



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**Establecimiento *in vitro* de cultivos
asépticos de *Spathiphyllum sensation***

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
INGENIERA QUÍMICA**

PRESENTA:

KARLA MARISSA VIEYRA VALENCIA

DIRECTORA DE TESIS:

M en C. 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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: Bárzana García Eduardo

VOCAL: Profesor: Farrés González Sarabia Amelia María

SECRETARIO: Profesor: Olivera Flores Teresa de Jesús

1er. SUPLENTE: Profesor: Gimeno Seco Miguel

2° SUPLENTE: Profesor: Montiel Pacheco Carmina

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

Edificio E, Lab.116. Cultivo de Tejidos Vegetales, Depto. de Bioquímica,
Conjunto D y E, Facultad de Química, UNAM.

ASESOR DEL TEMA:

M en C. Teresa de Jesús Olivera Flores

Teresa Olivera Flores

SUSTENTANTE:

Karla Marissa Vieyra Valencia

Karla Vieyra

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS	7
ÍNDICE DE TABLAS	11
ÍNDICE DE GRÁFICAS	12
ABREVIATURAS	13
RESUMEN	17
CAPÍTULO I: ANTECEDENTES	19
1. <i>Spathiphyllum sensation</i>	19
1.1. Clasificación taxonómica de <i>Spathiphyllum</i>	20
1.2. Descripción de la especie	21
1.2.1. Variedades	21
1.2.2. Raíz	21
1.2.3. Hojas	22
1.2.4. Flor	23
1.2.5. Frutos	24
1.3. Distribución	25
1.4. Importancia económica y usos	26
1.5. Cultivo de Tejidos Vegetales (CTV)	27
1.5.1. Definición y un poco de historia	27
1.5.2. Factores	28
1.5.3. Factores para considerar en el pase a suelo	30
1.5.4. Medio de cultivo	30
1.5.4.1. Sales	30
1.5.4.2. Fuentes de carbono y energía	31
1.5.4.3. Vitaminas y myo-inositol	32
1.5.4.4. Reguladores de crecimiento.	33
1.5.4.5. Aminoácidos	35
1.5.4.6. Potencial de hidrógeno (pH)	35
1.6. Técnicas para la regeneración de plantas	36
1.7. Cultivo <i>in vitro</i> de cuna de Moisés	37

CAPÍTULO II: JUSTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	43
CAPÍTULO III: HIPÓTESIS, OBJETIVO GENERAL Y ESTRATEGIAS	47
3.1. HIPÓTESIS	47
3.2. OBJETIVOS	47
3.2.1. Objetivo general	47
3.2.2. Objetivos particulares	47
3.3. ESTRATEGIAS	48
CAPÍTULO IV: ESTABLECIMIENTO DE CULTIVOS ASÉPTICOS DE DISTINTOS EXPLANTES Y DIFERENTES MEDIOS	50
4.1. MARCO TEORICO	50
4.1.1. Organogénesis	50
4.1.2. Tipos de contaminante en el cultivo <i>in vitro</i>	50
4.1.3. Fuentes de contaminación	51
4.1.4. Oxidación	53
4.1.4.1. Definición	53
4.1.4.2. Compuestos que inhiben la oxidación	54
4.1.4.2.1. Adsorbentes	54
4.1.4.2.2. Nitrato de plata	54
4.1.5. Métodos de desinfección	56
4.1.5.1. Hipoclorito de sodio	56
4.1.5.2. Tween®-20	58
4.1.5.3. Microdyn®	58
4.1.5.4. Antibióticos	58
4.2. MATERIALES Y MÉTODOS	59
4.2.1. Material biológico	59
4.2.2. Programa fitosanitario y de fertilización	60
4.2.3. Método de desinfección	61
4.2.4. Medio de cultivo	70
4.2.5. Experimentos con variación de concentración de L-cisteína	71
4.2.6. Secciones del Rizoma	73
4.2.7. Protocolo de desinfección de brotes planta 5E	73
4.2.8. Protocolo de desinfección de brote Octubre 2023	74

4.3 RESULTADOS	75
4.3.1. Resultados	75
4.3.1.1. Rizoma	75
4.3.1.2. Ápice	78
4.3.1.3. Lámina foliar.	84
4.3.1.4. Lígulas	87
4.3.1.5. Nervadura central	88
4.4. DISCUSIÓN	91
4.3.3.1. Antioxidantes en el medio de cultivo y oxidación	91
4.3.3.2. Contaminación y desinfección de explantes de <i>Spathiphyllum sensation</i> y antibióticos.	100
CAPÍTULO V: ESTABLECIMIENTO DE CULTIVO DE PROTOPLASTOS	104
5.1 MARCO TEORICO	104
5.1.1. Cultivo de protoplastos	105
5.1.1.1. Tejidos y cultivos celulares para la obtención de protoplastos	105
5.1.1.2. Etapas en el cultivo de protoplastos.	105
5.1.1.2.1. Primera Etapa: Obtención de protoplastos	106
5.1.1.2.2. Segunda y Tercera Etapa: Mantenimiento de cultivo de protoplastos y obtención de microcallos y callos.	109
5.1.1.2.3. Cuarta Etapa: Regeneración de plántulas.	109
5.2. MATERIALES Y MÉTODOS	110
5.2.1. Material biológico	110
5.2.2. Primera etapa: Obtención de los protoplastos.	111
5.2.2.1. Método de obtención de protoplastos	111
5.2.3. Medio de cultivo para protoplastos	117
5.2.4. Segunda etapa: Mantenimiento de los protoplastos.	118
5.3 RESULTADOS	119
5.3.1. Resultados del primer cultivo de protoplastos	119
5.3.1.1. Primera etapa: Obtención de protoplastos	119
5.3.1.2. Segunda etapa: División celular de los protoplastos y regeneración de las paredes celulares.	124
5.3.1.3. Tercera etapa: Formación de microcallos y callos.	125
5.3.2. Resultados del segundo ensayo de protoplastos	129
5.3.2.1. Primera etapa: Obtención de protoplastos.	129

5.3.2.2. Segunda etapa: División celular de los protoplastos y regeneración de las paredes celulares.	132
5.3.2.3. Tercera etapa: Formación de microcallos y callos.	133
5.4. DISCUSIÓN	135
<i>CAPÍTULO VI: UTILIZACIÓN DE INFLORESCENCIAS INMADURAS PARA LA OBTENCIÓN DE EMBRIONES SOMÁTICOS</i>	<i>141</i>
6.1 MARCO TEORICO	141
6.1.1. Embriogénesis somática.	141
6.1.2. Factores que influyen en la embriogénesis somática	144
6.1.2.1. Medios de cultivo y reguladores de crecimiento	145
6.1.2.2. Luz	147
6.1.2.3. Temperatura	147
6.2 MATERIALES Y MÉTODOS	147
6.2.1. Material Biológico	147
6.2.2. Métodos de desinfección de inflorescencias/frutos/semillas	149
6.2.3. Medios de cultivo para la obtención de embriones somáticos	153
6.3. RESULTADOS	154
6.3.1. Resultados de la inflorescencia de la planta 3C	154
6.3.2. Resultados de la inflorescencia de la planta 4D	158
6.3.3. Resultados de la inflorescencia de la planta 5E	168
6.3.3.1. Siembra de semillas de la inflorescencia madura	168
6.3.3.2. Resultados inflorescencia inmadura	169
6.4. DISCUSIÓN	173
<i>CONCLUSIONES</i>	<i>179</i>
<i>PERSPECTIVAS</i>	<i>181</i>
<i>REFERENCIAS</i>	<i>182</i>
<i>ANEXOS</i>	<i>198</i>

ÍNDICE DE FIGURAS

<i>Fig. 1. Producción comercial de cultivos de Spathiphyllum en un invernadero a la sombra.</i>	20
<i>Fig. 2. Rizoma con longitud de 5.5 cm.</i>	22
<i>Fig. 3. Hojas de Spathiphyllum sensation.</i>	23
<i>Fig. 4. Estados de madurez de la inflorescencia.</i>	24
<i>Fig. 5. Inflorescencia con crecimiento de frutos.</i>	24
<i>Fig. 6. Distribución geográfica de Spathiphyllum.</i>	26
<i>Fig. 7. Diagrama de las metodologías probadas para obtener cultivos de Spathiphyllum sensation.</i>	49
<i>Fig. 8. Formula química del PVP.</i>	54
<i>Fig. 9. La biosíntesis del etileno y su influencia en diversos procesos.</i>	55
<i>Fig. 10. Mecanismo de reacción del Hipoclorito de sodio.</i>	57
<i>Fig. 11. Plantas recibidas en la primera entrega plantas 2 y 3.</i>	59
<i>Fig. 12. Plantas recibidas en segunda entrega plantas 1A a 5E.</i>	61
<i>Fig. 13. Pretratamiento del protocolo de desinfección. Primera parte en condiciones no asépticas</i>	67
<i>Fig. 14. Pasos de los métodos de desinfección en campana. Segunda parte bajo condiciones asépticas</i>	69
<i>Fig. 15. Partes del rizoma usadas en los ensayos.</i>	73
<i>Fig. 16. Comparación medio ST-1 con planta en otro medio.</i>	75
<i>Fig. 17. Explantes de rizoma.</i>	77
<i>Fig. 18. Ápice y meristemas.</i>	79

