Gerber®) añadiendo 25 mL por frasco.

Tabla 3. Composición por litro del medio basal empleado en la Etapa I, II y III de la micropropagación de *T. xanadu*

Composición	Concentración/ Peso
Sales MS (1962)	100 %
Vitaminas R2	100 %
Glicina	2 mg
Ácido cítrico	150 mg
Ácido ascórbico	150 mg
PVP	250 mg
Sacarosa	30 g
Gelzan®	3.3 g

4.3 Etapa 0. Selección y mantenimiento de las plantas madre

Como primer paso de la micropropagación de *T. xanadu* fue la selección y preparación del material biológico (Figura 6), considerando que el lote con el que se contaba inicialmente era pequeño, se decidió trabajar con el lote completo, sin excluir ninguna de ellas. Las plantas fueron sometidas a un tratamiento fitosanitario, el cual consistió en la preparación y riego con una solución de Captán® (2 g/L) y Agri-mycin 500® (2 g/L), dos agroquímicos ampliamente utilizados en diversos cultivos, cada una de las macetas fue regada dos veces por semana con un litro de esta solución.

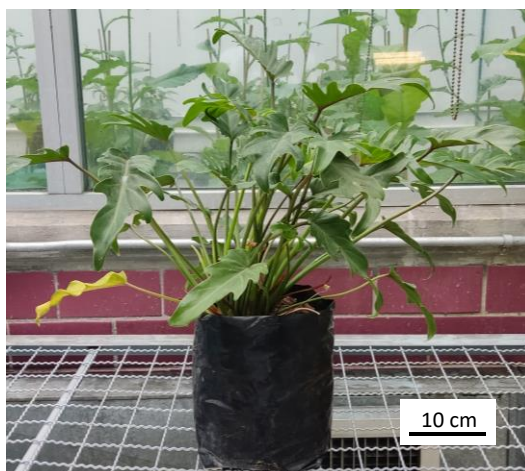


Figura 6. Planta madre de *T. xanadu* correspondiente al segundo lote.

Así mismo, fueron fertilizadas con una solución con sales MS al 50% de la concentración original, suplementado con vitaminas R2 al 100% y BAP (2 mg/L); cada una de las macetas fue regada una vez a la semana con un litro de esta solución.

Ambos tratamientos tuvieron una duración de dos meses, el primer lote fue durante el mes de octubre- noviembre; sin embargo, no fue la misma duración para todas las plantas debido a que se emplearon en diferentes tiempos. En el caso del segundo lote, tuvo la misma duración para las cinco plantas y fue de enero a marzo, aplicándose directamente al sustrato.

4.4 Etapa I. Establecimiento aséptico de cultivos

Se probaron cuatro tratamientos de desinfección, los cuales se llevaron a cabo en dos etapas. La primera de ellas se llevó a cabo en la tarja, mientras que la segunda se realizó bajo condiciones asépticas, en la campana de flujo laminar.

Para los tres primeros tratamientos se individualizó uno de los brotes de una de las plantas junto con una parte del rizoma (Figura 7), usando como explantes el ápice y el rizoma. Para ello, como paso inicial se realizó el corte de uno de los ápices de la planta, se enjuagó y lavó con jabón y agua de la llave para retirar el sustrato, posteriormente, se retiraron hojas, peciolo y raíces, y solo permaneció el ápice y el rizoma. En el caso del cuarto tratamiento, se trabajó con la planta completa, es decir, se retiró del sustrato (Figura 8), se enjuagó, lavó y se retiraron hojas, peciolo y raíces (Figura 9), para posteriormente disectar cada uno de los ápices (Figura 10) para ser desinfectados individualmente (Figura 11). En este cuarto tratamiento se decidió trabajar únicamente con el ápice y el resto del tejido vegetal se descartó.



Figura 7. Brote individualizado junto con una porción del rizoma de la planta.



Figura 8. Planta madre de *T. xanadu* retirada del sustrato y con sus raíces expuestas.

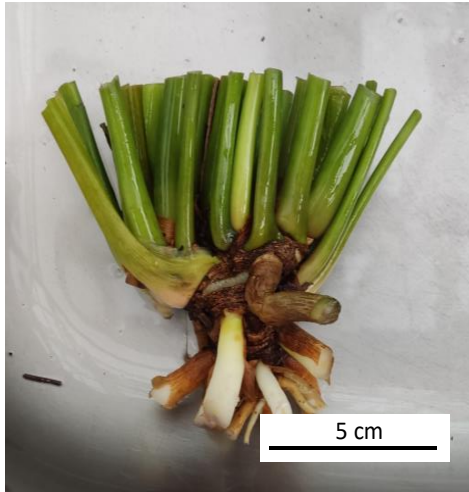


Figura 9. Rizoma de la planta posterior al lavado con agua y jabón.

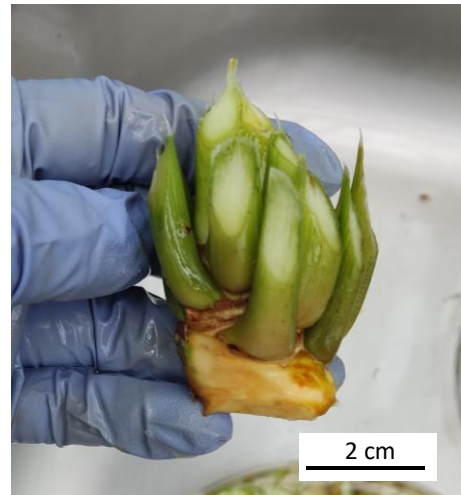


Figura 10. Ápice individualizado con una pequeña porción del rizoma.



Figura 11. Ápices individualizados y colocados en una solución antioxidante para su posterior desinfección.

Las principales diferencias entre los cuatro tratamientos, radica en el tiempo que estuvieron en contacto con los agroquímicos, el tiempo y la concentración de NaOCl, pasando de una concentración 3.5% (v/v) a 15% (v/v) para el último tratamiento, así como el tiempo y tipo de fármacos que se emplearon, pues con el tratamiento inicial solo se dejó en contacto con los fármacos 10 min, mientras que para el último tratamiento se dejaron 120 h (5 días), disminuyendo gradualmente la concentración (Tabla 4).

Tabla 4. Tratamientos de desinfección

Acción \ Tratamiento	1	2	3	4
En la tarja				
Retirar el material biológico de la maceta y limpiar del sustrato			☑	
Retirar hojas, peciolo y raíces			☑	
Lavar con agua y jabón hasta retirar por completo el sustrato			☑	
Enjuagar con agua desionizada estéril			☑	
En la campana de flujo laminar				
Colocar en etanol al 70% (v/v) durante 1 min y decantar			☑	
Colocar en una solución estéril de Captán® (2 g/L) con agitación constante y decantar	☑			☑
Colocar en una solución estéril de Agrimicyn® (2 g/L) con agitación constante y decantar	🕒 30 min			🕒 1 h
Enjuagar las veces que sea necesario con agua desionizada estéril			☑	
Colocar en una solución de NaOCl + 2 gotas de Tween-20 (c/250 mL), con agitación constante y decantar	🕒 10 min [NaOCl]: 3.5% (v/v)	🕒 10 min [NaOCl]: 7% (v/v)	🕒 10 min [NaOCl]: 15% (v/v)	🕒 15 min [NaOCl]: 15% (v/v)
Enjuagar con agua desionizada estéril			☑	
Colocar en una solución de NaOCl + 2 gotas de Tween-20 (c/250 mL), con agitación constante y decantar	☑ 5 min [NaOCl] 1% (v/)		—	

Tratamiento	1	2	3	4
Acción				
Enjuagar con agua desionizada estéril	<input checked="" type="checkbox"/>		-	
Colocar 100 mL de una solución de antioxidantes estéril, adicionar los antibióticos y fungicidas, agitación constante y decantar	<input checked="" type="checkbox"/>			
	🕒 10 min	🕒 30 min	🕒 24 h 16 h luz/ 8 h oscuridad	
Cefotaxima	250 mg/L	500 mg/L	250 mg/L	250 mg/L
Enrofloxacina	100 mg/L	100 mg/L	100 mg/L	-
Nistatina	85 mg/L	100 mg/L		-
Terbinafina	150 mg/L	100 mg/L	30 mg/L	30 mg/L
Ketoconazol	-	100 mg/L		-
Meropenem		-		30 mg/L
Disectar el rizoma y/o ápice		<input checked="" type="checkbox"/>		-
Sembrar en el medio de cultivo correspondiente		<input checked="" type="checkbox"/>		-

Mientras que para el cuarto tratamiento de desinfección, el ápice se retiró de la solución de antioxidantes para retirar el tejido oxidado y se colocó nuevamente en una solución de antioxidantes con 250 mg/L de cefotaxima, 12 mg/L de terbinafina y 25 mg/L de meropenem y se dejó en agitación constante 24 horas con un fotoperiodo de 16 h luz y 8 h oscuridad, pasado ese tiempo, se repitió el procedimiento solo que la solución de antioxidantes contenía 100 mg/L de cefotaxima, 15 mg/L nistatina y 15 mg/L meropenem y se dejó por 72 h. Finalmente, se decantó la solución y se retiró el tejido oxidado para ser sembrado en el medio de cultivo Ph-2.

Cabe mencionar, que las concentraciones de NaOCl se prepararon empleando cloro comercial con una concentración de hipoclorito de sodio del 4.0-6.0% (v/v); sin embargo, por mayor comodidad durante el trabajo de laboratorio se consideró con una pureza del 100% (v/v). En la tabla 5 se muestra la concentración empleada en

el laboratorio, así como la concentración real, con 6% (v/v) de NaOCl en la muestra comercial.

Tabla 5. Concentración de NaOCl empleada en el laboratorio con el 100% (v/v) y concentración real con 6% (v/v) de NaOCl.

Concentración de NaOCl empleadas en el laboratorio (NaOCl 100%)	1%	3.5%	7%	15%
Concentración de NaOCl real (NaOCl 6%)	0.006%	0.21%	0.42%	0.90%

Además, cada tratamiento de desinfección se realizó uno a uno, consecutivamente, esto debido a que se evaluó el porcentaje de asepsia, a través de la ausencia de microorganismos en cada uno de los explantes, para posteriormente realizar modificaciones en el tiempo y concentración de las soluciones empleadas. Una vez que se desinfectó el material biológico, el rizoma se disectó en pequeñas porciones de un tamaño entre 0.5-2 cm (Figura 12A). Si el explante correspondía al ápice, este se sembró en el medio de cultivo correspondiente, sin ser disectado, es decir, con algunos primordios foliares (Figura 12B).

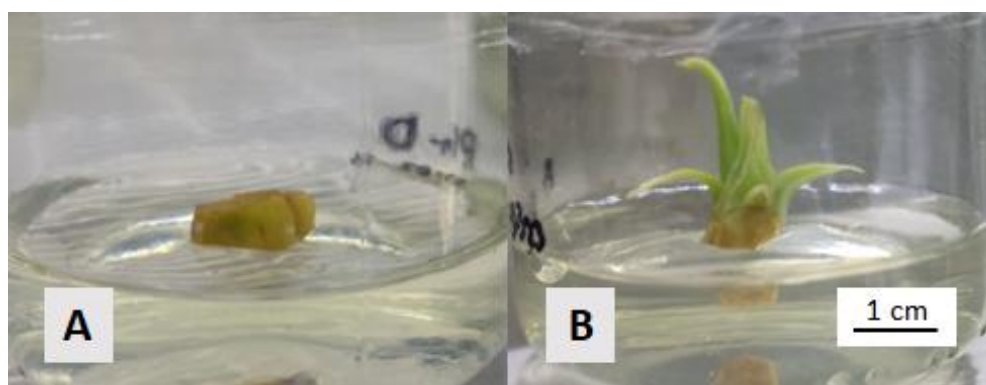


Figura 12. Tipos de explantes; A) Explante de rizoma disectado, B) Explante de ápice, ambos sembrados en el medio Ph-2, posterior a 4 días de su cultivo.

Cuando el explante presentó contaminación independiente del tratamiento de desinfección empleado en la Tabla 4, se retiró del medio de cultivo y se desinfectó nuevamente, de acuerdo con la tabla 6.

Tabla 6. Tratamientos de desinfección aplicados a explantes que presentaron contaminación después de la primera desinfección.

Tratamiento	1	2	3	4
Acción				
Clasificar los explantes de acuerdo al nivel de contaminación en baja, media y alta			<input checked="" type="checkbox"/>	
Retirar el explante del medio de cultivo y enjuagar con agua desionizada estéril			<input checked="" type="checkbox"/>	
Agregar 50 mL de una solución de antioxidantes estéril adicionado con antibióticos y antifúngicos, agitar constantemente y decantar		<input checked="" type="checkbox"/> 🕒 15 min		<input checked="" type="checkbox"/> 🕒 24 h
Cefotaxima	500 mg/L		250 mg/L	
Enrofloxacina	200 mg/L		50 mg/L	
Nistatina	170 mg/L	320 mg/L	25 mg/L	
Terbinafina	250 mg/L		-	
Ketoconazol	-	100 mg/L	-	
Enjuagar tres veces con agua desionizada estéril y decantar			<input checked="" type="checkbox"/>	
Sembrar en el medio de cultivo correspondiente			<input checked="" type="checkbox"/>	

Es importante destacar que para cada tratamiento se realizó un tratamiento de desinfección de ápices diferente, con variaciones en cuanto al tiempo que estuvieron en contacto con los fármacos y su concentración.

En cuanto al medio de cultivo utilizado para el establecimiento de los explantes (Tabla 7), se utilizaron las sales del medio MS, suplementado con adenina, coctel 22 y con dos diferentes concentraciones de BAP, 2 y 7 mg/L, con la finalidad de determinar la concentración para la inducción morfogénica de los explantes, además, se adicionaron diferentes concentraciones de fármacos; 250 mg/L de cefotaxima, 100 mg/L de enrofloxacina y 25 mg/L de nistatina.

Para el tratamiento de desinfección 1 y 2, se probaron las cuatro combinaciones diferentes, mientras que para el tratamiento 3 y 4 se empleó el mejor medio de cultivo que se observó con los tratamientos anteriores.