Fig. 19. Brotes ex vitro planta 5E.	80
Fig. 20. Brotes in vitro planta 5E.	81
Fig. 21. Brotes planta 5E en medio de cultivo con CA 29 días después de la siembra.	82
Fig. 22. Brote ex vitro octubre 2023.	83
Fig. 23. Protocolo desinfección de brote octubre 2023.	83
Fig. 24. Brote octubre planta 5E 1 mes después de desinfección.	84
Fig. 25. Explantes de lámina foliar.	86
Fig. 26. Explantes de lígula.	87
Fig. 27. Explantes de Lígula en medio ST-2 con CA.	87
Fig. 28. Explantes de nervadura central	88
Fig. 29. Etapas en el cultivo de protoplastos.	106
Fig. 30. Láminas foliares con respuesta a medio de cultivo.	110
Fig. 31. Protocolo de obtención de protoplastos.	115
Fig. 32. Continuación protocolo de obtención de protoplastos.	116
Fig. 33. Procedimiento para hacer Squash.	117
Fig. 34. Protoplastos, células observadas procedentes de LF de medio sólido.	119
Fig. 35. Protoplastos después de una hora de haber terminado el protocolo. Las flechas rojas muestran los protoplastos.	120
Fig. 36. Diámetros de los protoplastos obtenidos del primer ensayo de protoplastos en el mismo día de siembra del medio de cultivo sólido. Diámetros de 5 y 6 μm.	121
Fig. 37. Referencia de los diámetros de los protoplastos obtenidos en los ensayos de protoplastos.	122
Fig. 38. Protoplastos obtenidos en el mismo día de siembra del medio de cultivo sólido.	123

<i>Fig. 39. Protoplastos obtenidos en el mismo día de siembra del medio de cultivo líquido.</i>	124
<i>Fig. 40. Células con pared 10x después de 1 mes de siembra.</i>	125
<i>Fig. 41. Microcallos obtenidos 6 días después de la siembra.</i>	125
<i>Fig. 42. Microcallos obtenidos del medio de cultivo líquido y sólido dos semanas después de la siembra.</i>	126
<i>Fig. 43. Microcallo con aumento 10x y 40x y callo con aumento 10x un mes después de la siembra.</i>	127
<i>Fig. 44. Microcallos del medio de cultivo líquido después de un mes de siembra.</i>	128
<i>Fig. 45. Microcallos del medio de cultivo sólido después de un mes de siembra.</i>	128
<i>Fig. 46. Diámetros de los protoplastos obtenidos del segundo ensayo de protoplastos después de 1h con enzima en agitación y 24 h en refrigeración.</i>	129
<i>Fig. 47. Protoplastos después de 1 h con enzima en agitación y 24 h en refrigeración.</i>	130
<i>Fig. 48. Protoplastos de cajas y frascos después de 16 h.</i>	131
<i>Fig. 49. Células con pared 10x después de 1 mes de la siembra.</i>	132
<i>Fig. 50. Microcallos Caja 1 y 2 después de 8 días de la siembra.</i>	133
<i>Fig. 51. Comparación de embriogénesis somática y cigótica.</i>	143
<i>Fig. 52. Estados de los embriones en planta monocotiledónea.</i>	143
<i>Fig. 53. Rol de la auxina durante la embriogénesis.</i>	146
<i>Fig. 54. Esquema del surgimiento de inflorescencias de plantas 3C-5E.</i>	147
<i>Fig. 55. Inflorescencias inmaduras usadas para embriogénesis somática.</i>	148
<i>Fig. 56. Inflorescencia madura planta 5E utilizada para aislar semillas inmaduras.</i>	149
<i>Fig. 57. Proceso de desinfección inflorescencia 4D.</i>	151
<i>Fig. 58. Proceso de desinfección IMad5E.</i>	153

<i>Fig. 59. Respuesta de la Inf.1.</i>	155
<i>Fig. 60. Respuesta de la Inf.1 después de dos meses de siembra en medio ST-I.</i>	156
<i>Fig. 61. Respuesta de la Inf.1 después de dos meses de siembra en medio ST-I.</i>	157
<i>Fig. 62. Respuesta de la I4D en medio ST-I.</i>	158
<i>Fig. 63. Respuesta de la I4D en medio ST-C.</i>	159
<i>Fig. 64. Respuesta de la IA4D después de 3, 4 y 5 meses en medio ST-C.</i>	160
<i>Fig. 65. Respuesta de brote de IA4D después de 5-7 meses en medio ST-C 50%D.</i>	161
<i>Fig. 66. Respuesta de IA4D en medio ST-C 50%D después de 6 y 7 meses.</i>	162
<i>Fig. 67. Respuesta de IA, IBM, IBI de la planta 4D después de 1 mes y 26 días en medio ST-I.</i>	163
<i>Fig. 68. Respuesta de IA, IBM de la planta 4D después de 3 meses y 27 días en medio ST-C (50%D) y ST-I.</i>	164
<i>Fig. 69. Respuesta de la IA de la planta 4D después de 5 meses y 21 días en medio ST-C (50%D) y ST-I.</i>	165
<i>Fig. 70. Respuesta de la IA de la planta 4D después de 5 meses y 21 días en medio ST-C (50%D) y ST-I.</i>	166
<i>Fig. 71. Brote de la planta 4D después de 5 meses y 21 días en medio ST-C (50%D).</i>	167
<i>Fig. 72. Semillas IMad5E.</i>	168
<i>Fig. 73. Respuesta de I5E en medio ST-I.</i>	169
<i>Fig. 74. Respuesta de IA e IM en medio MS después de 4 meses.</i>	170
<i>Fig. 75. Embriones germinados con hojas verdaderas.</i>	171

ÍNDICE DE TABLAS

<i>Tabla. 1. Clasificación taxonómica.</i>	20
<i>Tabla. 2. Revisión bibliográfica sobre el establecimiento y la regeneración in vitro de cuna de Moisés.</i>	37
<i>Tabla. 3. Diferentes métodos de desinfección probados en el establecimiento de cultivos celulares de Cuna de Moisés (Spathiphyllum sensation).</i>	62
<i>Tabla. 4. Diferentes métodos de desinfección probados en el establecimiento de cultivos celulares de Cuna de Moisés (Spathiphyllum sensation).</i>	64
<i>Tabla. 5. Medios de cultivo probados en los diferentes ensayos.</i>	70
<i>Tabla. 6. Medios de cultivo probados y sus componentes.</i>	70
<i>Tabla. 7. Variación de antibióticos y antifúngicos en medio MS.</i>	71
<i>Tabla. 8. Variación de la concentración de L-cisteína en medio ST-1.</i>	72
<i>Tabla. 9. Tipo de brote y medidas de planta y rizoma.</i>	80
<i>Tabla. 10. Elementos usados en cada ensayo de protoplastos.</i>	114
<i>Tabla. 11. Medios de cultivo líquidos para protoplastos (1l).</i>	117
<i>Tabla. 12. Medio de cultivo para cultivo de protoplastos (1l).</i>	118
<i>Tabla. 13. Medio de cultivo para obtención de embriones somáticos (1l).</i>	153

ÍNDICE DE GRÁFICAS

<i>Gráfica 1. Porcentaje de oxidación en cada explante.</i>	89
<i>Gráfica 2. Porcentaje de oxidación en cada explante del rizoma de acuerdo al transcurso de los días.</i>	89
<i>Gráfica 3. Porcentaje de oxidación con respecto la combinación de antioxidantes en el transcurso de los días en LF, Li, Ap, Nc, Ri.</i>	90
<i>Gráfica 4. Diámetros promedio de los protoplastos obtenidos en los ensayos a partir de láminas foliares provenientes de medio sólido.</i>	134
<i>Gráfica 5. Suspensión de protoplastos obtenidos en cada ensayo de protoplastos.</i>	134
<i>Gráfica 6. Tiempos de emergencia de las inflorescencias.</i>	172
<i>Gráfica 7. Días totales en los que las inflorescencias han estado en los distintos medios de cultivo (enero, 2024).</i>	172

ABREVIATURAS

Reguladores de crecimiento:

1. Auxinas:

2,4-D	Ácido 2,4-diclorofenoxiacético
AIB	Ácido indol-3-butírico
ANA	Ácido naftalenacético
Dicamba	Ácido 3,6-Dicloro-o-anisico
Picloram	4-amino-3,5,6-tricloropiridina-2-ácido carboxílico

2. Citocininas:

2-iP	N ⁶ -(2-isopentil) adenosina
BAP (BA)	6-bencilaminopurina
Kn	Kinetina
TDZ	Tidiazurón

3. Giberelinas:

AG₃	Ácido Giberélico
-----------------------	------------------

4. Aminoácidos:

Adenina (6-aminopurina) Hemisulfato

Glicina Ácido aminoacético

Cocteles y vitaminas:

Cock-20 Coctel 20

Cock-22 Coctel 22

Vit-R2 Vitamina R2 (vitaminas MS modificadas)

Adsorbentes:

- CA** Carbón activado
PVP Polivinilpirrolidona

Antioxidantes:

- AC** Ácido cítrico
AA Ácido ascórbico
AgNO₃ Nitrato de plata

- Biosíntesis del etileno:

- ACC** Ácido 1-amino-ciclopropano-1-carboxílico
SAM S-adenosil-L-metionina

Medios de cultivo:

- B5** Medio basal de Gamborg con mínimos orgánicos¹ (1968)
CPW “Cell and protoplast washing” Medio de lavado de células y protoplastos
MS Medio de cultivo Murashige y Skoog (1962)
N₆ Medio basal de Chu con mezcla de sales (1975)

Medios de cultivo modificados:

- ST-1** Medio de cultivo MS de *Spathiphyllum sensation* con AIB
ST-2 Medio de cultivo MS de *Spathiphyllum sensation* con ANA
ST-C Medio de cultivo B5 de *Spathiphyllum sensation* para inducir callo
ST-C 0%D Medio de cultivo B5 con 0ml/l de Dicamba.
ST-C 25%D Medio de cultivo B5 con 15ml/l de Dicamba.

¹Compuestos orgánicos requeridos en muy bajas concentraciones como son vitaminas y aminoácidos, ver anexo 1 tabla 5.

ST-C 50%D Medio de cultivo B5 con 30ml/l de Dicamba.

ST-C 100%D Medio de cultivo B5 con 60ml/l de Dicamba.

ST-I Medio de cultivo N₆ de *Spathiphyllum sensation* para inflorescencia

Desinfección:

NaClO Solución de Hipoclorito de sodio comercial al 6% de ingrediente activo.

Tween®-20 Polioxietilenosorbitán

Inducción de brotes adventicios:

Ap Ápice

LF Lámina foliar

Li Lígula

NC Nervadura central

RB Rizoma basal

Ri Rizoma

RM Rizoma medio

RS Rizoma superior

Cultivo de protoplastos:

CPW0M Sales del medio CPW con 0% de manitol

CPW3M Sales del medio CPW con 3% de manitol

CPW6M Sales del medio CPW con 6% de manitol

CPW9M Sales del medio CPW con 9% de manitol

CPW13M Sales del medio CPW con 13% de manitol

CPW21S Sales del medio CPW con 21% de sacarosa

Inflorescencia-embriones somáticos:

EC	Embriogénesis cigótica
ES	Embriogénesis somática
I4D	Inflorescencia planta 4D
I5E	Inflorescencia planta 5E
IA4D	Inflorescencia apical de planta 4D
IA5E	Inflorescencia apical de planta 5E
IB5E	Inflorescencia basal de planta 5E
IBI	Inflorescencia basal inferior de planta 4D
IBM	Inflorescencia basal media de planta 4D
IM5E	Inflorescencia media de planta 5E
IMad5E	Inflorescencia madura planta 5E
Inf.1	Inflorescencia planta 3C
LFF	Lámina foliar flor

Otros:

COVs	Compuestos orgánicos volátiles
CTV	Cultivo de Tejidos Vegetales
S.	<i>Spathiphyllum</i>

RESUMEN

La presente investigación se llevó a cabo en tres etapas, que corresponden a las distintas técnicas de cultivo de tejidos vegetales utilizadas para lograr la diferenciación de brotes y/o embriones somáticos., estas técnicas se aplicaron en la especie *Spathiphyllum sensation*, nombre científico de la denominada Cuna de Moisés. La primera consistió en la inducción de brotes adventicios, para la cual se desarrollaron 7 ensayos en los que se probaron diferentes métodos de desinfección en donde se evaluaron diferentes soluciones químicas (solución de NaClO, antioxidantes, medio de cultivo líquido, agroquímicos), a distintos tiempos y concentraciones; así mismo se probaron distintos explantes de la planta madre; ya estériles se sembraron en medios de cultivo diseñados MS y B5 con variaciones de antioxidantes.

La segunda etapa se sustenta en el cultivo de protoplastos. Para esta etapa se desarrollaron 2 ensayos en el cual se utilizaron cultivos de láminas foliares de los ensayos de la primera etapa y con base en la revisión bibliográfica se diseñó un protocolo de obtención de protoplastos en donde se evaluaron: la procedencia (medio de cultivo sólido o líquido), de las láminas foliares; las concentraciones de las enzimas celulasa y macerozyme R-10; número de los filtros para la filtración de enzimas y su apertura de poro; número de centrifugaciones; tipo y apertura de poro del soporte del cultivo de protoplastos. Para la siembra se empleó el medio de cultivo CPW de acuerdo a lo reportado en la literatura de protoplastos.

En estas dos etapas no se obtuvieron los resultados esperados ya que en la primera etapa los explantes empleados se oxidaban con facilidad y por consiguiente impedían la respuesta de estos, en el caso de la segunda etapa sólo se obtuvieron microcallos (pequeños fragmentos de masa amorfa de células no diferenciadas) y algunos callos, pero no se logró regenerar la planta por esta vía.

La etapa final reside en la obtención de embriones somáticos a partir de inflorescencias inmaduras. Para esta etapa se desarrollaron 3 ensayos en donde se evaluaron: los tiempos de emergencia de las inflorescencias; se probaron 2 medios

de cultivo distintos: B5 y N6 en donde para el medio B5 se evaluaron distintas concentraciones de Dicamba. Por esta vía de regeneración si se lograron obtener embriones somáticos hasta estado coleoptilar e, incluso, de algunos embriones somáticos lograron germinar y se observaron la formación de hojas.

Cabe señalar que el presente trabajo fue un reto para la regeneración de esta especie, ya que no existen artículos que reporten ninguna vía regenerativa, sino que parten de brotes ya diferenciados bajo condiciones de invernadero y, a través de estas técnicas de Cultivo de Tejidos Vegetales, se tiene una gran ventaja en la producción a gran escala debido a que se logran cantidades mayores que con los sistemas tradicionales en invernadero, además de que las plantas obtenidas están libres de cualquier patógeno, situación observada al estudiar plantas provenientes de invernadero.

Fundamentalmente se probaron estas tres vías regenerativas porque la oxidación era un problema muy fuerte y frecuente en los explantes probados, pero se logró eliminar casi por completo con las inflorescencias inmaduras y con la embriogénesis somática, vía por la que se regeneró *Spathiphyllum sensation*.

CAPÍTULO I: ANTECEDENTES

1. *Spathiphyllum sensation*

La planta llamada Cuna de Moisés (*Spathiphyllum sensation*) es una especie con origen en Sudamérica, más específicamente de las selvas de Colombia, aunque también se consideran centro de origen Panamá, Ecuador, Venezuela, el Archipiélago Malayuo, Costa Rica y Filipinas, donde crece en bosques húmedos y tropicales (Rego y Faria, 2001). *Spathiphyllum* se introdujo por primera vez en Europa en 1824 (Jianjun *et al.*, 2003) y se traduce literalmente como "espata de hoja", es comúnmente llamado Lirio de la Paz, Flor de Nieve, Flor de Espata, o anturio blanco, mientras que en México se conoce como Cuna de Moisés. El *Spathiphyllum* es un género de los 108 géneros en promedio que se reportan (Moreno, 2022; Díaz, 2016), en la familia de las *Araceae* [familia de monocotiledóneas herbáceas (Díaz, 2016)], aunque otros autores han reportado 144 géneros con 3600 especies para esta familia (Boyce y Croat, 2018). El género *Spathiphyllum* comprende más de 89 especies (Croat y Weessies, 2020), de las cuales más del 90% están restringidas al Neotrópico (Bunting, 1960; Mayo *et al.*, 1997; Croat y Weessies, 2020). En México hay 13 géneros y 109 especies de la familia *Araceae*, entre nativas y naturalizadas, y generalmente son cultivados con fines ornamentales. En Veracruz se tienen 55 especies nativas distribuidas en 10 géneros (Croat y Acebey, 2015). Cabe señalar que *Spathiphyllum sensation* pertenece a la categoría grande de los tipos de *Spathiphyllum*. En la Fig. 1 se observa el cultivo de *Spathiphyllum sensation* en forma comercial.



Fig. 1. Producción comercial de cultivos de *Spathiphyllum* en un invernadero a la sombra (Jianjun et al., 2003).

1.1. Clasificación taxonómica de *Spathiphyllum*

La Cuna de Moisés o *Spathiphyllum* tiene la siguiente clasificación taxonómica (NCBI, 2023).