Tabla 7. Composición por litro de los medios de cultivo empleados para la Etapa I. Inducción

Medio Componente	Ph-1	Ph-2	Ph-3	Ph-4
Medio basal	100%			
AIB	0.5 mg			
Adenina	10 mg	-	10 mg	-
Coctel 22	-	10 mL	-	10 mL
BAP	2 mg		7 mg	

Cabe aclarar que la n (número de explantes) para cada tratamiento varió dependiendo del tamaño del rizoma y el tipo de explante con el cual se trabajó. Para el primer tratamiento la n fue de 48, para el segundo fue de 40, para el tercero fue de 36 y finalmente para el cuarto de 9.

Para el primer tratamiento de desinfección, únicamente se contó con dos ápices, los cuales fueron sembrados de manera aleatoria en el medio de cultivo Ph-1 y Ph-3, mientras que, para el segundo y tercer tratamiento, se contó con uno y tres ápices, respectivamente, para cada medio de cultivo. El resto de los explantes para los tres tratamientos, fueron porciones de rizoma, los cuales fueron disectados de manera transversal y/o longitudinal, dependiendo de su tamaño. Finalmente, para el cuarto tratamiento, se contaron con 9 ápices los cuales se sembraron en el medio Ph-2.

Todos los cultivos se mantuvieron en una cámara de incubación con una temperatura de 25°C ± 2°C, con un fotoperiodo de 16 horas luz, 8 horas oscuridad y fueron subcultivados cada tres semanas (21 días). Se sembró un explante por frasco, realizando cuatro subcultivos en total. Los parámetros de evaluación durante esta etapa fue el porcentaje de asepsia, el cual se evaluó de la siguiente manera:

$$\% \text{ de asepsia} = \frac{\text{Número de explantes asépticos}}{\text{Número de explantes totales}} * 100$$

Considerando como explante aséptico aquel cultivo en donde no se produce la proliferación de microorganismos como hongos y bacterias (Sharry *et al.*, 2015). Además, se evaluó la oxidación en los explantes, de acuerdo con seis categorías; <10%, 10-20%, 20-40%, 40-60%, 60-80% y del 80-100%, que corresponden al porcentaje del tejido oxidado, así como el tipo de respuesta morfogénica.

4.5 Etapa II. Multiplicación

Transcurridos cuatro subcultivos (84 días), los explantes (porciones de tallo) se subcultivaron de manera aleatoria en el medio de cultivo basal (Tabla 3) suplementado con dos diferentes concentraciones de BAP (1 y 2 mg/L) solo o en combinación con kinetina (1 mg/L) (Tabla 8), dos citocininas utilizadas para la proliferación de brotes adventicios para especies del mismo género.

Tabla 8. Composición por litro de los medios de cultivo empleados para la Etapa II

Medio / Componente	Control	1	2	3
Medio basal	100%			
Coctel 22	10 mL			
BAP	-	1 mg	2 mg	1 mg
Kinetina		-		1 mg

Para cada tratamiento, se sembraron 10 frascos con dos tallos de aproximadamente 1 cm de alto, es importante destacar que los tallos correspondían a brotes individualizados, a los cuales se le retiraron las hojas y raíces, en caso de presentarlas (Figura 13). Las condiciones de incubación fueron las mismas a la Etapa anterior y fueron subcultivados cada tres semanas (21 días), para un total de cuatro subcultivos. El parámetro de evaluación durante esta etapa fue el número de brotes regenerados por explante.



Figura 13. Brotes individualizados con aprox. 1 cm de alto.

4.6 Etapa III. Elongación y enraizamiento

Para esta etapa, se optó por separarla en dos, induciendo primero la elongación de la mayor cantidad posible de brotes, para después inducir la formación de raíces. Para ello, se tomaron cinco de las diez repeticiones de la etapa anterior de manera aleatoria, aquellos explantes que correspondían a cúmulos de brotes múltiples, se disectaban en cúmulos más pequeños (Figura 14).

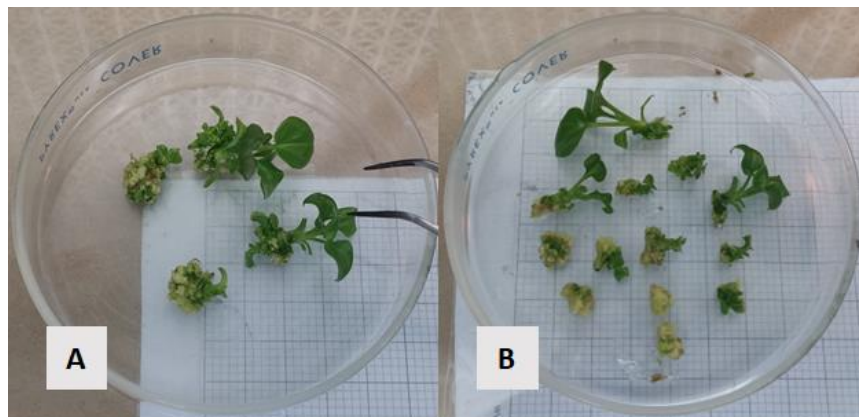


Figura 14. A) Cúmulos de brotes múltiples después de 6 semanas (2 subcultivos) en el medio 2 (MS con 2 mg BAP), B) Disección de los brotes múltiples para su elongación en un medio MS con AG₃.

Posteriormente, todos los tratamientos fueron subcultivados en un medio basal suplementado con sales MS al 100%, 10 mL/L de Coctel 22, 0.3 mg/L de Kinetina y 0.5 mg/L de AG₃, una giberelina empleada en el CTV para el alargamiento de los brotes.

Fueron subcultivados cada tres semanas (21 días), durante dos subcultivos. Los parámetros de evaluación para la elongación de los brotes fue el tamaño del explante, el número de hojas y en caso de presentar raíces, se contaron y midieron, esto de acuerdo con tres categorías; pequeñas (0.2 - 5.0 cm), medianas (5.2 – 15.0 cm) y grandes (>15.2 cm). Una vez que los brotes comenzaron a elongarse, no fue necesario inducir la etapa de enraizamiento, ya que, lo hicieron sin el estímulo de auxinas; sin embargo, para favorecer el proceso de aclimatización, todas las plantas fueron subcultivadas a un medio MS al 50% de su concentración original, sin ningún RCV.

4.7 Etapa IV. Aclimatización

Transcurridas 8 semanas en el medio MS al 50 % de su concentración original sin ningún RCV, se seleccionaron catorce plantas de manera aleatoria provenientes de cada uno de los medios de cultivo; control, 1, 2 y 3. Las plantas se retiraron de los frascos con medio de cultivo, se enjuagaron con agua de la llave para retirar cualquier residuo del medio y se sembraron en dos tipos de sustrato; agrolita y tierra negra y agrolita (2:1), (ambos esterilizados previamente) en charolas con 50 pozos con aproximadamente 100 cm³ y fueron cubiertas con una tapa de plástico transparente para permitir el paso de luz, mantener la humedad y con ello, lograr una mejor aclimatización, ambas charolas fueron colocadas en un cuarto de incubación con un fotoperiodo de 16 h luz, 8 h oscuridad, durante dos semanas, posteriormente se colocaron bajo condiciones de invernadero. En cuanto al riego, estas fueron regadas dos veces por semana con agua y fueron fertilizadas de acuerdo con la tabla 9. El parámetro de evaluación para esta Etapa fue el % supervivencia

Tabla 9. Fertilización de las plantas *T. xanadu* en la Etapa IV, aclimatizadas bajo condiciones de invernadero

Sustrato	Riego	
	Periodicidad	Composición
Agrolita	7 días	MS al 75% + BAP 1 mg/L + AIA 1 mg/L
Tierra negra:Agrolita (2:1)	15 días	MS al 25% + BAP 1 mg/L + AIA 1 mg/L

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Etapa 0. Selección y mantenimiento de las plantas madre

Como se mencionó, es de suma importancia mantener a las plantas madre, también conocidas como plantas donadoras de explantes, en las mejores condiciones sanitarias y con un control adecuado de nutrientes (González *et al.*, 2012). Para ello, todas las plantas, de las dos distintas fechas de ingreso al invernadero, se sometieron a un tratamiento de fertilización, logrando que las plantas donadoras de explantes crecieran a una tasa más rápida y a un tratamiento fitosanitario, para lograr una mejor eficiencia en cuanto al tratamiento de desinfección. En la figura 15, inciso A y C se puede observar a las plantas cuando recién llegaron al laboratorio, sus hojas difícilmente pueden verse lobuladas, los peciolo son más pequeños y el tamaño en general de las plantas, son más pequeñas. En el inciso B y D, se observan a las plantas, después de dos meses del programa fitosanitario y de fertilización, su tamaño es mayor, siendo más evidente el crecimiento a lo ancho, la mayoría de las hojas se pueden observar lobuladas y el número de hojas aumentó, lo que indica que los programas, tanto fitosanitario como de fertilización estimularon un buen desarrollo de las plantas y con ello, se cumplió el objetivo de esta etapa, contar con plantas donadoras de explantes sanas, fortalecidas y bien desarrolladas.



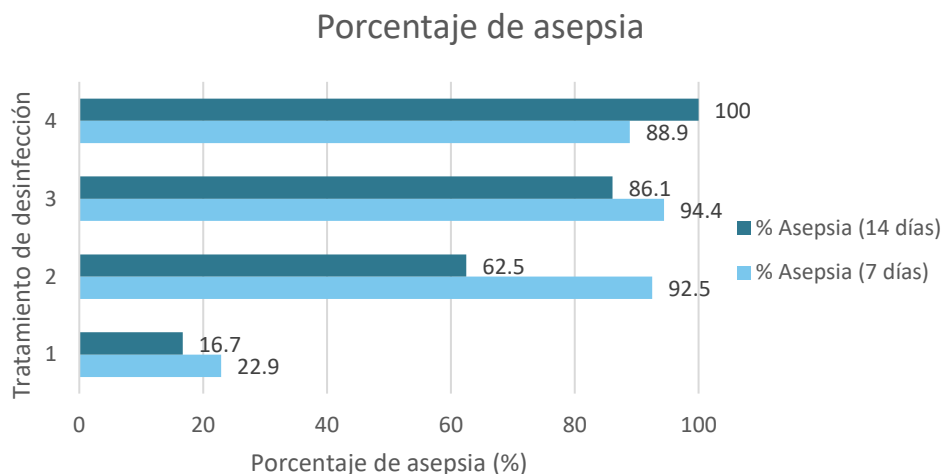
Figura 15. Plantas de *T. xanadu* A y C, antes del tratamiento fitosanitario y de fertilización, B y D, después de dos meses de tratamiento fitosanitario y de fertilización. A-B) Corresponden al primer lote, C-D) Corresponden al segundo lote.

5.2 Etapa I. Establecimiento de los cultivos asépticos

A pesar de que las plantas madre fueron sometidas a un tratamiento fitosanitario y de que los explantes fueron sometidos a distintos métodos de desinfección, se registró contaminación. De acuerdo con la gráfica 1, se puede observar la evaluación del porcentaje de asepsia a los 7 y a los 14 días. La primera evaluación se debe a que es el tiempo requerido para poder visualizar la contaminación por la presencia de algún microorganismo como hongo, bacteria o levadura; sin embargo, es importante destacar que no se realizó la identificación de éstos. Por otra parte, se realizó una segunda evaluación, debido a que aquellos explantes que presentaron contaminación a los siete días, fueron retirados del medio de cultivo correspondiente para poder ser desinfectados nuevamente tal y como se mencionó en el apartado de “*Materiales y métodos*” (Tabla 6, ver pág. 40), es por ello que, en el cuarto tratamiento de desinfección, se llegó a observar un mayor porcentaje de asepsia a los catorce días que a los siete días.

En cuanto al primer tratamiento, el porcentaje de asepsia de los explantes que se alcanzó inicialmente fue del 22.9%, disminuyendo gradualmente hasta un 16.7% a los catorce días, mientras que, los tratamientos dos y tres, presentaron un comportamiento muy similar con altos porcentajes de asepsia a los siete días, siendo del 92.5% y 94.4% respectivamente; sin embargo, estos valores descendieron a un 62.5% para el tratamiento número dos y 86.1% para el tratamiento número tres. No obstante, estos valores fueron descendiendo durante las siguientes dos semanas, hasta perder todo el material vegetal, debido a problemas de contaminación por algún microorganismo, aun cuando éstos se intentaron desinfectar en repetidas ocasiones.

En cambio, para el cuarto tratamiento, se observó un porcentaje de asepsia de 88.9% a los siete días, alcanzando un porcentaje del 100% al día catorce, posterior a la segunda desinfección. En comparación con los tratamientos anteriores, estos valores se mantuvieron igual durante las dos semanas posteriores, lo que indicó que el cuarto tratamiento de desinfección resultó eficaz para la desinfección de ápices y rizoma.



Gráfica 1. Porcentaje de asepsia de explantes de rizoma y ápices de *T. xanadu* a los siete y catorce días posterior a la siembra en el medio de cultivo correspondiente

La mayoría de los artículos publicados, concuerdan con el procedimiento de desinfección, partiendo con el uso de fungicidas y bactericidas. Chen *et al.*, (2012), decidieron tratar las plantas con Ridomil® y Mancozeb®, una semana antes de comenzar con el procedimiento de desinfección, mientras que Blanco & Valverde (2004); Lara-Ascencio *et al.*, (2021), expusieron los explantes únicamente durante 30 minutos con Benlate®, Agri-mycin® o Tokat®.

En el presente trabajo, se decidió emplear Captán 50 y Agrimycin-500 como un tratamiento fitosanitario durante la Etapa 0 y en la Etapa I, durante la desinfección. El primero de ellos tiene como ingrediente activo la carboxamida, una sustancia con actividad fungicida debido a que es un inhibidor que es capaz de unirse a varios sitios y se absorbe por medio de la vía radicular y foliar, interfiriendo en el proceso de respiración celular. Además, inhibe la germinación de las esporas, dificultando el crecimiento y desarrollo micelar (ADAMA, 2021a). Por otro lado, el agrimycin-500 cuenta con tres ingredientes activos, el sulfato de estreptomina, clorhidrato de oxitetraciclina y el sulfato tribásico de cobre, presentando una actividad bactericida y fungicida, por medio de su acción sistémica, inhibiendo la síntesis proteica, debido a la unión irreversible al ribosoma bacteriano, generando un bloqueo prematuro de la traducción o bien, la incorporación incorrecta de los aminoácidos (ADAMA, 2021b).

Posteriormente Blanco & Valverde (2004) emplearon etanol al 95% (v/v), mientras que Chen *et al.*, (2012) y Lara-Ascencio *et al.*, (2021), lo hicieron al 70% (v/v), puesto que el alcohol etílico, mejor conocido como etanol, es un compuesto orgánico bactericida, el cual se ha observado que tiene un poder deshidratante y en las bacterias, es capaz de disminuir la tensión superficial de la membrana celular desnaturalizando proteínas y con ello la destrucción bacteriana. Si bien, puede emplearse a 95% (v/v), se ha observado que, a esa concentración, su efecto bactericida disminuye, por lo que se sugiere emplear concentraciones entre el 60-80% (v/v) (Capra, 2020; Pumarola *et al.*, 1992), por lo que se decidió emplear a una concentración del 70% (v/v) durante 1 minuto.

Seguido del etanol, se empleó una solución de NaOCl, un compuesto inorgánico, halogenado y bactericida que se caracteriza por su efecto oxidante. Cuando éste se diluye en agua, se puede encontrar el ácido hipocloroso (HClO) e iones hipoclorito (ClO⁻). El HClO penetra por medio de la difusión pasiva las paredes y membranas de las bacterias, afectando componentes de la membrana, degradando lípidos y proteínas e interrumpiendo la síntesis del ADN, mientras que los iones ClO⁻ pueden generar su oxidación. Además, la adición de Tween® 20, un surfactante no iónico, ayuda a reducir la tensión superficial, permitiendo una mayor difusión de las sustancias empleadas (Muñoz-Castellanos *et al.*, 2022). En cuanto a la concentración de NaOCl, ésta puede variar dependiendo de la especie y el tipo de explante. Para el primer tratamiento de desinfección, se empleó una solución de NaOCl al 0.21% (v/v), muy similar a la concentración empleada por Lara-Ascencio *et al.* (2021) para la desinfección de brotes axilares de esta misma especie, sin embargo, a pesar de que se incremento el tiempo de contacto con esta solución, así como la adición de antibióticos y antifúngicos en el último enjuague, los resultados son muy similares, incluso un poco más bajos a los reportados por Lara, ya que ellos reportan un 25.7% de asepsia, en comparación con el 16.7% obtenido a los catorce días.

Para el segundo tratamiento, la concentración de NaOCl se incremento a un 0.42% (v/v), la razón por la que aumentó a ese valor y no a 1.0% (v/v) como menciona

Chen *et al.* (2012) o 1.0 y 3.5% (v/v) como Blanco & Valverde (2004), es porque en el primer tratamiento de desinfección se observó un mayor porcentaje de tejido vegetal oxidado, lo cuál pudo ser generado por las soluciones empleadas, y al no saber con certeza de que el NaOCl fuera la causa de dicha oxidación, se decidió aumentar la concentración de antioxidantes, así como la adición de un polímero, tanto en el medio de cultivo como a la solución de antioxidantes a los tratamientos posteriores, lo que fue suficiente para controlar la oxidación, permitiendo el aumento en la concentración de NaOCl, obteniendo un 62.5% de asepsia para el catorceavo día. Para el tercer tratamiento y cuarto tratamiento, la concentración de NaOCl fue de 0.9% (v/v) muy similar al tratamiento reportado por Blanco & Valverde (2004) para la desinfección de yemas apicales y laterales de *P. corcovadense*, reportando un 90% de asepsia, concordando con el 86.1% y 100%, respectivamente.

Si bien, el incremento en el porcentaje de asepsia, no se debe únicamente a estas modificaciones, sino también al uso de antibióticos y antifúngicos, pues a pesar de que ningún autor reportó el uso de ellos, existen microorganismos llamados *endofíticos* los cuales se encuentran dentro de los tejidos y son benéficos, pero bajo condiciones *in vitro*, éstos se convierten en contaminantes y son más complicados de eliminarse. Una de las maneras para eliminarlos es el uso de antibióticos y antifúngicos (Suárez, 2020), los cuales fueron adicionados durante la desinfección y en el medio de cultivo, aunque esto puede ser contraproducente causando daño en las células vegetales y no necesariamente mata a todos los microorganismos; en ocasiones, solo detienen su multiplicación, reanudándose tras la degradación del medicamento o al subcultivarse en uno que carezca de su uso (Pérez- Molphe, *et al.*, 1999). A pesar de ello, para esta especie en particular se observó que mientras mayor sea el tiempo de contacto de los antibióticos y antifúngicos con el explante, el porcentaje de asepsia incrementará, tal es así, que para el cuarto tratamiento, se pasó de 24 h a 120 h (5 días) obteniendo inicialmente un 88.9% de asepsia, alcanzando el 100% de asepsia a los catorce días, posterior a la segunda desinfección (Tabla 6, ver pág. 40).

En cuanto a los antibióticos empleados se encuentra la cefotaxima, perteneciente al grupo de las cefalosporinas de tercera generación y el meropenem, ambos se encargan de inhibir la síntesis de la pared bacteriana tanto en bacterias Gram-positivas, como en Gram-negativas, ligándose de manera covalente a las proteínas de unión a penicilina (PBPs) (FacMed, 2005; AEMPS-CIMA, 2019).

Por otra parte, los antifúngicos empleados fueron la terbinafina, un medicamento de amplio espectro frente a patógenos de la piel, pelo y uñas, interfiriendo en el primer paso de la biosíntesis del esterol fungico, causando una deficiencia del mismo y a su vez, generando una acumulación intracelular del escualeno, produciendo la muerte celular del hongo (AEMPS-CIMA, 2008). Por otro lado, la nistatina es capaz de unirse a los esteroides de la membrana celular, generando la formación de canales iónicos, cambios en la permeabilidad de la membrana y con ello, la salida de elementos intracelulares (AEMPS-CIMA, 2022).

En cuanto a los microorganismos observados en los explantes contaminados, predominaron los hongos, este comportamiento se observó en los cuatro tratamientos de desinfección y su apariencia, se puede observar en la Figura 16.

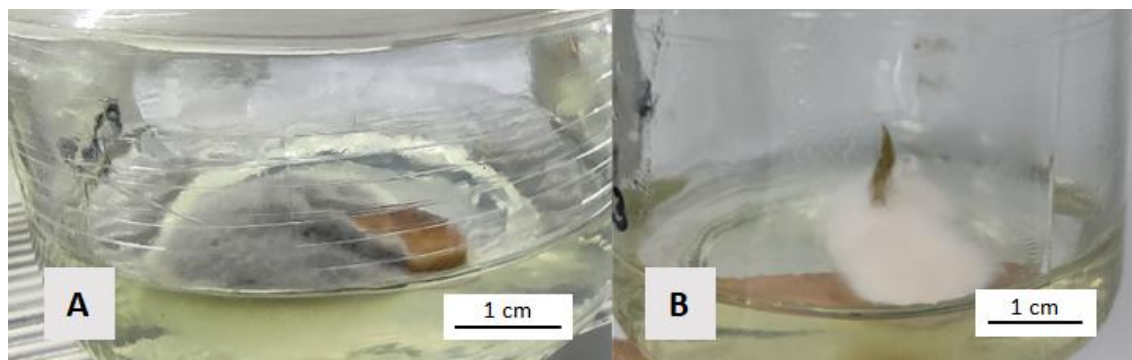


Figura 16. Explantes contaminados por hongos, posterior a 7 días de su cultivo en el medio correspondiente, A) Rizoma con un hongo de aspecto grisáceo, B) Ápice con un hongo de aspecto blanquecino.

Sin embargo, la combinación del tratamiento de desinfección, junto con los medicamentos empleados, permitió establecer asépticamente ápices, los cuales se observan en la Figura 17, mostrando respuesta bajo las condiciones *in vitro* como lo demuestra el crecimiento de las hojas, así como el cambio de color, tornándose de color verde, ya que, ante la presencia de algún microorganismo, como los

hongos, comienza a consumir los recursos del medio de cultivo, generando sustancias de desecho que pueden resultar tóxicas para el explante, causando gradualmente la oxidación y con ello, la muerte del tejido vegetal.



Figura 17. Yemas asépticas de *T. xanadu*, correspondientes al cuarto tratamiento de desinfección y posterior a 7 días de su cultivo en el medio Ph-2 (MS con 2 mg/L BAP).

Una de las posibles razones por la que los primeros protocolos no resultaron efectivos, pudo deberse al uso de rizoma y el ápice como explantes. Esto debido a que el rizoma se encuentra dentro del sustrato, y por ende está más en contacto a un mayor número de microorganismos, en cambio el ápice apical, se encuentra en la parte externa del sustrato y además se encuentra resguardada por los primordios foliares, disminuyendo la carga microbiana. Por lo tanto, el disminuir el tamaño del explante, permitió disminuir los microorganismos, así como una mejor interacción entre los agentes químicos con el explante. Además, el tiempo del tratamiento fitosanitario, fue menor en el primer tratamiento de desinfección, siendo de 4 semanas e incrementando a 10 semanas para el tercer y cuarto tratamiento. Si bien, Lara-Ascencio *et al.* (2021), menciona que el uso de bactericidas y fungicidas como pre-tratamiento en las plantas madre no es suficiente para obtener un cultivo *in vitro* de esta especie 100% aséptico, esto no concuerda con lo obtenido, pues se logró establecer un protocolo para el establecimiento de cultivos 100% asépticos de *T. xanadu* haciendo uso de estas sustancias.

Otro de los parámetros que fueron evaluados durante la Etapa I, fue el porcentaje de oxidación, un parámetro cualitativo, el cual fue evaluado por medio del cambio

de coloración de un tono verde o ligeramente amarillo a uno café-negro, esto dependiendo de la oxidación del tejido vegetal. Este cambio de coloración es generado posterior a las heridas que se hacen a los explantes tras realizar algún corte o su interacción con alguna sustancia desinfectante, ya que, son capaces de generar especies reactivas de oxígeno y compuestos fenólicos, que al entrar en contacto con el ambiente son oxidados causando su oscurecimiento y generando radicales libres, que son tóxicos para el explante (Pérez-Molphe *et al.*, 1999).

En la Figura 18, se pueden observar diferentes porcentajes de oxidación del explante. En el inciso A se muestra el explante menos oxidado, esto es, el que presenta un máximo del 10% o menos del área del tejido oxidado, mientras que en el inciso F, se presenta el parámetro más alto de oxidación, que va del 80 al 100% del área del tejido, dicha oxidación es capaz de provocar un cambio en la coloración del medio de cultivo.

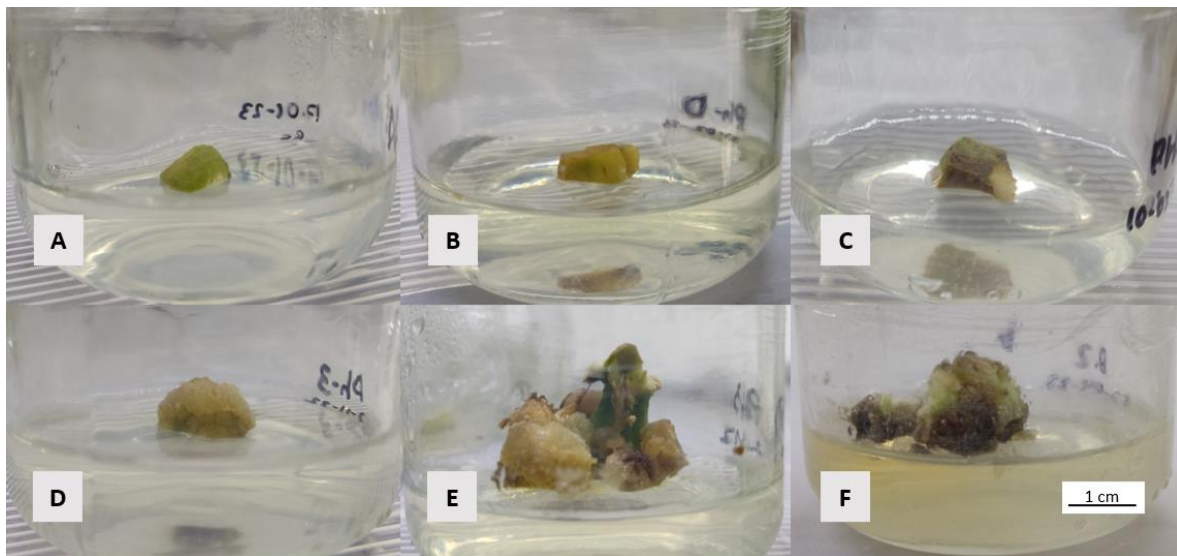
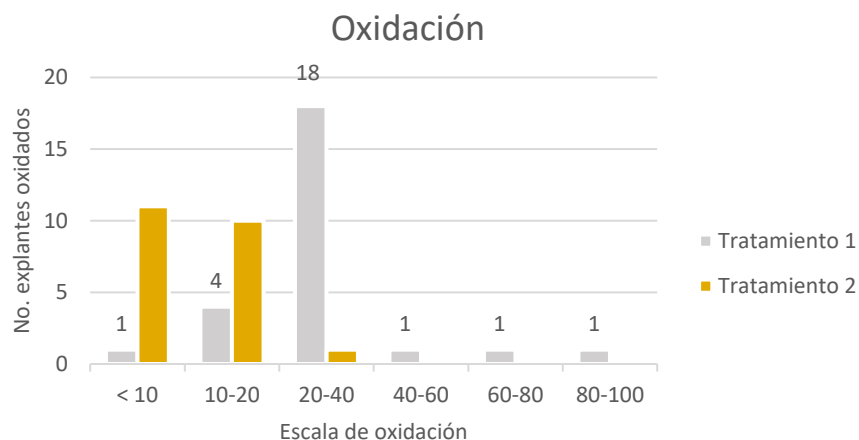


Figura 18. Escala de oxidación de explantes de rizoma y ápice (E) de *T. xanadu* posterior a 21 días de su cultivo en el medio de cultivo correspondiente. A) Corresponde a <10% de oxidación del rizoma, B) 10-20%, C) 20-40%, D) 40-60%, E) 60-80% y F) 80-100% del tejido.

Los resultados de la Gráfica 2 corresponden a la oxidación observados en el primer (gris) y segundo tratamiento (amarillo) de desinfección, los cuáles fueron el resultado del tipo de desinfección, así como la concentración de antioxidantes que se emplearon en los medios de cultivo; Ph-1, Ph-2, Ph-3, Ph-4 (Tabla 7). En el primer tratamiento, el medio presentó una concentración menor de ácido cítrico y ácido

ascórbico, siendo de 100 mg/L de cada antioxidante, además, carecían de PVP. Como se observa, la mayoría de los explantes mostraron entre un 20-40% de oxidación en el tejido, no obstante, un par de ellos, alcanzó valores entre el 40-100%.