Tabla. 1. Clasificación taxonómica.	
Super reino	Eucariota
Reino	Viridiplantae (plantas verdes)
Subfilo	Streptophyta
Clado	Tracheophyta (plantas vasculares)
Clase	Spermatophyta (plantas de semilla)
Clado	Mesangiospermas
Clado	Liliopsida (monocotiledóneas)
Orden	Alismatales
Familia	Araceae (Aráceas)
Subfamilia	Pothoideae
Tribu	Monsteroideae
Género	<i>Spathiphyllum</i>
Especie	<i>Spathiphyllum sensation</i>
N. común	Cuna de Moisés

1.2. Descripción de la especie

1.2.1. Variedades

Spathiphyllum es un género de unas 89 especies de plantas con flores, es una planta herbácea que vive varios años (perenne) y suele cultivarse como planta de interior. Aunque puede alcanzar los 183 cm de altura, en interiores suele crecer hasta 92 cm (North Carolina State University [NCSU], 2023). Se dividen en tres categorías de acuerdo con el tamaño: pequeño, mediano y grande. Tamaño pequeño: pueden alcanzar hasta 60 cm de altura y florecen durante todo el verano y el otoño, en esta categoría se encuentran: *Spathiphyllum 'Power Petite'*, *Spathiphyllum wallisii*, *Spathiphyllum 'Piccolino'*, *Spathiphyllum 'Little Angel'*, *Spathiphyllum floribundum*. Tamaño mediano: estas plantas pueden crecer hasta 90 cm de altura y extenderse hasta 60 cm de anchura, en esta categoría se encuentran: *Spathiphyllum 'Mauna Loa Supreme'*, *Spathiphyllum 'Domino'*, *Spathiphyllum cochlearispathum*. Tamaño grande o gigante: suelen crecer entre 60 y 120 cm de altura y su follaje varía del verde intenso al verde grisáceo. No requieren mucho mantenimiento y producen espatas blancas de hasta 15 cm de ancho durante todo el año si se les proporciona el entorno adecuado. En esta categoría se encuentran: *Spathiphyllum sensation*, *Spathiphyllum 'Bongo Bongo'* (Donovan, 2023).

1.2.2. Raíz

Tienen un sistema de raíces rizomatoso o conocido como rizoma subterráneo (ver Fig. 2) comúnmente alargado y que funciona como órgano de acumulación de reservas que es parecido a una raíz, pero provisto de yemas en la parte superior y raíces en la inferior, también es conocido como su órgano de multiplicación (Elicriso, 2018). Se reproducen naturalmente a través de este tallo subterráneo modificado que forma nuevas raíces y produce nuevos brotes a partir de sus nudos.

Las nuevas plantas que crecen de los brotes tienen raíces independientes y se pueden separar de la planta madre sin dañarla. Dichas plantas se pueden

trasplantar y así es como se propaga la cuna de Moisés por división de brotes adventicios (Brown, 2023).

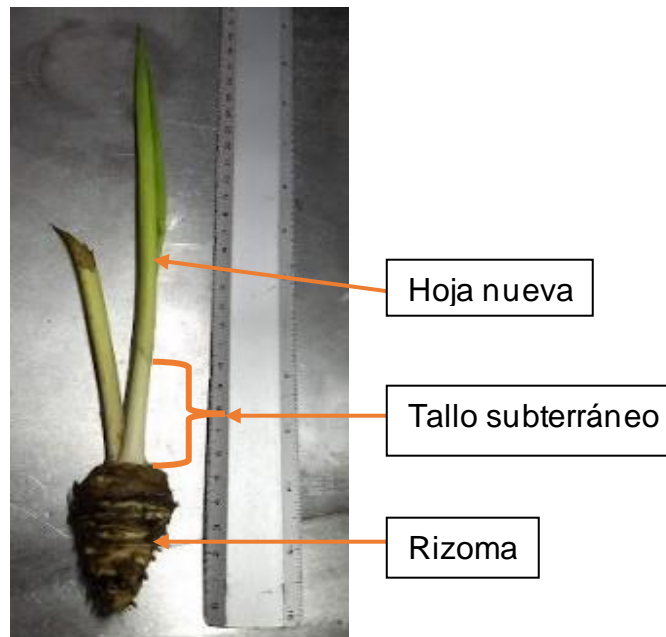


Fig. 2. Rizoma con longitud de 5.5 cm (Vieyra, 2023).

1.2.3. Hojas

Nacen del rizoma y se disponen de forma circular (rosetas basales). Son erectas, simples, ovado-lanceoladas a elíptico-oblongas, de 4 a 25 pulgadas de largo y de 1 a 10 pulgadas de ancho. Son puntiagudas, de color verde oscuro, brillantes, rugosas y tienen una nervadura central prominente, a menudo con numerosas venas laterales impresas. El pecíolo es más corto o igual de largo que la hoja. No presenta variegación² o cambio de coloración (NCSU, 2023).

² Diferentes zonas coloreadas en las hojas.

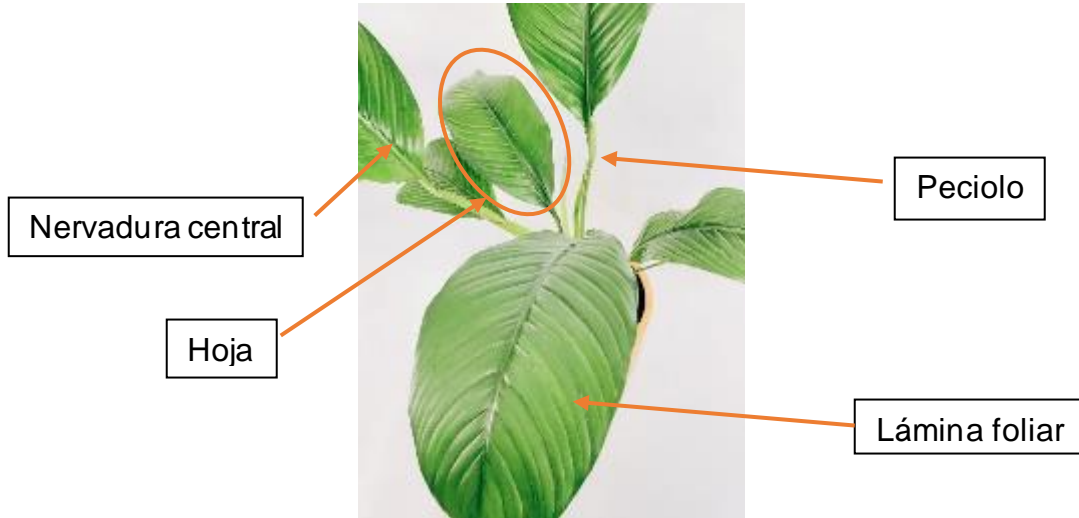


Fig. 3. Hojas de *Spathiphyllum sensation* (Un cuarto verde, 2021).

1.2.4. Flor

La inflorescencia también conocida como espádice lleva flores masculinas y femeninas (Elicriso, 2018), en cada fruto, está envuelta por una bráctea conocida como espata de coloración blanca cuando alcanza la maduración pero que a medida que pasa el tiempo, asume un color verde pálido, crece en forma de hoja puntiaguda de entre 10 y 12 cm por encima del follaje. Las formas de la espata pueden variar de alargada y alargada-en pico. Es de cóncava a plana, termina en punta y se extiende o puede curvarse alrededor del espádice. El espádice es blanco verdoso o crema, más corto que la espata; el pedúnculo sobrepasa el follaje (Fig. 4) (NCSU, 2023).

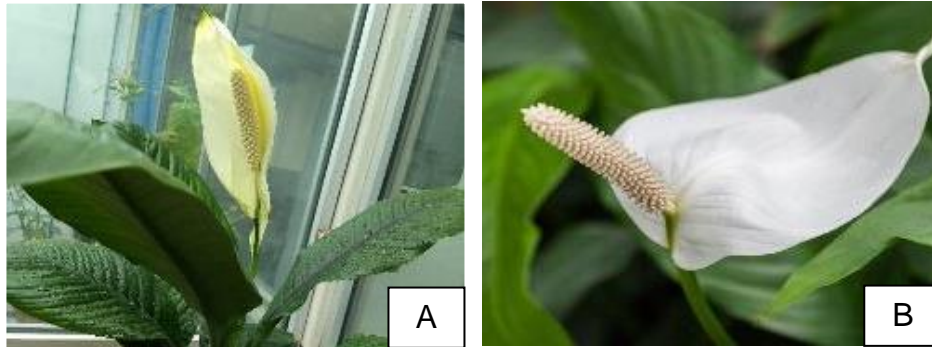


Fig. 4. Estados de madurez de la inflorescencia. A. Inflorescencia en desarrollo de maduración con coloración crema-blanco (Vieyra, 2023), B. Inflorescencia en estado maduro con una coloración completamente blanca (Portillo, 2020).

1.2.5. Frutos

Cada fruto proviene de la inflorescencia, cuando alcanzan la maduración tienen forma circular (Fig. 5), pero mientras se encuentran en proceso de maduración terminan en forma de punta, la coloración también varía: de color crema-amarillo a verde claro-verde fuerte.