Posterior a los resultados obtenidos en el primer tratamiento de desinfección, referente a la oxidación, se optó por aumentar la concentración de ácido cítrico y ácido ascórbico a 150 mg/L, así como la adición de PVP a una concentración de 250 mg/L para el segundo tratamiento de desinfección. Como resultado, la mayoría de los explantes presentaron entre <10-20% de oxidación, así mismo, se observó una mejoría en cuanto a la presencia de fenoles en el medio de cultivo, gracias a la adición de PVP, pues este se encarga de adsorber dichos compuestos a través de puentes de hidrógeno (Pérez-Molphe *et al.*, 1999).

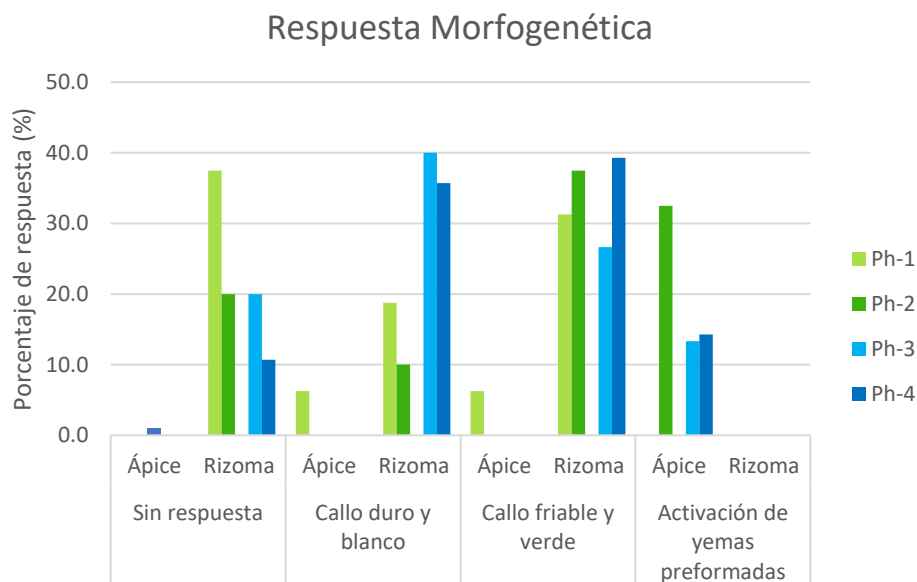


Gráfica 2. Porcentaje de oxidación de los explantes de rizoma y ápices, correspondiente al primer y segundo tratamiento de desinfección, posterior a 14 días de su cultivo.

A pesar de que Blanco & Valverde (2004), fueron los únicos autores que mencionan el necrosamiento de algunos explantes pequeños, no mencionan la adición de antioxidantes o adsorbentes para solucionar esta problemática.

Finalmente, el último parámetro que se evaluó durante esta etapa fue el tipo de respuesta morfogénica, para ello, se evaluó dos posibles respuestas, la formación de callo o la formación de brotes a partir de la activación de yemas preformadas, empleando las sales MS con la citocina BAP.

La gráfica 3 muestra los resultados de la respuesta morfogénica dependiendo del medio de cultivo y del explante, posterior a 14 días de su inducción. En ella, se observa que el medio de cultivo que presentó mayor porcentaje de explantes sin respuesta, fue el Ph-1, con el 37.5%, seguido del Ph-2, Ph-3 y Ph-4, con 25.8%, 20% y 10.7% respectivamente, estos explantes correspondían a porciones de rizoma.



Gráfica 3. Respuesta morfogénica de explantes de rizoma y ápices, de acuerdo con el medio de cultivo y posterior a 14 días de su cultivo.

En cuanto a los explantes de rizoma que sí mostraron respuesta, todos ellos formaron callo, sin embargo, se presentó dos tipos de callo, uno de ellos correspondió a un callo duro generalmente de color blanco (Figura 19A), mientras que el otro, se caracterizó por ser friable, generalmente de color verde o ligeramente amarillo (Figura 19B).

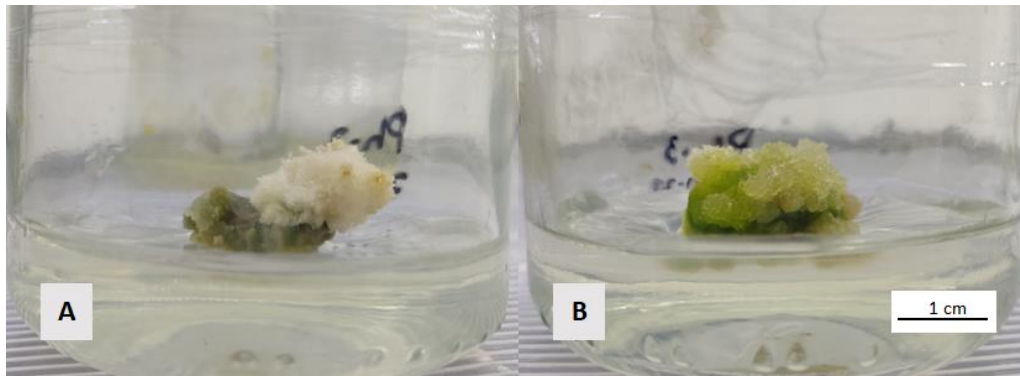


Figura 19. Tipos de callos observados en explantes de rizoma posterior a 14 días, A) Rizoma con callo duro de color blanco en medio Ph-4, B) Rizoma con callo friable de color verde o ligeramente amarillo en medio Ph-3

Si bien, ambos tipos de callo se generaron en todos los medios, en el medio Ph-1 y Ph-2, predominó la formación de callo duro y blanco con un 31.2% y 48.3%, mientras que en el medio Ph-3, predominó ligeramente el callo friable y verde con 40%, mientras que el medio Ph-4 tuvo un porcentaje de respuesta bastante similar para ambos callos, con un 35.7% para el callo duro y 39.3% para el callo friable.

En cuanto, al tipo de respuesta observada en los ápices, ésta varió de acuerdo con el medio de cultivo empleado. En el caso del medio Ph-1 (Fig. 20A, 20B), el ápice no mostró crecimiento o la activación de la yema preformada, solo adquirió un color verde, así como el crecimiento de ambos tipos de callo, duro y friable, sin embargo, esto causó su oxidación y más adelante, la muerte del tejido vegetal. Este comportamiento, fue muy similar para el medio Ph-3 (Fig. 20E, 20F), solo que los explantes se oxidaron en un menor tiempo. En el caso del medio Ph-4 (Fig. 20G, 20H), se observó el crecimiento de un callo duro y blanco en la parte basal del ápice, al mismo tiempo, comenzó a elongarse y a adquirir un color verde y para el día 14, las hojas comenzaron a emerger. Por último, el medio Ph-2 (Fig. 20C, 20D), mostró un color verde, un alargamiento de los peciolo, así como la formación de una lámina foliar para el día 7, mientras que para el día 14, se observó más de una hoja, así como la aparición de un nuevo brote.

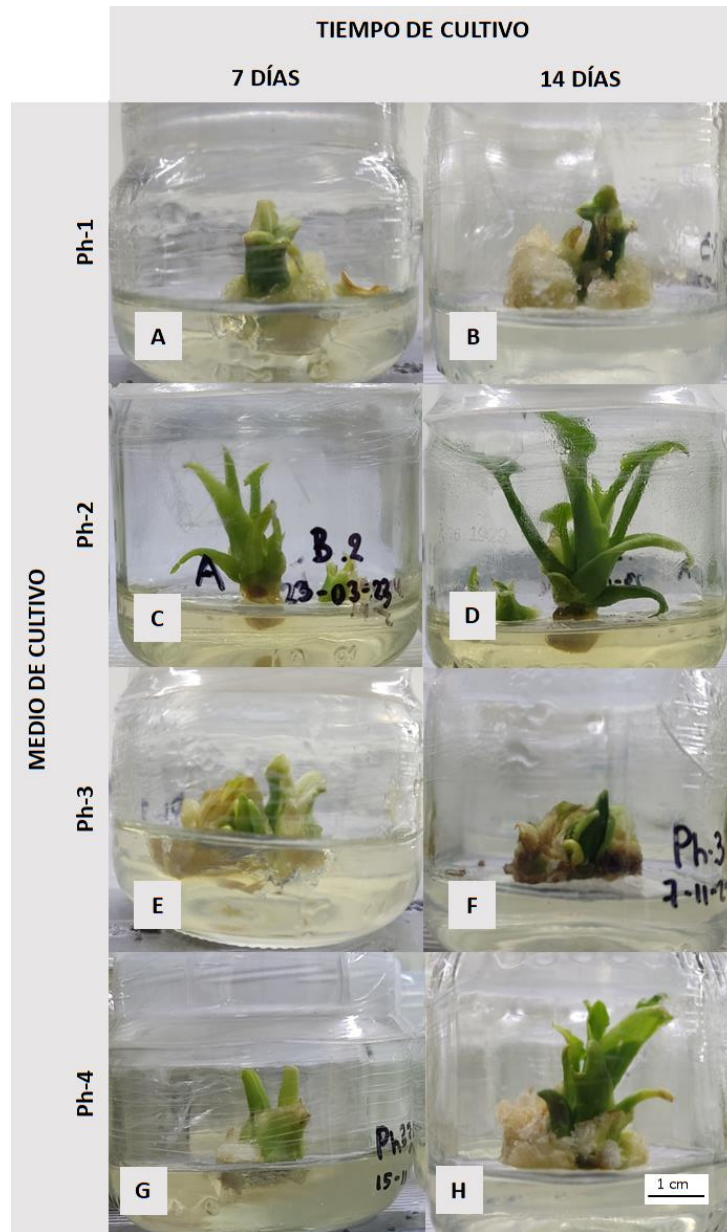


Figura 20. Respuesta morfogénica de los ápices de *T. xanadú*, de acuerdo con el medio de cultivo correspondiente. A, C, E, G) Corresponde a los 7 días de su cultivo, B, D, F, H) Corresponde a los 14 días de su cultivo.

Este comportamiento concuerda con lo reportado por Hee Han & Mo Park (2008), en donde se observó que a una mayor cantidad de BAP, se da la formación de un callo duro en la parte basal del explante, cubriendo incluso las puntas de los brotes e inhibiendo su respuesta. Así mismo observaron la necrosis del tejido y pérdida de clorofila, tal y como se observó en el medio Ph-3 y Ph-4, los cuales estaban suplementados con 7 mg/L de BAP, mientras que el medio Ph-2 con 2 mg/L BAP

presentó una menor cantidad de callo, lo que le permitió la activación de las yemas más rápido.

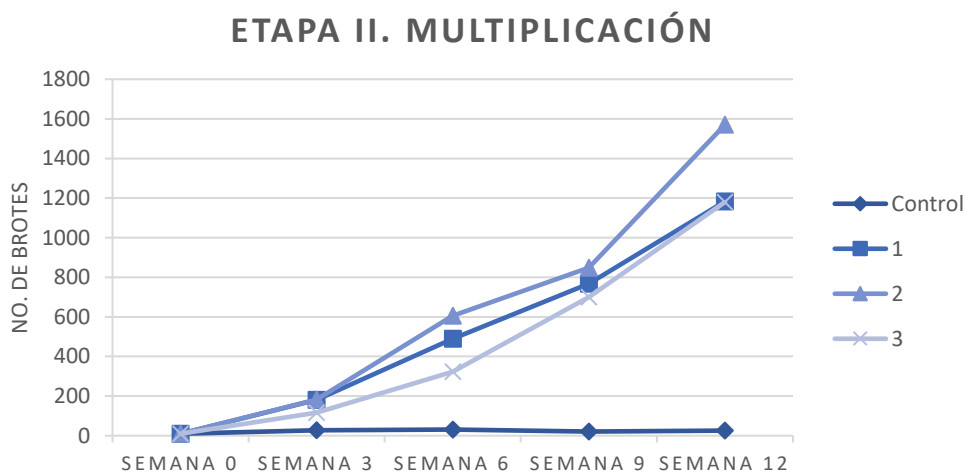
Sin embargo, en el medio Ph-1, también se observó un callo duro y friable, lo cual, a pesar de tener 2 mg/L de BAP, una concentración menor a la que reportan dichos autores, fue capaz de generar una gran cantidad de callo, inhibiendo la activación de las yemas, causando incluso su oxidación y más tarde su muerte. Esta respuesta pudo generarse debido a la alta concentración de adenina empleada, pues a pesar de que la adenina se emplea para estimular la embriogénesis sómica e inducir la formación de brotes, también es capaz de generar callo. Así mismo, se sabe que el precursor de las citocininas es la adenina por lo que, pudo inducir la síntesis de citocininas de manera natural, aumentando su concentración, favoreciendo la división celular y por consecuencia el crecimiento de callo.

Es por ello que, para el tercer tratamiento de desinfección, únicamente se empleó el medio Ph-2 y Ph-4, ya que la vía de regeneración que se buscaba era la organogénesis directa. No obstante, el medio Ph-4 generó una mayor cantidad de callo duro y blanco en los explantes de ápice, aunado a esto, la concentración de RCV, BAP, era más alto, lo cual se traducía en un mayor costo. Por consiguiente, se optó por elegir para el último tratamiento de desinfección, el medio Ph-2 y como explante, únicamente el ápice, en donde se observó el 100% de la activación de las yemas preformadas y con ello, la generación de nuevos brotes.

5.3 Etapa II. Multiplicación

Después de pasados 4 subcultivos en el medio de inducción, se disectaron brotes individualizados para ser sembrados en un medio MS sin RCV, BAP con 1 y 2 mg/L y BAP con Kinetina ambos a 1 mg/L. Si bien, existen otras citocininas capaces de inducir la formación de brotes, se ha reportado que éstas producen tasas de multiplicación más bajas, un ejemplo de ello, es el 2ip, el cuál se cree que es debido a un doble enlace en su estructura química, volviendolo más vulnerable a las citocininas oxidasas (Alawaadh *et al.*, 2020); mientras que el TDZ, además de generar tasas de multiplicación bajas, también se ha reportado la generación de brotes atrofiados y en algunas especies genera brotes necróticos e incluso induce la formación de callo (Hee Han & Mo Park, 2008). Es por ello, que se optó por inducir la multiplicación de brotes adventicios con BAP.

La gráfica 4 muestra el número de brotes totales después de 4 subcultivos, correspondientes a 5 de las 10 repeticiones que se generaron, esto debido a que las repeticiones restantes, fueron utilizados en la Etapa III, en la semana 6. En la gráfica 4, se puede observar el efecto de la adición de citocininas, el cual tuvo un impacto positivo en la formación de brotes, pues en el control se obtuvieron 25 brotes totales, mientras que el medio 1, alcanzó 1183 brotes, el medio 2 acumuló 1570 brotes y el medio 3, generó 1180 brotes totales, muy similar al medio 1.



Gráfica 4. Número de brotes totales de acuerdo con el medio de cultivo correspondiente

En la Tabla 10, se observa el número de brotes adventicios por explante correspondientes a la semana 12, en donde el medio de cultivo que generó un mayor número fue el 1 (1 mg/L BAP) con 42.13 brotes por explante, seguido del medio 2 (2 mg/L BAP) y 3 (1 mg/L BAP + 1 mg/L Kinetina) con 40.68 y 39.25 brotes, respectivamente. Tras realizar una prueba de Tukey, se demostró que no existen diferencias significativas, entre ellos, mientras que, con el control, sí se observó diferencias significativas, pues se generó 1.33 brotes por explante.

Tabla 10. Número de brotes por explante \pm desviación estándar después de 12 semanas en el medio de cultivo correspondiente. Letras distintas (^a) indican diferencias significativas.

Medio de cultivo	Control	1	2	3
No. de brotes por explante	1.33 \pm 0.39 ^a	42.13 \pm 6.03 ^b	40.68 \pm 6.27 ^b	39.25 \pm 4.45 ^b

Esto concuerda con lo reportado por Chen *et al.*, (2012), quienes obtuvieron entre 40.8- 49.4 brotes por explante para tres especies de *Thaumatococcus*, *imperial Green*, *Red* y *Rainbow*, empleando 1 mg/L de BAP; además, se percataron que al disminuir la concentración de BAP a 0.5 mg/L, estos números se elevaron hasta 50.4 brotes por explante. Por otra parte, Alawaadh *et al.*, (2020), reporto para *T. bipinnatifidum* Schott ex Endl. un mayor número de brotes en el medio adicionado con 1 mg/L BAP, sin embargo, solo genero 6.3 brotes por explante, mientras que el medio con 2 mg/L BAP fue de 4.3. Caso contrario reporto Blanco & Valverde (2004), quienes para *T. corcovadense*, observaron una mejor tasa de multiplicación empleando una alta concentración de BAP, 7 mg/L, con 3 mg/L de Kinetina, generando 3 brotes por explante a las 4 semanas. Estas diferencias en el número de brotes por explante, obtenidos en este trabajo y en comparación con lo reportado por otros autores, indican diferencias entre especies del mismo género.

Si bien, el uso de citocininas es necesario para inducir un elevado número de brotes, no se encontraron diferencias significativas entre las concentraciones de RCV empleados y el número de brotes generados, sin embargo, se observaron diferencias cualitativas. En la figura 21, se observan algunos brotes regenerados de acuerdo con el medio de cultivo. En el inciso A, se observa el control, los brotes regenerados son en menor cantidad, tienen mayor altura, mayor cantidad de hojas

e incluso se puede observar la aparición de raíces. En el inciso B, se observa el medio 1, donde los explantes poseen un mayor número de brotes en comparación con el control, tiene una gran cantidad de hojas y un tamaño similar al control, sin embargo, en algunos explantes se observaron zonas de color amarillo, en donde se diferenciaron muchos brotes incipientes, es decir, brotes muy poco desarrollados. Algo similar se observó en el medio 2 (inciso C), solo que por lo menos, la mitad de los brotes tenían esta característica, incluso se observaron zonas blanquecinas en donde se volvió a observar el crecimiento de un callo duro y blanco, inhibiendo incluso el crecimiento de los brotes. Finalmente, en el inciso D, se observan los brotes regenerados en el medio 3, estos tienen una apariencia bastante similar al control, aunque son más brotes, sin embargo, en su mayoría estos son ligeramente más pequeños.

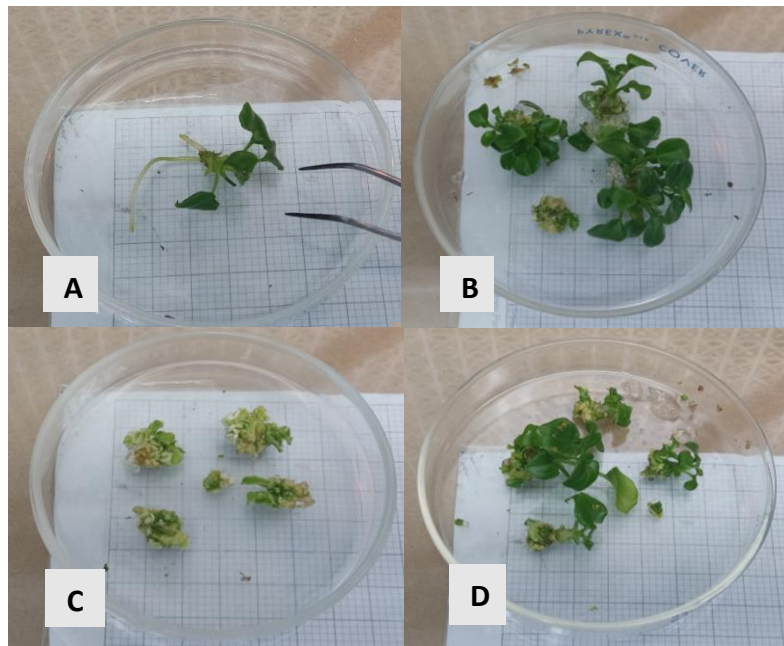


Figura 21. Brotes regenerados después de 3 semanas en el medio de cultivo correspondiente. A) Control, B) Medio 1 con 1 mg/L BAP, C) Medio 2 con 2 mg/L BAP, D) Medio 3 con 1 mg/L BAP + 1 mg/L Kinetina.

En la Figura 22, se observan los brotes regenerados observados bajo un microscopio estereoscópico, en donde se pueden observar de manera más detallada, las diferencias antes mencionadas, entre los medios de cultivo 1, 2 y 3.

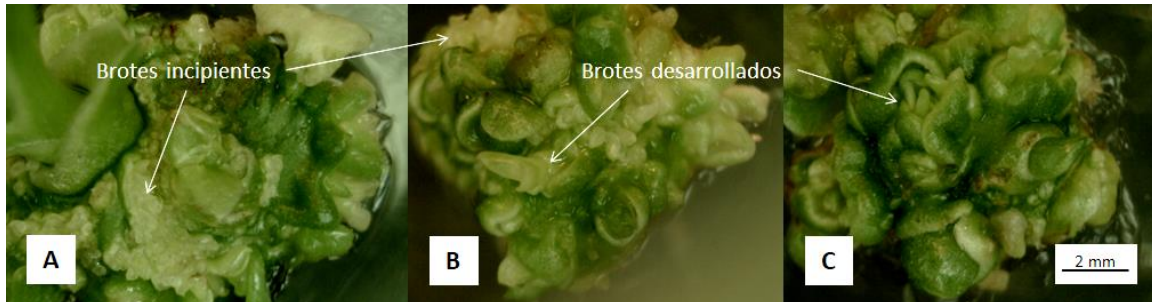


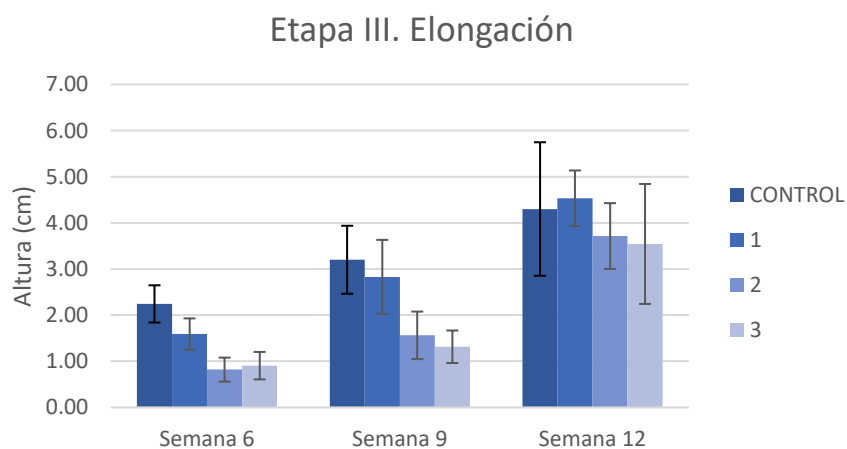
Figura 22. Brotes regenerados posterior a 3 subcultivos (9 semanas), observados bajo un microscopio estereoscópico, A) Brotes en el medio de cultivo 1 con 1 mg/L de BAP, B) Brotes en el medio 2 con 2 mg/L de BAP y C) Brotes en el medio 3 con 1 mg/L de BAP + 1 mg/L Kinetina.

Si bien el medio 2, suplementado con 2 mg/L de BAP fue el que más número de brotes generó, gran parte de ellos, se caracterizaron por ser brotes incipientes, es decir, brotes muy poco desarrollados y ausentes de coloración verde. Algo similar se observó en cultivos de brotes de *Asparagus plumosus*, los cuáles al emplear concentraciones de 2-10 mg/L de cualquier citocinina, mostraban el crecimiento de brotes compactos parecidos a callos, los cuales crecían alrededor de los nudos, una manera de solucionarlo fue disminuyendo la concentración de citocininas a 0.2 mg/L (George & Sherrington, 1984). Esto podría ser la razón por la que los brotes del medio 1, tuvieron un mejor desarrollo, pues todos los brotes, provenían de un medio de cultivo para la inducción de ápices, el cual estaba suplementado con 2 mg/L de BAP, la misma concentración que el medio 2, lo cual para esta etapa mostró ser contraproducente para el desarrollo de los brotes. Mientras que los brotes del medio 1 con 1 mg/L de BAP, al presentar esta reducción en la concentración de citocinina, se desarrollaron de manera óptima. Por lo tanto, el medio de cultivo que generó la formación de brotes múltiples y viables es el medio 1, suplementado con 1 mg/L de BAP.

5.4 Etapa III. Elongación y enraizamiento

Cinco de las diez repeticiones que se tuvieron en la Etapa II para cada uno de los tratamientos, incluido el control, fueron transferidos a un medio MS adicionado con 0.3 mg/L de Kinetina y 0.5 mg/L de AG₃. Algunos autores, optan por emplear el mismo medio de cultivo usado para la multiplicación en la Etapa III. Elongación.

Tal es el caso de Alawaadh *et al.*, (2020), quien reportó en su control una altura de 6.24 cm, mientras que en el medio adicionado con 1 mg/L de BAP fue de 4.29 cm y en el medio con 2 mg/L de BAP fue con 3.65 cm, esto tras 6 semanas de cultivo. Sin embargo, los datos no concuerdan con lo obtenido para esta especie (*T. xanadu*), debido a que en la gráfica 5, se observa la elongación que presentaron los brotes después de 6 semanas empleando el medio de cultivo suplementado con el mismo RCV, justo antes de inducir el alargamiento (Semana 6). En él, los brotes de menor tamaño eran los provenientes del medio 2 y 3, con una altura promedio de 0.82 y 0.90 cm, mientras que los de mayor tamaño, fueron los brotes provenientes del control con una altura de 2.24 cm, seguidos del medio 1 con 1.59 cm. Es por ello, que se optó por inducir la elongación de los brotes empleando AG₃, ya que de lo contrario los explantes seguirían en una constante multiplicación, pero sin elongarse.



Gráfica 5. Elongación de los brotes durante 6 semanas en el medio de cultivo para elongación, provenientes del medio de cultivo control, 1, 2 y 3.

Pasadas las 6 semanas en el medio con AG₃ y Kinetina, los brotes de mayor tamaño fueron los provenientes del control y el medio 1, alcanzando una altura promedio de 4.30 y 4.53 cm, respectivamente, mientras que los de menor tamaño, seguían siendo los del medio 2 y 3, con una altura de 3.71 y 3.54 cm. Sin embargo, no todos los brotes fueron capaces de elongarse, pues aquellos que eran demasiado pequeños terminaron por oxidarse (Figura 23), concordando con lo reportado por Blanco & Valverde (2004) quienes, durante el establecimiento, observaron que los explantes pequeños se necrosaban con facilidad, por lo que, para tener un mayor porcentaje de brotes elongados, se sugiere que estos sean más grandes y desarrollados.

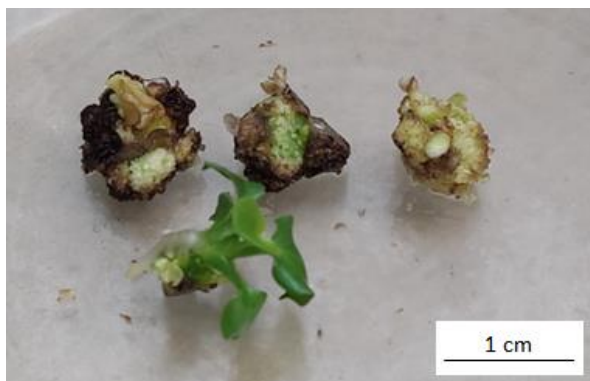
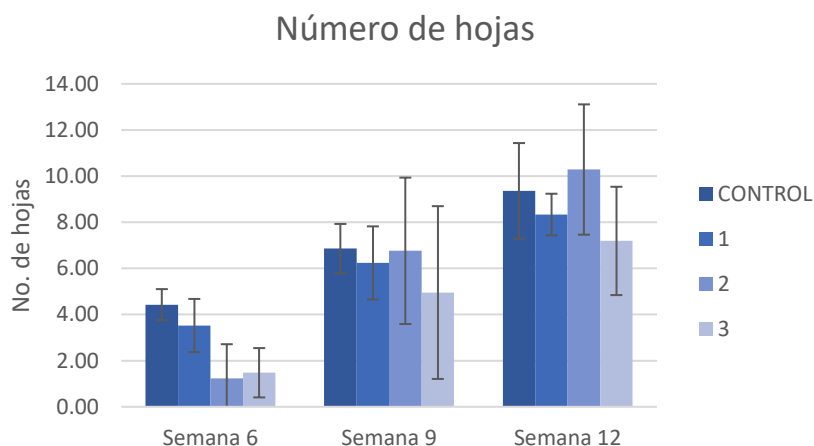


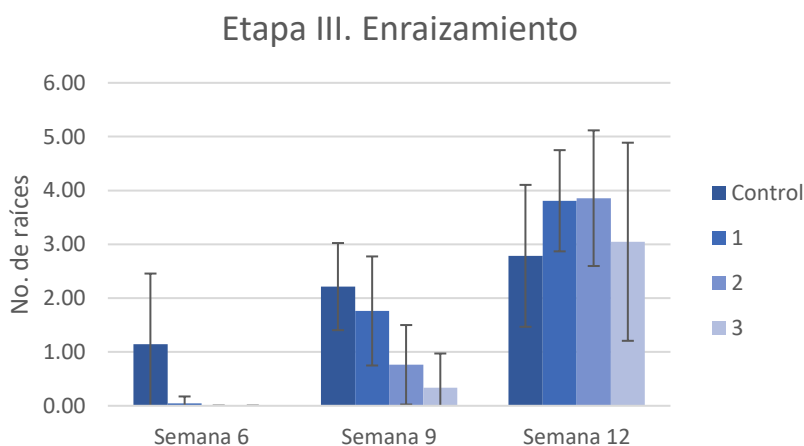
Figura 23. Brotes provenientes del medio de cultivo 2, posterior a 3 semanas en el medio para su elongación.