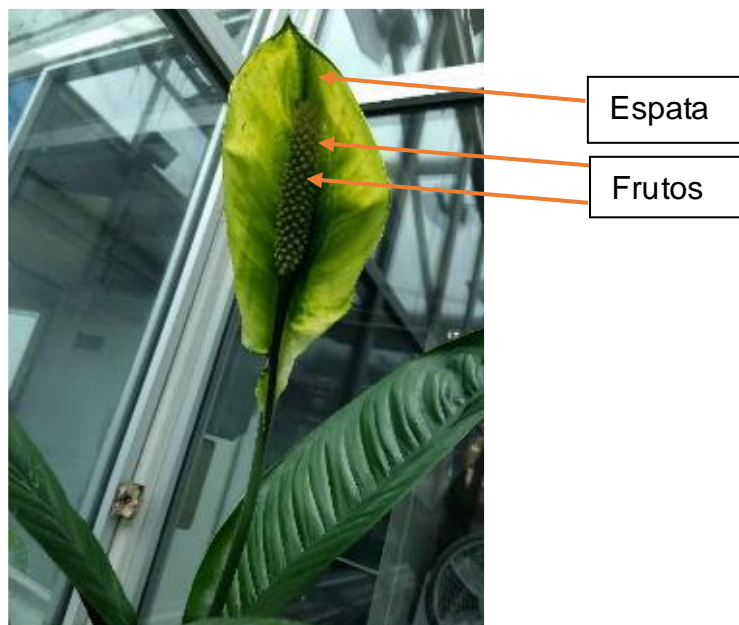


Fig. 5. Inflorescencia con crecimiento de frutos (Vieyra, 2023).

1.3. Distribución

La distribución de las especies de *Spathiphyllum* varía en función de la especie concreta. Las enlistadas a continuación son algunas de las especies que se encuentran en México.

1. *Spathiphyllum wallisii*: Esta especie está ampliamente distribuida por partes de México, las islas del Caribe y el norte de Sudamérica (Bunting, 1960). Se reportó su origen en Colombia (Bunting, 1960).

2. *Spathiphyllum cochlearispathum*: Esta especie es originaria de las regiones tropicales de América y el sureste de Asia, se distribuye en selvas tropicales de la costa del caribe de México, Veracruz, este de Oaxaca y Chiapas, Tabasco y en los cenotes de Yucatán (Bunting, 1960), en centroamérica [Belice, Costa Rica, El Salvador y Guatemala (Croat y Acebey, 2015)]. Se cultiva habitualmente como planta ornamental de interior (PictureThis, 2023).

3. Otras especies: La distribución de otras especies de *Spathiphyllum* puede variar. Algunas especies son nativas de las regiones tropicales de América, mientras que otras son nativas del sudeste de Asia (Plants Rescue, 2023).

En general, las especies de *Spathiphyllum* se encuentran principalmente en regiones tropicales con condiciones climáticas adecuadas para su crecimiento. Prosperan en condiciones de poca luz y a menudo se cultivan como plantas de interior (Plants Rescue, 2023).

En la Fig. 6 se muestra la distribución geográfica de *Spathiphyllum* de acuerdo con Bunting, 1960. En este libro no se indica la distribución de *Spathiphyllum sensation*.

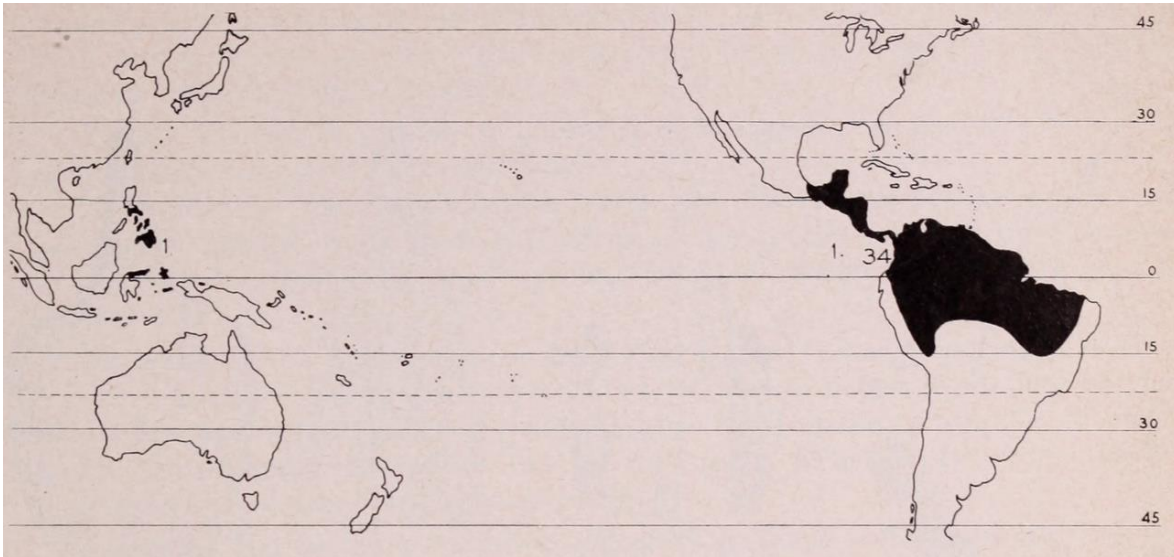


Fig. 6. Distribución geográfica de *Spathiphyllum* (Tomado de Bunting, 1960). Los numerales indican el número de especies en cada zona. Observe la presencia de una sola especie (*S. laeve*) en la isla de cocos y otra (*S. commutatum*) en la zona indonesio-filipina.

1.4. Importancia económica y ventajas

El *Spathiphyllum*, tiene varios usos y beneficios:

1. Purificación del aire: Puede ayudar a mejorar la calidad del aire interior y reducir el riesgo de problemas relacionados con la salud causados por la contaminación del aire interior. La NASA incluso elogió la capacidad de purificación de la planta en el estudio “Clean Air” por su capacidad para eliminar formaldehído, benceno, y monóxido de carbono del aire interior (Jianjun *et al.*, 2003).

2. Bajo mantenimiento: Son plantas de interior de bajo mantenimiento, por lo que son una opción popular para aquellos que quieren una planta que requiera un cuidado mínimo (Desk, 2020; Brandy, 2023; Casalena, 2022). Son relativamente fáciles de cuidar y pueden prosperar en diversos ambientes interiores.

3. Mejora la decoración del hogar: Al ser una planta visualmente atractiva con sus grandes brácteas blancas y sus hojas verdes brillantes puede añadir un toque de belleza y frescura a cualquier habitación, por lo que es una opción popular para la decoración del hogar (Desk, 2020; Suyash, 2023).

4. Elimina las radiaciones nocivas: Algunos creen que esta planta puede ayudar a eliminar las radiaciones nocivas que emiten los ordenadores y otros aparatos electrónicos (Desk, 2020).

5. Planta ornamental: Se utiliza a menudo como planta ornamental en oficinas y otros espacios como jardines de interior, acuarios y para arreglos florales (Croat y Acebey, 2015). Siendo este el uso más importante desde el punto de vista económico. Se cree que trae buena fortuna, paz, esperanza y prosperidad (Desk, 2020).

6. Mejora de la productividad: Se ha demostrado que añadir vegetación, como lirios de la paz, a los espacios de oficina aumenta la productividad y mejora la concentración y la satisfacción en el trabajo (Casalena, 2022).

7. Fácil propagación: Son relativamente fáciles de propagar por división, lo que permite la producción de varias plantas a partir de una sola planta madre (Casalena, 2022). Esta puede ser una forma rentable de ampliar el número de lirios de la paz en una casa u oficina.

En resumen, la importancia económica de *Spathiphyllum* radica en su capacidad para purificar el aire interior, aumentar la productividad, proporcionar valor ornamental y simbolizar la energía positiva y la prosperidad. Son plantas versátiles que ofrecen beneficios tanto prácticos como estéticos.

1.5. Cultivo de Tejidos Vegetales (CTV)

1.5.1. Definición y un poco de historia

El cultivo de tejidos vegetales es un proceso en el que segmentos de tejido vivo, llamados explantes, se cultivan asépticamente en un medio de cultivo. Los explantes apropiados se almacenan en ambientes con luz y temperatura controladas. Este método es accesible para los agricultores y puede utilizarse en casi todas las etapas de propagación, desde la conservación de genes, el intercambio y la mejora de la diversidad genética hasta la selección y el mejoramiento de genotipos superiores (Team, 2023). Los experimentos con el

cultivo de tejidos comenzaron en el siglo XIX con dos biólogos alemanes: M. J. Schleden y T. Schwann, ellos informaron que siempre que se extraigan células de algunas plantas, se puede regenerar toda la planta (Bonga y Von Anderkas, 1992). De esta experiencia surgió el concepto de totipotencialidad, que establece que cada célula es una unidad capaz de producir un nuevo organismo, y que cada célula de un organismo multicelular almacena la información contenida en el óvulo fecundado. La totipotencialidad promueve la regeneración en plantas con baja masa de tejido y células aisladas, estas además contienen un alto nivel de plasticidad en respuesta a estímulos físicos y ambientales (Team, 2023).

El año 1934 supuso un punto de inflexión en los principios del cultivo de tejidos vegetales, especialmente por las infinitas y diferenciadas posibilidades del principio de crecimiento. White cultivó raíces de tomate en un medio nutritivo definido en 1934, y Gautheret plantó tres tipos de callos (desdiferenciados) en la zona de cambio ese mismo año (Team, 2023).

El CTV se utiliza ampliamente para incluir diversas alternativas, como el cultivo de meristemas para la propagación de plantas libres de virus, el cultivo de protoplastos, el cultivo de células en suspensión, el cultivo de tejidos u órganos, y el cultivo de anteras o polen para producir plantas haploides³. Dichas alternativas se logran mediante un medio de cultivo estéril bajo condiciones controladas de temperatura, luz y humedad.