En cuanto al número de hojas promedio por explante (Gráfica 6), el medio control fue el que más hojas tuvo antes de la inducción con AG₃ pues presentó 4.43 hojas, seguido del medio 1, 3 y 2, con 3.52, 1.48 y 1.24 hojas. Posterior a las 6 semanas en el medio con AG₃, el número de hojas se vio favorecido en aquellos explantes provenientes del medio 2 con un promedio de 10.2, seguido del control con 9.36 y del medio 1 y 3, con 8.33 y 7.19 hojas.



Gráfica 7. Número de hojas por explante durante 6 semanas en el medio de cultivo para elongación, provenientes del medio de cultivo control, 1, 2 y 3.

Si bien, aun no se adicionaban auxinas al medio para favorecer el enraizamiento, al inicio de la inducción para la elongación de los brotes provenientes del medio control ya presentaba raíces, en promedio eran 1.31 por explante, mientras que los del medio 1, también presentaron raíces, solo que éstos tenían en promedio 0.13 raíces, el resto de los brotes carecían de ellas (Gráfica 7).



Gráfica 6. Número de raíces por explante durante 6 semanas en el medio de cultivo para elongación, provenientes del medio de cultivo control, 1, 2 y 3.

Después de 6 semanas en el mismo medio para elongación, absolutamente todos los brotes, independientemente del medio de cultivo del que provenían en la Etapa II, presentaron raíces, siendo los brotes provenientes del medio 1 y 2, los que mayor número de raíces formaron, con 3.81 y 3.86 raíces, seguidos del medio 3 con 3.05 y finalmente el control con 2.79 raíces por explante. Estos resultados concuerdan

con lo reportado por Blanco & Valverde (2004) y Lara-Ascencio (2023), quien para la especie *T. corcovadense* y *T. xanadu* no requirió el uso de auxinas para inducir el enraizamiento.

En la tabla 11, se muestran los resultados posteriores a 6 semanas (41 días) en el medio MS con kinetina y AG₃, en donde se observa el promedio de la altura, el número de hojas y el número de raíces por planta, más su desviación estándar. Sumado a eso, se realizó una prueba estadística ANOVA, en donde se observó que no existen diferencias significativas, entre los explantes provenientes de los diferentes medios de cultivo, por lo que el tipo y concentración de RCV empleado en la etapa II. Multiplicación, no presentó algún impacto durante la Etapa III.

Tabla 11. Parámetros de evaluación; Altura, No. de hojas y no. de raíces por planta ± desviación estándar después de 6 semanas en el medio de cultivo para elongación. Medias con letras iguales (^a) en una columna no son estadísticamente diferentes.

Brotes provenientes del medio de cultivo	Altura por planta (cm)	No. de hojas por planta	No. de raíces por planta
Control	4.30 ± 1.45 ^a	9.36 ± 2.08 ^a	2.79 ± 1.32 ^a
1	4.53 ± 0.60 ^a	8.33 ± 0.90 ^a	3.81 ± 0.94 ^a
2	3.71 ± 0.71 ^a	10.29 ± 2.82 ^a	3.86 ± 1.26 ^a
3	3.54 ± 1.30 ^a	7.19 ± 2.35 ^a	3.05 ± 1.84 ^a

Lara-Ascencio *et al.*, (2023), reportó el crecimiento de plantas de la misma especie, *T. xanadu*, de acuerdo con la composición de los macro y micronutrientes y en ausencia de RCV. En cuanto al empleo de sales MS al 100% y al 50%, no se encontraron diferencias significativas en la altura, número de hojas y número de raíces. Al inicio, los brotes presentaron una altura de 2 cm, con 3 hojas y ausencia de raíces, posterior a 50 días, los brotes en el medio MS al 100% alcanzaron una altura de 3.2 cm, 8.3 hojas y 2.03 raíces. En comparación, con los resultados obtenidos en este trabajo (Tabla 11), el promedio en la altura de los brotes varió de 3.54- 4.53 cm, el número de hojas fue de 7.19- 10.29 y el número de raíces fue entre 2.79- 3.86, esto dependiendo del medio de cultivo del cual provenían (Control, 1, 2 y 3).

En cuanto al tamaño de las raíces, se decidió establecer 3 categorías; pequeñas, medianas y grandes. En la tabla 12, se observan los resultados expresados en porcentajes. En ella, se visualiza que las plantas provenientes del medio control presentó un mayor porcentaje de raíces dentro de la categoría medianas y grandes, con un 40.6 y 37.5 %, para aquellas que provienen del medio 1, predominaron las raíces medianas, con un 54.4%; mientras que para el medio 2, predominaron las pequeñas con el 52.5%, seguidas de las medianas con un 40%, lo mismo ocurre con el medio 3, obteniendo un 42.2% para las pequeñas y un 48.4% para las medianas. La razón de ello es debido a que el control ya presentaba raíces, incluso antes del subcultivo con AG₃ y kinetina, mientras que para el resto de los brotes se tuvo que retirar el BAP, con la finalidad de disminuir la multiplicación y favorecer la aparición de las raíces.

Tabla 12. Tamaño de las raíces de acuerdo con 3 categorías; pequeñas, medianas y grandes, posterior a 6 semanas de cultivo en el medio para elongación.

Brotos provenientes del medio de cultivo	Porcentaje de respuesta (%)		
	Pequeñas (0.2- 5.0 cm)	Medianas (5.2- 15.0)	Grandes (>15.2 cm)
Control	21.9	40.6	37.5
1	28.6	52.4	19
2	52.5	40	7.5
3	42.2	48.4	9.4

Posterior a las 6 semanas, todos los brotes fueron transferidos a un medio con sales MS al 50% de su concentración final y sin RCV, durante 8 semanas, para favorecer la Etapa IV. Aclimatización, así como para favorecer el enraizamiento, pues a pesar de que todos los brotes ya presentaban raíces, según Lara-Ascencio *et al.*, (2023), no encontró diferencias significativas entre el uso de sales MS al 100% y al 50% de su concentración original.

A pesar de que todas las plantas provenían del mismo medio de cultivo para su elongación, una vez que pasarón al medio con sales MS al 50% y sin RCV, se encontraron diferencias significativas entre los brotes provenientes del medio control y el resto de los medios (1, 2 y 3), pues en el control, la altura promedio fue

de 6.32 cm, mientras que para el resto de los tratamientos, la altura fue de 8.99 cm para el medio 1, 8.63 cm para el medio 2 y 8.56 cm para el medio 3 (Tabla 13).

Tabla 13. Parámetros de evaluación; Altura, No. de hojas y no. de raíces por planta \pm desviación estándar después de 8 semanas en el medio de cultivo con sales MS al 50% y sin RCV. Medias con letras iguales (a) en una columna no son estadísticamente diferentes.

Brotos provenientes del medio de cultivo	Altura por planta (cm)	No. de hojas por planta	No. de raíces por planta
Control	6.32 \pm 1.33 ^a	17.00 \pm 3.90 ^a	6.86 \pm 2.93 ^a
1	8.99 \pm 1.23 ^b	17.36 \pm 3.27 ^a	8.93 \pm 2.06 ^a
2	8.63 \pm 1.63 ^b	19.71 \pm 3.36 ^a	7.79 \pm 3.07 ^a
3	8.56 \pm 1.91 ^b	16.43 \pm 2.82 ^a	8.07 \pm 1.68 ^a

Esto podría indicar, que el uso de RCV durante la Etapa II, tiene un impacto en la altura de las plantas, aún después de varias semanas, pues el BAP es una citocinina sintética, que en comparación con las citocininas naturales, su efecto puede permanecer por mayor tiempo. Para el número de hojas, los valores variaron de 16.43 a 20.1, mientras que para el número de raíces se obtuvo un promedio de 6.86 a 8.93, a pesar de ello, no presentaron diferencias significativas, sin embargo, en los medios 1, 2 y 3, las raíces presentaban ramificaciones (Figura 24).



Figura 24. Detalles de las raíces de una planta regenerada de manera *in vitro*, proveniente del medio 3 (1 mg/L de BAP + 1 mg/L de Kinetina).

En la figura 25, se observa la elongación de los brotes provenientes de los diferentes medios de cultivo en el transcurso de la Etapa III. De la Semana 0 a la Semana 6, los brotes se encontraban en el medio con AG₃ y Kinetina, en la Semana 11, las plantas presentaban el crecimiento de 5 de las 8 semanas en el medio con el 50% de sales MS. Todas las plantas presentaron raíces en su mayoría ramificadas.

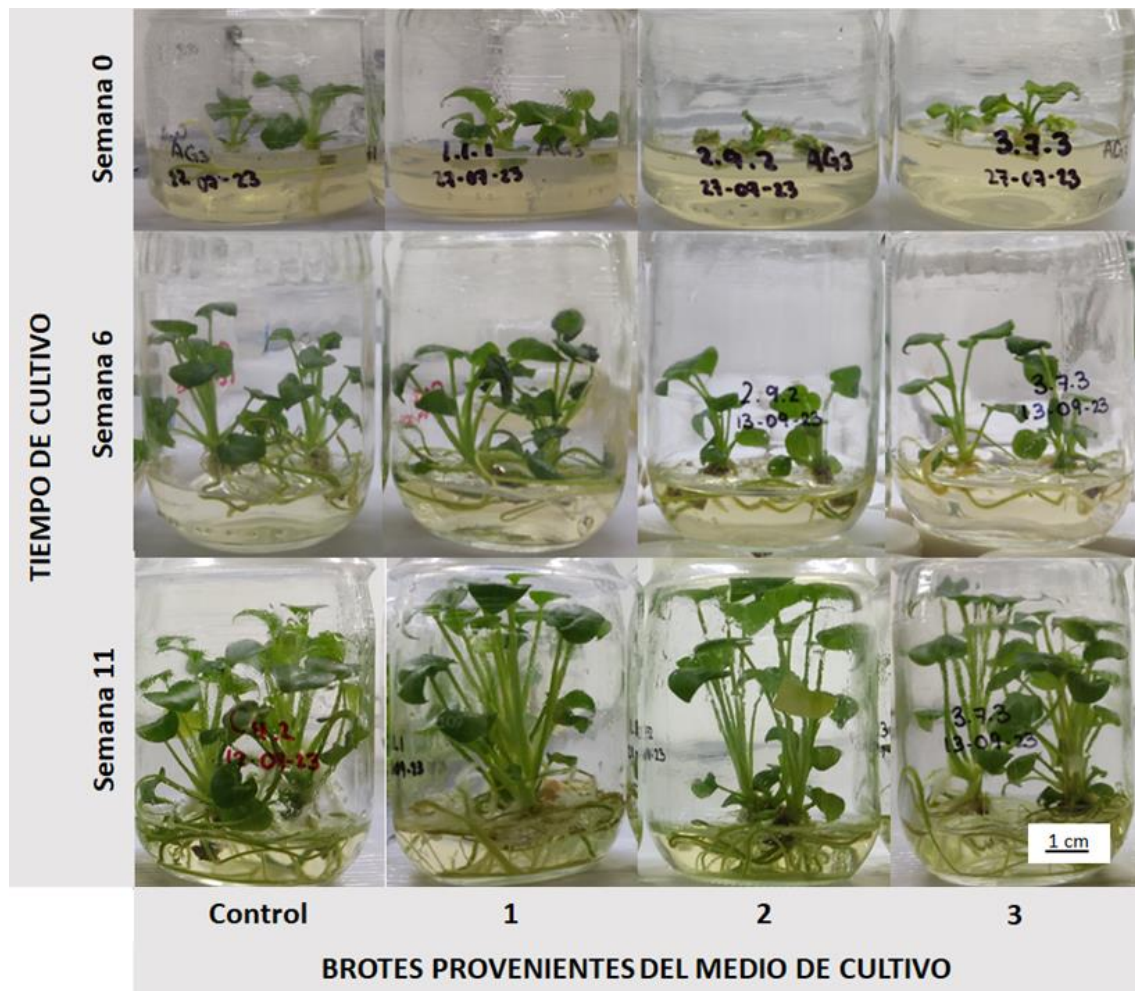


Figura 25. Elongación de los brotes provenientes de los 4 medios de cultivo; control, 1, 2 y 3.

5.5 Etapa IV. Aclimatización:

Se aclimatizaron un total de 56 plantas, las cuales fueron seleccionadas de manera aleatoria, 28 plantas fueron transferidas al sustrato de agrolita y 28 plantas en el sustrato de tierra negra y agrolita (2:1).

En la figura 26, se observan las plantas provenientes de los cuatro medios de cultivo; Control, 1, 2 y 3, previo al pase suelo. La altura promedio de las plantas provenientes del control fue de 6.32 cm, las del medio 1 fue de 8.99 cm, las del medio 2 fue de 8.63 cm y las del medio 3 fue de 8.56 cm. Todas ellas, presentaban hojas de color verde oscuro y brillantes, los pecioloos eran delgados y verdes, mientras que las raíces podían variar de color, entre marrón y verde, además eran más gruesas que sus ramificaciones, las cuales eran ligeramente amarillas.