1.5.2. Factores

En el CTV se dice que, en las condiciones adecuadas, cualquier parte de la planta madre puede utilizarse para producir nuevas plántulas. Sin embargo, estas condiciones involucran múltiples factores que técnicamente se clasifican en tres categorías: biológicos, químicos y externos. Los factores biológicos incluyen la edad del material vegetal donante, el genotipo, la parte de la planta y la temporada de crecimiento en la que se recolectaron los explantes. Dependiendo de estos factores, la planta puede reaccionar tarde o temprano (a veces no responde, hecho

³ Que posee un único juego de cromosomas.

demostrado por la recalcitrancia). La elección de las partes de la planta es aquí muy importante. Dado que la planta proviene de condiciones *ex vitro*, es necesario esterilizarla tanto externa como internamente (selección de la población endofítica⁴) (Suarez, 2020). Estos contaminantes crecen fácilmente en los medios de CTV y, por lo tanto, compiten con los explantes por nutrientes y fuentes de carbono. Por lo tanto, la eliminación de estos es un paso necesario cuando comienza el cultivo. Después del cultivo, dependiendo del objetivo final del experimento, se nutre el explante.

Los factores químicos incluyen sales minerales, vitaminas, aminoácidos y reguladores del crecimiento, que en combinación con el explante y otros componentes regulan la expresión morfogénica y permiten la regeneración de toda la planta. La composición química es sin duda un factor fundamental en la producción de plantas a gran escala en poco tiempo y en espacios reducidos. Por tanto, es necesario reconocer adecuadamente los elementos básicos del diseño de medios de cultivo.

Por otra parte, existen factores externos importantes como la luz y la temperatura, que se deben de controlar. Ya que el exceso de luz blanca puede resultar en un color pálido en las hojas y este resultado a menudo se identifica erróneamente como una deficiencia de nutrientes, por lo que se recomienda colocar este tipo de especie en un lugar con una luz no directa.

En cuanto a la temperatura, un consenso general entre los agricultores reporta que *Spathiphyllum* tolera mejor el frío que otras aráceas. En un estudio se demostró que la exposición a 7 °C podía causar daños por frío en algunos cultivos, y que el crecimiento se retrasaba o reducía cuando las plantas fueron expuestas a 11°C

⁴ Microorganismos internos de la planta que no causan daño.

durante cinco días. El intervalo de temperatura preferido para la producción de la Cuna de Moisés es de 21-32°C (NCSU, 2023).

1.5.3. Factores para considerar en el pase a suelo

En primer lugar, en algunas especies es requisito indispensable para pasar a suelo la formación de raíces *in vitro*, esto se logra con el uso de auxinas (AIA, ANA y AIB), reduciendo la cantidad de nutrientes en el medio o disminuyendo la fuente de carbono.

En segundo lugar, se deben formar raíces en sustratos artificiales y se deben adaptar los órganos a condiciones ambientales naturales considerando varios factores: mezclas de suelo, temperatura, humedad relativa, fotoperiodo y concentraciones de CO₂.

1.5.4. Medio de cultivo

El origen de los explantes, el tipo de medio adecuado para esos explantes, la temperatura y los componentes adicionales son algunos de los parámetros importantes a considerar al preparar el medio de cultivo (Saad y Elshakhed, 2012). El medio de cultivo es un factor importante porque recrea un ambiente adecuado para el crecimiento de las plantas y simula la disponibilidad de nutrientes en la naturaleza. El medio ideal debe contener minerales, vitaminas, aminoácidos, azúcares, reguladores de crecimiento, agentes solidificantes y acidez (pH). Además de la composición general del medio nutritivo, se pueden incluir otros aditivos como CA, inhibidores de etileno, antioxidantes y compuestos orgánicos complejos como agua de coco, extracto de levadura e hidrolizados de caseína (Krishna et al., 2008). Entre los medios de cultivo más utilizados en el cultivo de tejidos están: Medio MS, N₆ y B5, cuyas formulaciones se pueden consultar en el anexo 1.

1.5.4.1. Sales

Las sales se dividen en dos categorías: macronutrientes y micronutrientes. Los macronutrientes son nitrógeno (N³⁻), fósforo (P³⁻), potasio (K⁺), calcio (Ca²⁺), magnesio (Mg²⁺) y azufre (S²⁻) para un crecimiento y morfogénesis satisfactorios. Los medios de cultivo deben contener al menos 25-60 mM de nitrógeno inorgánico

para un crecimiento satisfactorio de las células vegetales. El potasio es necesario para el crecimiento celular de la mayoría de las especies vegetales. La mayoría de los medios contienen K^+ en forma de sales de nitrato de potasio en concentraciones que oscilan entre 20 y 30 mM. Las concentraciones óptimas de P^{3-} , Mg^{2+} , S^{2-} y Ca^{2+} oscilan entre 1 y 3 mM si se proporcionan otros requisitos para el crecimiento celular (Torres, 1989). Los micronutrientes esenciales son el hierro (Fe^{2+}), el manganeso (Mn^{2+}), el zinc (Zn^{2+}), el boro (B^{3+}), el cobre (Cu^{2+}) y el molibdeno (Mo^{6+}). El hierro suele ser el más importante de todos los micronutrientes. Este elemento se utiliza como sales de citrato o de tartrato en los medios de cultivo; sin embargo, existen algunos problemas con estos compuestos por su dificultad para disolverse y precipitarse tras la preparación de los medios. Se ha intentado resolver este problema utilizando quelato de hierro y ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) (FeEDTA) (Murashige, 1962, citado por Torres, 1989). También se ha desarrollado un procedimiento para preparar una solución de quelato de hierro que no precipite (Steiner, 1970; Torres, 1989). El cobalto (Co^{2+}) y el yodo (I^-) pueden añadirse a determinados medios, pero sus requisitos para el crecimiento celular no se han establecido con precisión. El sodio (Na^+) y el cloro (Cl^-) también se utilizan en algunos medios, a pesar de los informes que indican que no son esenciales para el crecimiento. El cobre y el cobalto se añaden a los medios de cultivo en concentraciones de 0,1 μM , el hierro y el molibdeno en 1 μM , el yodo en 5 μM , el zinc en 5-30 μM , el manganeso en 20-90 μM y el boro en 25-100 μM (Torres, 1989). En el anexo 1 se presenta la formulación de los medios MS, B5 entre otros.

1.5.4.2. Fuentes de carbono y energía

En el medio de cultivo utilizado en CTV, además de la sacarosa comúnmente utilizada en una concentración del 2-5% como fuente de carbono, también se utilizan otros carbohidratos: lactosa, galactosa, maltosa y almidón, pero sus efectos no son tan buenos como los de la sacarosa. La sacarosa tiene varias ventajas: la esterilización en un autoclave ha demostrado ser más beneficiosa para el crecimiento del cultivo que la esterilización a través de un filtro, ya que el autoclave parece hidrolizar la sacarosa de manera más eficiente en azúcares utilizables por las células, por ejemplo, fructosa. Este actúa como un activador morfogenético en

la formación de yemas axilares y ramificación de raíces adventicias (Vinterhalter, 1997; Saad y Elshahed, 2012); inhibe la formación de clorofila y la fotosíntesis; promueve la división celular y actúa como agente osmótico durante el aislamiento de protoplastos. En lugar de sacarosa, también se puede añadir al medio de cultivo los suplementos como: melaza de caña, extracto de plátano y agua de coco. Además de ser azúcares, estos sustratos son fuentes de vitaminas e iones minerales necesarios para el crecimiento (Saad y Elshahed, 2012).

1.5.4.3. Vitaminas y myo-inositol

Las vitaminas son necesarias para el crecimiento y desarrollo normal de las plantas, ya que las requieren como catalizadores de diversos procesos metabólicos. Cuando las células y tejidos vegetales se cultivan *in vitro*, pueden servir como factores limitantes para el crecimiento y la diferenciación celular (Torres, 1989). Las vitaminas más utilizadas en los medios de cultivo de células y tejidos son: tiamina (B1), niacina y piridoxina (B6). La tiamina es esencial para el crecimiento de todas las células (Saad y Elshahed, 2012) y se utiliza en concentraciones que oscilan entre 0,1 y 10 mg/l. La niacina y la piridoxina, aunque no son esenciales para el crecimiento celular en muchas especies, se añaden con frecuencia a los medios de cultivo (Saad y Elshahed, 2012). La niacina se utiliza en concentraciones que oscilan entre 0,1 y 5 mg/l y la piridoxina en concentraciones que oscilan entre 0,1 y 10 mg/l. Otras vitaminas como la biotina, el ácido fólico, los AA, el ácido pantoténico, el tocoferol (vitamina E), la riboflavina y el ácido p-amino-benzoico también se utilizan en algunos medios de cultivo celular, pero no son factores limitantes del crecimiento. Se recomienda agregar vitaminas al medio de cultivo solo cuando la concentración de tiamina sea inferior a la requerida o cuando las células necesiten cultivarse en densidades de población bajas (Saad y Elshahed, 2012). Aunque no es una vitamina sino un alcohol de azúcar, pequeñas adiciones de myo-inositol pueden estimular el crecimiento celular en la mayoría de las especies de plantas (Saad y Elshahed, 2012). Se cree que el myo-inositol desempeña un papel en la división celular porque se descompone en AA y pectina e incorpora fosfoinosítidos

y fosfatidil-inositol. Generalmente se utiliza en medios de cultivo de células y tejidos vegetales en una concentración de 50-5000 mg/l.