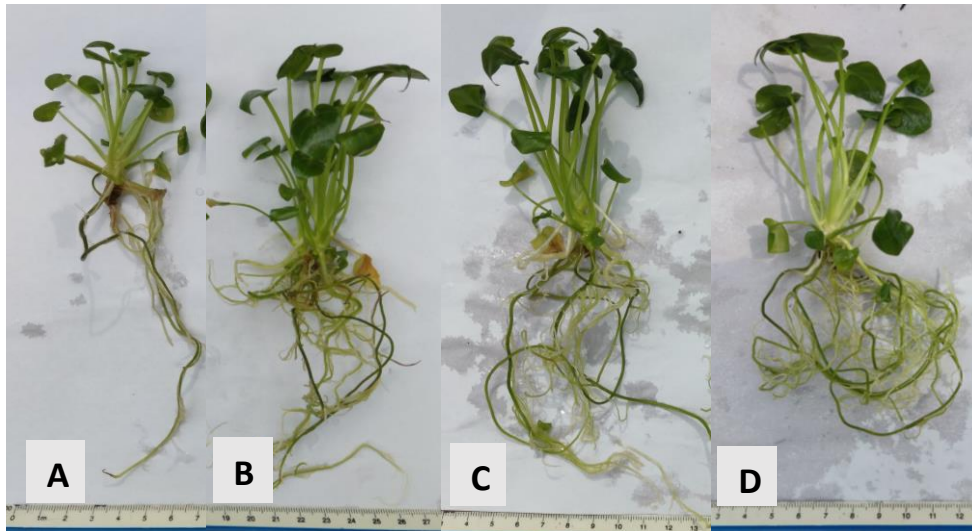


Figura 26. Plantas de *T. xanadu* provenientes de los cuatro medios de cultivo posterior a 14 semanas en la Etapa III y previo a la Etapa IV. Aclimatización. A) Planta proveniente del medio Control, B) Planta proveniente del medio 1, C) Planta proveniente del medio 2, D) Planta proveniente del medio 3.

Es importante recordar que, las plantas cultivadas *in vitro* presentan una baja capacidad fotosintética, por lo que, para favorecer la supervivencia *ex vitro*, es importante llevar a cabo una correcta transición. Bhojwani & Dantu (2013) sugieren mantener una alta humedad relativa y una baja exposición a la luz, durante 15-20 días, esto para simular el ambiente con el que contaban dentro de los frascos. Para ello, una vez que fueron transferidas a las charolas, se colocaron dentro del cuarto

de incubación, para mantener la misma intensidad de luz que en las etapas *in vitro*, además, mantuvieron el mismo fotoperiodo; por otra parte, para mantener una alta humedad relativa, fueron cubiertas con una tapa de plástico transparente, para favorecer el paso de luz, estas condiciones se mantuvieron durante 10 días. Posteriormente, se retiró la tapa de plástico y se mantuvieron así durante 5 días más. Una vez pasado este tiempo, fueron transferidas al invernadero del Conjunto E.

Otro de los factores clave para una correcta aclimatización, es proporcionar el sustrato adecuado. Alawaadh *et al.*, (2020) empleó una mezcla de peat moss y perlita (1:1), obteniendo un 100% de supervivencia. Blanco & Valverde (2004), por su parte, optaron por usar suelo y fibra de coco (1:1) obteniendo un 91 % de supervivencia; sin embargo, este valor, lo atribuyen al tamaño de las plantas, pues aquellas que tenían menos de 2 cm de altura, no sobrevivieron. En el caso de Chen *et al.*, (2012) no mencionan el tipo de sustrato seleccionado, sin embargo, sí mencionan un 100% de supervivencia. Todos esos valores, corresponden a un mes de su aclimatización.

En el presente trabajo se optó por trabajar con tierra negra y agrolita, este último es un material inerte y ligero, empleado para proporcionarle al sustrato aireación y un correcto drenado, que puede verse dificultado si se empleara la tierra negra sola (Reyes *et al.*, 2011). Mientras que el otro sustrato, correspondió únicamente a agrolita, con la finalidad de simular un cultivo hidropónico, un cultivo sin suelo, en el que las plantas pueden disponer directamente de los nutrientes, a través de una solución. Dicha solución, estuvo preparada con sales MS al 75%, 1 mg/L de BAP y 1 mg/L de AIA, y se regaron las plantas cada 7 días, mientras que para el sustrato de tierra negra y agrolita, las sales MS estuvieron a un 25% de su concentración y se regaron cada 15 días.

En la figura 27, se observan las plantas luego de su pase a suelo, el inciso A y B corresponden a la tierra negra y agrolita (2:1) y el inciso C y D a la agrolita. El inciso A y C corresponden a las 24 horas posteriores, y el inciso B y D, corresponden a un mes después. Para ambos sustratos, el porcentaje de supervivencia fue del 100 %,

sin importar el medio de cultivo del cual provenían en la etapa II (control, 1, 2 y 3), además, todas las plantas presentaron un buen crecimiento, así como la emergencia de hojas nuevas, verdes, brillantes y más grandes que las obtenidas de manera *in vitro*, las cuáles comenzaron a senescer. Aunque ambos tratamientos presentaron un 100% de supervivencia, cualitativamente, las plantas en tierra negra y agrolita, presentaron un mejor desarrollo.

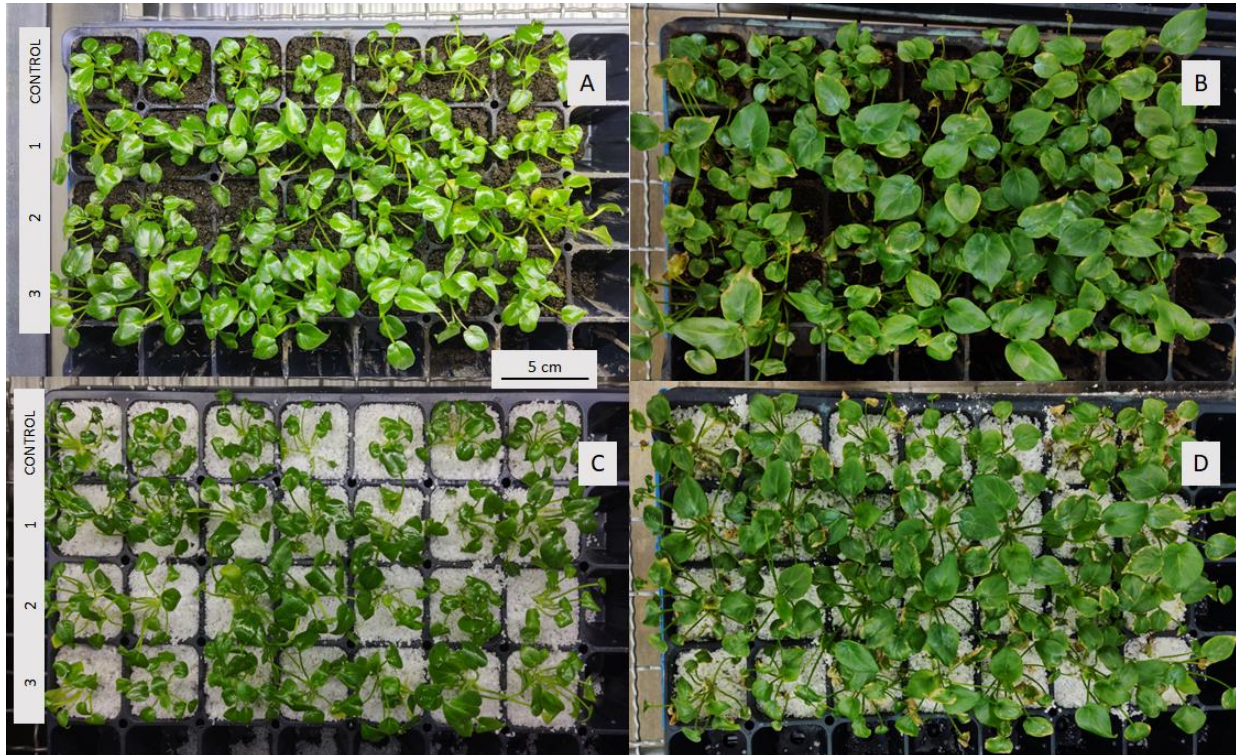


Figura 27. Plantas aclimatizadas de *T. xanadu*. A y B Sustrato de tierra negra y agrolita (2:1) A) 24 h posterior a su pase a suelo, B) Un mes después del pase a suelo. C y D, Sustrato de agrolita, C) 24 h posterior al pase a suelo y D) Un mes después del pase a suelo.

VI. CONCLUSIONES

Se logró establecer exitosamente un protocolo para la micropropagación de *Thaumatococcus xanadu* vía organogénesis directa, en donde se determinó que:

- El ápice caulinar fue el explante idóneo para inducir la organogénesis directa, partiendo de la activación de yemas preformadas.
- El tratamiento de desinfección para ápices se vio favorecido con el uso de jabón, bactericida, fungicida, cloro comercial, así como el uso de antibióticos y antifúngicos, obteniendo un 100% de asepsia con el cuarto tratamiento de desinfección.
- El uso de antioxidantes como ácido cítrico y ácido ascórbico en una concentración de 150 mg/L cada uno, así como la adición de 250 mg/L de PVP como absorbente, tanto en el medio de cultivo como en el tratamiento de desinfección, permitió obtener bajos porcentajes de oxidación.
- La inducción de los ápices se logró empleando sales MS, suplementado con BAP (2 mg/L) y coctel 22 (10 mL/L).
- El uso de BAP promovió notablemente la proliferación de brotes, durante la Etapa II, sin embargo, no existieron diferencias significativas en el número de brotes por explante entre las concentraciones empleadas, ni su combinación con kinetina. No obstante, el uso de 2 mg/L de BAP dio la formación de brotes incipientes y un callo duro y blanco, impidiendo el crecimiento de los brotes, por lo que el uso de 1 mg/L de BAP solo o con 1 mg/L de kinetina mostraron ser la concentración más idónea. Con un fin comercial, se sugiere emplear 1 mg/L de BAP.
- El uso de AG₃ y Kinetina, permitió la elongación y desarrollo de los brotes, sin embargo, esta respuesta no fue la misma para los brotes más pequeños o incipientes, así mismo, no fue necesario inducir el enraizamiento pues todos los brotes terminaron por presentar raíces sin el uso de auxinas.
- El uso de sales MS al 50% y sin RCV permitió favorecer la elongación y enraizamiento de las plantas, observando diferencias significativas entre las

plantas provenientes del tratamiento control con el resto de los medios (1, 2 y 3).

- Se logró la aclimatización de 56 plantas de *T. xanadu*, obteniendo un 100% de supervivencia en ambos sustratos, al mes de su aclimatización. Sin embargo, las plantas en tierra negra y agrolita (2:1), cualitativamente parecen tener un mejor aspecto.
- Se definió un cronograma con las cinco etapas de la micropropagación de *T. xanadu*.
- Tras aproximadamente 11 meses de iniciados los cultivos, se obtuvieron alrededor de 1,000 plantas de *T. xanadu*, a partir de 2 plantas madre, por lo que, los resultados obtenidos en la presente investigación muestran ser una alternativa viable para la micropropagación de *T. xanadu* que permitiría satisfacer con la demanda comercial.

VII. PERSPECTIVAS

Si bien los resultados obtenidos en este trabajo describen cada una de las etapas de la micropropagación, existen ciertos puntos de mejora, por lo que se recomienda;

- Observar el efecto de concentraciones más pequeñas de BAP (<1 mg/L BAP), sobre el número de brotes incipientes o poco desarrollados, pues de acuerdo con los resultados, se esperaría una reducción de éstos.
- Si bien los antioxidantes utilizados dieron buenos resultados, se podría optar por otros antioxidantes más económicos como la melatonina, ya que se ha demostrado que su utilización en medios para cultivo *in vitro* de plantas que se oxidan fácilmente, puede disminuir hasta en un 100% la oxidación y resulta más económico que el PVP.
- Evaluar el crecimiento y desarrollo de las plantas obtenidas bajo condiciones *in vitro*, con las obtenidas en viveros por rizomas.
- Para favorecer y disminuir costos de producción en cuanto a la micropropagación de *T. xanadu*, se podría hacer uso de biorreactores, durante la etapa II y III de la micropropagación, evaluando cuál de los dos sistemas (medio de cultivo sólido o líquido) resulta ser más eficiente.
- Finalmente, calcular los costos de producción de este sistema e identificar en cuáles puntos se puede incidir para disminuirlo, así como hacer una comparación de los precios de plantas *in vitro* y de vivero.

VIII. REFERENCIAS

- Alawaadh, A. A., Dewir, Y. H., Alwihibi, M. S., Aldubai, A. A., El-Hendawy, S., & Naidoo, Y. (2020). Micropropagation of Lacy Tree Philodendron (*Philodendron bipinnatifidum* Schott ex Endl.). *HortScience*, 55(3), 294-299. doi:10.21273/HORTSCI14612-19.
- Bhojwani, S. S., & Dantu, P. K. (2013). *Plant Tissue Culture: An Introductory Text* (1 ed.). India: Springer Nueva Delhi. doi:10.1007/978-81-322-1026-9.
- Blanco, M., & Valverde, R. (2004). Micropropagación de *philodendron* sp. (posiblemente p. *corcovadense*). *Agronomía Costarricense*, 28(1), 39-46, <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=43628104>
- Chen, F., Wang, C., & Fang, J. (2012). Micropropagation of self-heading *Philodendron* via direct shoot regeneration. *Scientia Horticulturae*, 141, 23-29., doi:10.1016/j.scienta.2012.04.011
- Croat, T. B., Mayo, S., & Boos, J. (2002). A New Species of *Brazilian Philodendron* subgenus *Meconostigma* (Araceae). *Journal of the International Aroid Society*(25), 63-66, de <https://www.aroid.org/gallery/croat/0250007.pdf>
- George, E. F., Hall, M. A., & De Klerk, G.-J. (2008). *Plant Propagation by Tissue Culture* (3 ed., Vol. 1. The Background). Reino Unido: Springer Dordrecht.
- George, E. F. & Sherrington P.D. (1984). *Plant Propagation by Tissue Culture* (1° ed., Vol. 1) Inglaterra: Exegetics Limited.
- Gisbert Domenech, C. (2011). Morfogénesis: la ruta organogénica versus la ruta embriogénica. *Universidad Politécnica de València*. Obtenido de <http://hdl.handle.net/10251/11526>
- González Caballero, O., Juárez Pérez, W. R., Ronquillo Vázquez, N., Estrada Galván, B., Heredia Guzmán, P., Jiménez Rodríguez, Á., Mata Rosas, M. & Chávez Ávila, V. M. (2012). El Cultivo de Tejidos Vegetales: alternativa de oportunidades para el desarrollo de México. *La vida en la Sierra*, 3(1): 5-9.