1.5.4.4. Reguladores de crecimiento.

Son compuestos químicos, algunos naturales (hormonas) y otros sintéticos, que en concentraciones muy bajas afectan los procesos de crecimiento y desarrollo de las plantas (Davies, 2004). Los tejidos *in vitro* muchas veces no logran producir las cantidades necesarias de reguladores para satisfacer las necesidades de sus procesos, por lo que es necesaria la suplementación con fuentes exógenas. Las hormonas clásicas o reguladores del crecimiento son las auxinas, citoquininas, giberelinas, ácido abscísico y etileno (Suárez, 2011).

Auxinas: Estimulan la dominancia apical, el crecimiento y diferenciación celular, el desarrollo de meristemas, la inducción de raíces adventicias, la embriogénesis somática y contribuyen al crecimiento en longitud. Las auxinas están presentes en toda la planta y se encuentran en concentraciones más altas en las regiones meristemáticas.

En su estado natural, las plantas producen AIA e AIB, que se sintetizan en las puntas de las hojas y se mueven desde las puntas de las hojas hasta las raíces en forma de válvulas basales.

Los compuestos sintetizados en el laboratorio incluyen ANA, 2,4-D y picloram. En el cultivo de tejidos *in vitro*, AIB y ANA se utilizan con mayor frecuencia para la micropropagación y organogénesis de meristemas. El 2,4-D y el picloram son más potentes, por eso se utilizan para inducir tejido embriogénico. El AIA se utiliza con menos frecuencia debido a su susceptibilidad a la degradación enzimática (Suárez, 2020).

Citocininas: Son hormonas vegetales naturales que actúan interrumpiendo la dominancia apical, la división celular en tejidos no meristemáticos, el desarrollo de yemas axilares, retrasando la senescencia de las hojas e induciendo la formación de brotes. Se sintetizan en el ápice de la raíz, desde donde son transportados a las yemas terminales y axilares; también se producen en zonas de crecimiento como el

meristemo. Las mayores concentraciones de citoquinina se encuentran en embriones y plántulas en desarrollo (Suárez, 2020).

Naturalmente, la Zeatina [que se encuentra en el maíz (*Zea*)] y la 2-isopenteniladenina (2iP) son sintetizadas por las plantas, pero también se pueden encontrar comercialmente alternativas como BAP, Kn, TDZ y Dicamba. De todos estos compuestos, el BA tiene más aplicaciones en cultivo *in vitro*, especialmente en la proliferación y organogénesis de meristemas existentes (Suárez et al., 2013; Torres et al., 2013; Polo et al., 2013; López, 2017). Por otra parte, Dicamba en un estudio (Ren *et al.*, 2010), demostró que a una concentración de 4 mg/l ser el más eficaz para inducir callo embriogénico y una mayor proporción de plantas regeneradas.

Giberelinas: Promueven el alargamiento del tallo de las plantas al inducir la división y el alargamiento celular. La síntesis en toda la planta ocurre principalmente en las hojas jóvenes.

Aunque existen más de 90 compuestos similares, la giberelina más utilizada en cultivo *in vitro* es el AG3, cuya adición al medio de cultivo puede favorecer el alargamiento de los tallos micropropagados y la transformación de embriones somáticos en plantas. Tiene cierto efecto inhibitorio sobre la formación de nuevos tallos y raíces y la inducción de tejidos embrionarios, por lo que resulta inconveniente su uso en la proliferación de yemas y aparición de raíces.

La estructura del AG3 cambia con el calentamiento, por lo que es mejor esterilizarlo mediante filtración (Suárez, 2020).

Acido abscísico: Es responsable de controlar la apertura y cierre de los estomas, inhibir el alargamiento y división celular e inducir el reposo de las semillas. Sus sitios de origen son raíces y hojas adultas, de donde se desplaza hasta su sitio de acción (Suárez, 2020).

En condiciones *in vitro*, inhibe la formación de callos y se utiliza para inducir la maduración de embriones somáticos y la formación de órganos de almacenamiento

y latentes. Es insoluble en agua y por tanto debe diluirse con etanol (Suárez y Otero, 2016; Suárez et al., 2017; Carmona, 2017).

Etileno: Es un gas sintetizado a partir del aminoácido metionina y se produce en la mayoría de los tejidos vegetales. En las plantas, induce la senescencia y abscisión⁵ de hojas y flores, la formación de raíces adventicias y elimina la latencia en semillas y yemas. Su presencia se vuelve inconveniente en condiciones *in vitro*, por lo que en ocasiones se requiere ventilación de los tejidos para evitar su acumulación, además contribuye a la maduración de los frutos (Suárez, 2020).

1.5.4.5. Aminoácidos

Los aminoácidos son nutrientes muy importantes para el crecimiento de las plantas porque además de promover la síntesis de proteínas, también son una buena fuente de nitrógeno (MembraPure, 2020).

Los aminoácidos comúnmente utilizados son la glicina, la arginina, la L-cisteína y mezclas de aminoácidos como la caseína hidrolizada, cuyas funciones se describen con más detalle en el CAPÍTULO VI.

Glicina: Puede promover el crecimiento de raíces, aumentar el contenido de clorofila, favorece la penetración de CO₂ y aumenta el contenido de sacarosa. Dichas cualidades mejoran la calidad y cantidad de los cultivos (MembraPure, 2020).

L-cisteína: Previene la oxidación de compuestos fenólicos y por consiguiente la oxidación del tejido (MembraPure, 2020).

L- adenina: Mejora la frecuencia de la multiplicación de los brotes (Lifeasible, 2023)

1.5.4.6. Potencial de hidrógeno (pH)

El pH influye en los procesos celulares como el crecimiento celular, metabolismo y potencial de membrana (Scientificbio, 2022). Muchos cultivos de tejidos crecen a un pH de 5.2 a 5.8 con ajustes al tipo de especie (Skirvin *et al.*, 1986).

⁵ Pérdida.

1.6. Técnicas para la regeneración de plantas

Existen diferentes clasificaciones de las técnicas de CTV dependiendo:

1. Objetivo morfológico: los cultivos de tejidos pueden ser organogénicos, embriogénicos, de callos o células en suspensión.
2. Según su estado físico: Cultivos sólidos y cultivos líquidos.
3. Dependiendo el explante que inicie los cultivos: órganos, protoplastos, de yemas preformadas, granos de polen, embriones, meristemas y ápices.

Aun cuando existen diferentes clasificaciones, se puede hacer uso de las distintas técnicas para llegar a un objetivo específico. Es importante recalcar que el objetivo morfológico determinará la forma de obtener una planta, y las características de la especie dará los lineamientos para seleccionar los explantes y si son los cultivos líquidos o sólidos. Esto es, en un mismo proceso se hace utilizar diferentes técnicas.

1.7. Cultivo *in vitro* de cuna de Moisés

Se realizó una búsqueda de reportes o artículos científicos sobre el establecimiento y la regeneración *in vitro* de cuna de Moisés a través de brotes adventicios, callos o embriogénesis somática sin embargo, no se encontró artículo alguno que reportara ni la desinfección, ni el tipo de explante así como la morfogénesis para la obtención de plantas *in vitro*, todos parten de cultivos de brotes pero hace suponer que establecieron los cultivos *in vitro* a partir de la desinfección y establecimiento de brotes obtenidos bajo condiciones de invernadero. En Brasil *Spathiphyllum* se propaga en 5 laboratorios de forma *in vitro* (Rego y Faria, 2001).

En la tabla 2 se presentan una síntesis de los resultados presentados en algunos artículos revisados para este fin.

Tabla. 2. Revisión bibliográfica sobre el establecimiento y la regeneración *in vitro* de cuna de Moisés.