- Hee Han, B., & Mo Park, B. (2008). *In vitro* micropropagation of *Philodendron cannifolium*. *Journal Plant Biotechnology*, 35(3), 203-208, <https://koreascience.kr/article/JAKO200835054214957.pdf>
- Kumar, D., Tiwari, J., & Singh, R. (1998). *In vitro* clonal propagation of *Philodendron pertusum*. *Indian Journal of Horticulture*, 55(4), 340-343, de <https://www.indianjournals.com/>
- Lara-Ascencio, M., Andrade Rodríguez, M., Guillén Sánchez, D., Sotelo Nava, H., & Villegas Torres, O. G. (2021). Establishment of *in vitro* aseptic culture of *Philodendron xanadu* Croat1. *Revista Ciencia Agronómica*, 52(2). doi:10.5935/1806-6690.20210024
- Lara-Ascencio, M., Andrade-Rodríguez, M., Villegas-Torres, O. G., Sotelo-Nava, H., & Viveros-Ceballos, J. L. (2023). Crecimiento *in vitro* de *filodendro xanadu* por efecto de la concentración y relación nutrimental en el medio de cultivo. *Acta Agrícola y Pecuaria*. doi:10.30973/aap/2023.9.0091008
- Loberant, B., & Altman, A. (2010). Micropropagation of Plants. *Encyclopedia of Industrial Biotechnology: Bioprocess, Bioseparation and Cell Technology*, 1-17. doi:10.1002/9780470054581.eib442
- Mayo, J., Bogner, J. & Boyce, P.C., (1997) *The Genera of Araceae*. Royal Botanical Gardens, Kew
- Morales Rubio , M. E., Espinosa Leal , C., & Garza Padrón, R. A. (2016). *Investigación en plantas de importancia médica*. Barcelona. España: OmniaScience. doi:10.3926/oms.315
- Muñoz- Castellanos, L., Borrego-Loya, A., Villalba-Bejarano, C., González-Escobedo, R., Orduño-Cruz, N., Villezcas-Villegas, G., Rodríguez Roque, M.J., Ávila-Quezada, G.D., Vargas-Arispuro, I. (2022). El cloro y su importancia en la inactivación de bacterias, ¿Puede inactivar virus? *Revista Mexicana de Fitopatología*, 39. doi:10.18781/r.mex.fit.2021-4

- Murashige, T. & Skoog, F. (1962) A revised Medium for Rapid Growth and Bio Assay with Tobacco Tissue. *Physiology Plantarum* 15(3), 473-497. Doi:10.1111/j.1399-3054..1962.tb08052x
- Pérez Molphe Balch, E. M., Ramírez Malagón, R., Núñez Palenius, H. G., & Ochoa Alejo, N. (1999). *Introducción al Cultivo de Tejidos Vegetales* (1 ed.). México: Universidad Autónoma de Aguascalientes.
- Pumarola, A., Rodríguez-Torres, A., García-Rodríguez, J., & Piedrola-Angulo, G. (1992). *Microbiología y Parasitología Médica* (2da Edición). SALVAT EDITORES, S.A.
- Ramírez-Rojas, S., Osuna-Canizalez, F., García-Peréz, F., Canul-Ku, J., Palacios-Talavera, A., Hernández-Romano, J., Ornelas-Ocampo, K., Landa-Salgado, P. (2016). Identificación molecular de bacterias asociadas a plantas ornamentales producidas *in vitro*. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 34(2), 173-183. doi:10.18781/R.MEX.FIT.1511-3
- Reyes Santiago, P. J., Islas Luna, M. A., González Zorzano, O., Carrillo Reyes, P., Vergara Silva, F.R. & Brachet Ize, C.P. (2011) *Echeveria. Manual del perfil diagnóstico del género Echeveria en México*. México: Universidad Autónoma Chapingo.
- Sakuragui, C. M., Braucks Calazans, L. S., Loss de Oliveira, L., Barroso de Moraes, É., Benko Iseppon, A. M., Vasconcelos, S., Guerra Schrago, C.E. & Mayo, S. J. (2018). Recognition of the genus *Thaumatophyllum* Schott – formerly *Philodendron* subg. *Meconostigma* (Araceae) – based on molecular and morphological evidence. *PhytoKeys*, 98, 51-71. doi.org/10.3897%2Fphytokeys.98.25044
- Seliem, M., El-Mahrouk, M., El-Banna, A., Hafez, Y., & Dewir, Y. (2021). Micropropagation of *Philodendron selloum*: Influence of copper sulfate on endophytic bacterial contamination, antioxidant enzyme activity, electrolyte leakage, and plant survival. *South African Journal of Botany*, 139, 230-240. doi:10.1016/j.sajb.2021.01.024

Sharry, S., Adema, M., & Abedini, W. (2015). *Plantas de probeta. Manual para la propagación de plantas por cultivo de tejidos in vitro*. Argentina: Editorial de la Universidad de La Plata.

Suárez Padrón, I. E. (2020). *Cultivo de Tejidos Vegetales*. Montería Colombia: Fondo Editorial Universidad de Córdoba. Recuperado el 4 de Abril de 2023

Taiz, L., & Zeiger, E. (2006). *Fisiología Vegetal* (Vol. II). Universitat Jaume I.

Tamayo Torres, L. G., & Monja Mio, K. M. (2021). El destino *in vitro* de una célula vegetal. *Ciencia*, 72(2), 56-63. Recuperado el 25 de Mayo de 2023, de https://www.revistaciencia.amc.edu.mx/images/revista/72_2/PDF/10_72_2_1241.pdf

Páginas WEB:

ADAMA (2021a). Captán 50 WP [PDF]. Recuperado el 10 de Octubre del 2023, de: <https://www.adama.com/mexico/es/media/851/download?attachment>.

ADAMA (2021b). Cuprimicín 500 Hyper [PDF]. Recuperado el 10 de Octubre de 2023, de: <https://www.adama.com/mexico/es/media/811/download?attachment>.

AEMPS-CIMA, A. E. (2008). *TERBINAFINA*. Recuperado el 12 de Octubre de 2023, de: https://cima.aemps.es/cima/dohtml/ft/69684/FichaTecnica_69684.html#5.1

AEMPS- CIMA, A. E. (2019). *MEROPENEM*. Recuperado el 12 de Octubre de 2023, de: https://cima.aemps.es/cima/dohtml/ft/75816/FichaTecnica_75816.html#1

AEMPS-CIMA, A. E. (2022). *NISTATINA*. Recuperado el 12 de Octubre de 2023, de: https://cima.aemps.es/cima/pdfs/es/ft/28262/FichaTecnica_28262.html.pdf

Capra, V. (2020). Alcohol etílico como antiséptico y desinfectante. (Asociación Argentina de Farmacéuticos de Hospital (AAFH-EH)) [PDF]. Consultado el

25 de Octubre de 2023, de:
<https://aafh.org.ar/upload1/wf4x19dV4S7aGcKOWGInexh1yosx4Zd2hFQMgEbF.pdf>

FacMed. (2005). Cefotaxima Solución Inyectable. Recuperado el 16 de Octubre de 2023, de :
http://www.facmed.unam.mx/bmnd/gi_2k8/prods/PRODS/40.HTM#:~:text=A ct%C3%BAa%20de%20manera%20similar%20a,la%20s%C3%ADntesis%20de%20la%20pared

IPNI (2023). *Thaumatophyllum xanadu* (Croat, Mayo & J.Boos) Sakur., Calazans & Mayo. Recuperado el 25 de Mayo de 2023, de
<https://www.ipni.org/n/20011461-1>

Lino Guzmán, A. (8 de Febrero de 2021). *Floricultura: Gran potencial de Desarrollo*. Recuperado el 20 de Marzo de 2023, de Voz de las Empresas.:
<https://vozelasempresas.org/floricultura-gran-potencial-de-desarrollo/>

Mayers, K. (23 de Marzo de 2023). *Guía de cuidado de Philodendron Xanadu*. Recuperado el 30 de Marzo de 2023, de GARDEN PALS:
<https://gardenpals.com/philodendron-xanadu/#care>

Plants of the World Online (2023). *Philodendron xanadu* Croat, Mayo & J.Boos. Recuperado el 18 de enero de 2023, de:
<https://powo.science.kew.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:20011461-1>

Rendón, A., & Neyra, L. (30 de Septiembre de 2020). *Ornamental*. Recuperado el 20 de Marzo de 2023, de Biodiversidad mexicana sitio web:
<https://www.biodiversidad.gob.mx/diversidad/ornamental>

Representación AGRICULTURA Morelos. (Febrero, 2020). *Producción ornamental de Morelos representa el 30 por ciento de su PIB Agrícola*. Recuperado el 20 de Marzo de 2023, del sitio web:
<https://www.gob.mx/agricultura/morelos/articulos/produccion-ornamental-de-morelos-representa-el-30-por-ciento-de-su-pib-agricola?idiom=es>

SAGARPA. CONADESUCA (Junio, 2017). *Laboratorio de Cultivo de Tejidos (CTV): Implementación y puesta en marcha*. Recuperado el 30 de Marzo de 2023, del sitio web: [https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/264918/Reporte de Proyecto 1 Laboratorio.pdf](https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/264918/Reporte_de_Proyecto_1_Laboratorio.pdf)

Sigma-Aldrich (s.f.). Gelzan CM Gelrite 71010-52-1. Recuperado el 5 de Abril de 2023 del sitio web: <https://www.sigmaaldrich.com/MX/es/product/sigma/g1910>

IX. ANEXOS

Anexo 1. Compuestos de las soluciones stock concentradas (100X) para el medio MS.

NOMBRE DEL COMPUESTO	FÓRMULA	P.M. (g)	1 L (g)
Solución I: Nitratos			
Nitrato de Potasio	KNO_3	101.108	190
Nitrato de Amonio	NH_4NO_3	80.04	165
Solución II: Sulfatos			
Sulfato de Magnesio	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	246.498	37
Sulfato de Manganeso	$MnSO_4 \cdot 4H_2O$	223.0618	2.23
	$MnSO_4 \cdot H_2O$	169.01	1.67
Sulfato de Zinc	$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	287.54	0.86
Sulfato de Cobre	$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	249.68	0.0025*
Solución III: Halógenos			
Cloruro de Calcio	$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	147.02	44
	$CaCl_2 \cdot H_2O$	128.99	38.593
	$CaCl_2$	110.99	33.208
Yoduro de Potasio	KI	166.01	0.083
Cloruro de Cobalto	$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	237.93	0.0025*
Solución IV: Fosfato, Ácido Bórico, Molibdato			
Fosfato de Potasio	$KH_2PO_4 \cdot H_2O$	154.086	19.248
	KH_2PO_4	136.09	17
	K_2HPO_4	174.2	21.76
Ácido Bórico	H_3BO_3	61.86	0.62
Molibdato de Sodio	$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	241.95	0.025
Solución V: Quelantes			
Sulfato Ferroso	$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	278.028	2.784
Na2EDTA	$C_{10}H_{14}N_2O_8Na_2$	336.2	3.36
Na2EDTA*2H2O	$C_{10}H_{14}N_2O_8Na_2 \cdot 2H_2O$	372.3	3.724

*De una solución concentrada de 0.025 g en 100 mL de $CuSO_4$ o de $CoCl_2$, tomar una alícuota de:

- 0.5 mL para preparar una solución madre 100X de un volumen de 50 mL
- 1.0 mL para preparar una solución madre 100X de un volumen de 100 mL
- 2.5 mL para preparar una solución madre 100X de un volumen de 250 mL

Anexo 2. Reguladores de Crecimiento Vegetal y otros compuestos orgánicos.

NOMBRE DEL COMPUESTO	ABREVIATURA	FÓRMULA	P.M. (g)	CONCENTRACIÓN PARA 100 mL (mg)
Reguladores de Crecimiento Vegetal				
Auxinas¹				
Ácido indol-3-acético	AIA	$C_{10}H_9NO_2$	175.2	10
Ácido indol-3-butírico	AIB	$C_{12}H_{13}NO_2$	203.2	10
Citocininas²				
6-Bencilaminopurina	BAP	$C_{12}H_{11}N_5$	225.3	10
Cinetina (6-Furfurilaminopurina)	Kin	$C_{10}H_9N_5O$	215.2	10
Giberelinas³				
Ácido giberélico	AG_3	$C_{19}H_{22}O_6$	346.4	10
Otros compuestos orgánicos				
(6-aminopurina) Hemisulfato	Adenina ⁴	$C_5H_5N_6 \cdot 1/2H_2SO_4$	184.2	100
Ácido aminoacético o aminoetanoico	Glicina	$C_2H_5NO_2$	75.07	20

¹ Las auxinas deberán disolverse con unas gotas de NaOH 1N y agua caliente. ² Las citocininas deberán disolverse con unas gotas de HCl 1N y agua caliente. ³ Las giberelinas deberán disolverse con agua tibia. ⁴ La adenina se pesa y se le adiciona unas gotas de H₂SO₄ concentrado, después se le agrega agua desionizada y agua caliente.

Anexo 3. Composición de las Vitaminas R2 y Coctel 22.

NOMBRE DEL COMPUESTO	FÓRMULA	P.M. (g)	1 L (g)
Vitaminas R₂ (MS modificado)			
Mioinositol	$C_6H_{12}O_6$	180.2	10
Ácido nicotínico	$C_6H_5NO_2$	123.1	0.1
Piridoxina hidrocloreto	$C_8H_{11}NO_3 \cdot HCl$	205.6	0.1
Tiamina hidrocloreto	$C_8H_{17}N_4OSCl \cdot HCl$	337.3	0.2
Coctel 22			
Adenina	$C_5H_5N_6 \cdot 1/2H_2SO_4$	135.13	5.0
Glutamina	$C_5H_{10}N_2O_3$	146.14	5.0
Arginina	$C_6H_{14}N_4O_2$	174.2	5.0