Autor	Explante	Medio de cultivo	Respuesta morfogénica
Ramírez <i>et al.</i> , (2001).	Tallos centrales (rizoma) de plantas jóvenes de <i>Spathiphyllum floribundum</i> .	Sales MS 2 mg/l BA 0.5 mg/L AIA 8 g Agar pH 5.8 subcultivos cada 30 días	Brotes

<p>Yu <i>et al.</i>, (2016).</p>	<p>Hojas de las plantas cultivadas <i>in vitro</i> de <i>Spathiphyllum cannifolium</i> cultivadas en el Banco de Germoplasma Floral de Guangdong (Guangzhou, China).</p> <p>Agregados celulares obtenidos de callo embriogénico.</p>	<p>Para las hojas: medio de inducción de callo embriogénico.</p> <p>Sales MS</p> <p>TDZ (0.25, 0.5, 1.0 mg/l)</p> <p>2,4-D (1.0 o 2.0 mg/l)</p> <p>Sacarosa 30 g/l</p> <p>pH 5.8</p> <p>Para los agregados celulares:</p> <p>25 ml medio MS</p> <p>1 mg/l 2,4-D</p> <p>0.5 mg/l TDZ</p> <p>Sacarosa 30 g/l</p> <p>pH 5.8</p>	<p>Callo embriogénico</p>
----------------------------------	--	--	---------------------------

<p>Bandyopadhyay <i>et al.</i>, (2011).</p>	<p>Nodos de plantas maduras de <i>Spathiphyllum floribundum</i> bajo condiciones invernadero.</p>	<p>Los explantes se inocularon inicialmente en Medio NB que contiene:</p> <p>1200 mg/l NH₄NO₃</p> <p>1200 mg/l K₂HPO₄</p> <p>480 mg/l MgSO₄*7H₂O</p> <p>1200 mg/l NaCl</p> <p>2400 mg/l extracto de levadura</p> <p>24 g/l Sacarosa</p> <p>7 g/l Agar</p> <p>pH 7.2</p> <p>Primer set de experimentos:</p> <p>50% Sales MS de Nitrato de amonio y nitrato de potasio.</p>	<p>Plantas aclimatizadas de <i>Spathiphyllum floribundum</i></p>
---	---	---	--

		<p>BA (0,2.5,5.0 μM) solo o acompañado con Ácido naftalenacético (ANA) 0.5 μM</p> <p>Segundo set de experimentos:</p> <p>Medio modificado MS+vitaminas+3% sacarosa+0.8% Agar y una de tres citocininas: Kn, BA o 2iP a diferentes concentraciones (0,2.5,5.0,7.5,10.0 μM) para multiplicar los brotes.</p> <p>Tercer set de experimentos:</p> <p>Medio MS modificado con vitaminas y mismas concentraciones de sacarosa y agar, pero suplementado con BA (0,0.5,1.0,2.5 μM) solo o acompañado con 1.0 μM ANA para elongar y enraizar.</p>	
--	--	--	--

Watad <i>et al.</i> , (1997).	Explantes de <i>Spathiphyllum</i> "Petite".	Medio MS 3% Sacarosa 0.8% Agar 9.3 μ M Kn pH 5.8	Brotos
Teixeira <i>et al.</i> , (2006).	Ápices terminales con tres hojas derivados de brotes <i>in vitro</i> de <i>Spathiphyllum cv.</i>	Medio MS 0% Sacarosa excepto en un tratamiento: 2% Sacarosa pH 5.7	Plántulas <i>in vitro</i>
Liao <i>et al.</i> , (2006).	Brotos de <i>Spathiphyllum sensation.</i>	Medio MS 30 g/l Sacarosa 7 g/l Agar 0.5-1.0 mg/l BA	Brotos con raíz

		<p>0.1 mg/l ANA</p> <p>Subcultivos cada 30 días</p> <p>Para brotes con más de dos hojas:</p> <p>50% Sales MS</p> <p>7 g/l Agar</p> <p>0.1 mg/l ANA</p> <p>15 g/l, 30 g/l o 0 g/l sacarosa como medio de enraizamiento</p>	
García <i>et al.</i> , (2015).	Plantas madre de <i>Spathiphyllum wallisii</i> Regel cultivadas en casas de cultivo libres de plagas y enfermedades. Parte basal de aproximadamente 7 cm que contenía el meristemo apical.	<p>Sales y vitaminas MS</p> <p>0.05 mg/l AIA</p> <p>30 g/l Sacarosa</p> <p>(2.0, 4.0, 6.0 mg/l) BA</p>	Brotes

CAPÍTULO II: JUSTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La falta de sistemas eficientes de propagación de las plantas de ornato, disponibilidad de terrenos abocados a la agricultura, y la disponibilidad de plantas libres de patógenos, son algunos factores que limitan el aprovechamiento racional de especie de ornato, haciéndonos cada vez más dependientes de la importación de plántulas para los viveristas en varios estados de nuestro país.

Por otro lado, se ha demostrado el efecto positivo que tiene el contar con espacios verdes en el estado emocional de los humanos. Existen estudios que demuestran la importancia sobre la salud mental y física de las personas cuando cuentan con espacios verdes o simplemente plantas vivas.

A últimas fechas, durante el confinamiento por la pandemia por el COVID-19, la población comenzó a realizar actividades de jardinería o el mantenimiento de plantas de interior y con ello comenzó a valorar más el papel que ocupan las plantas y flores en su vida. Así mismo, la Investigadora Paula Leva (del Instituto de Floricultura del INTA) mencionó que “Varios trabajos realizados en centros médicos del mundo demuestran que cuando las personas enfermas están en contacto con la naturaleza su recuperación es mejor. Y agregó: “la pandemia ha puesto en clara evidencia la importancia que tienen las plantas”. Aunque se tuvo dos meses completamente paralizada la producción de plantas de ornato, en la temporada del otoño e invierno la venta de plantas al final del 2020 fue positiva, ya que, en comparación con otros años en el mismo periodo, la venta de plantas fue récord, tanto a nivel mundial como el local (Agrolink, 2021).

En México, actualmente un millón 200 mil personas se dedican al cultivo y comercialización de la floricultura y plantas ornamentales, pero se ha mostrado que el potencial que tiene el país es dos veces mayor en este rubro ya que se cuenta con el clima propicio para el cultivo de flores y plantas de ornato, así como la cercanía

geográfica con uno de los países más consumidores de estas especies, Estados Unidos (Voz de las Empresas, 2021).

Se tiene registro que la producción de flores y plantas de ornato es de más de 21 mil hectáreas principalmente en los estados: Baja California, Chiapas, Ciudad de México, Colima, Estado de México, Guerrero, Morelos, Puebla y Veracruz, entidades que concentran más del 90% de la superficie dedicada a esta área de la agricultura a nivel nacional y con un valor de producción de seis mil 337 millones de pesos. El 75 % de su producción se realiza a cielo abierto sobre todo para la gladiola, clavel y girasol; el 25% en invernaderos y viveros para rosa, gerbera y plantas de maceta (*Philodendro*, Cuna de Moisés, helechos, orquídeas, etc). El 80% de la producción nacional se ocupa para el mercado interno y el 20% para exportación principalmente Estados Unidos y Canadá (Voz de las Empresas, 2021).

SADER (Secretaría de Agricultura y desarrollo rural) indica que México ocupa el décimo séptimo lugar como exportador a Estados Unidos y Canadá. Las flores de mayor demanda de exportación son la gladiola, rosa, liliium clavel, esqueje sin raíz, plantas de maceta y follaje (Equipartes agrícolas, 2019).

A pesar de que México ocupa el tercer lugar a nivel mundial en superficie destinada al cultivo florícola, sólo el 10% de la producción se utiliza para la exportación. Además, este sector presenta varios problemas durante la producción tales como:

1. La disponibilidad de material vegetal, lo que ha hecho a los productores dependientes de material proveniente principalmente de Holanda a un costo elevado.
2. Sistemas eficientes para la producción de material vegetal.
3. Material vegetal libre de patógenos. Cuando el productor quiere propagar sus propios materiales, éstos pueden transmitir los hongos, bacterias y virus a las siguientes generaciones.

4. Material vegetal homogéneo y de calidad, lo cual aseguraría la calidad de exportación y aumentará con ello la capacidad de los volúmenes requeridos por los principales importadores (Estados Unidos y Canadá y a últimas fechas la Unión Europea).

5. Disponibilidad de terrenos para la construcción de viveros e invernaderos para la producción de plantas de flor y de ornato.

6. Apoyos financieros en la producción. En México estaba considerado FIRA (Fideicomisos Instituidos en Relación con la Agricultura) como una institución de financiamiento, que no sólo proporcionaba fideicomisos, sino que vendía plantas a costos competitivos, sin embargo, a últimas fechas esta institución ya no produce plantas de flor y de ornato, sino que ahora produce árboles maderables, dejando a los productores con un gran desabasto de este tipo de plantas.

Por todo esto es prioritaria la búsqueda de soluciones con el interés de proveer material vegetal a costos competitivos y de mayor calidad (genéticamente homogéneos, libre de patógenos y en cantidades suficientes) y en cualquier temporada del año para los productores. Una alternativa que puede solucionar la disponibilidad de material vegetal es el Cultivo de Tejidos, una rama de la Biotecnología Vegetal, que poco se ha desarrollado en el país y que tiene grandes campos de aplicación.

El uso del cultivo de tejidos vegetales como técnicas biotecnológicas permite la propagación masiva e intensiva (micropropagación) de plantas libres de patógenos, homogéneas genéticamente y de alta calidad, esto puede representar una alternativa indispensable para los productores de diferentes especies vegetales. Las herramientas de micropropagación pueden disminuir el tiempo de generación de nuevas plantas, libres de enfermedades o plagas en espacios reducidos y a una tasa de multiplicación mayor que los sistemas de reproducción convencionales.

El contar con un laboratorio que permitirá una producción a gran escala y en espacios reducidos de especies vegetales de importancia comercial nacional e

internacional, resultaría un gran apoyo para el productor ya que podrá contar con una fuente de planta de alta calidad durante todo el año.

La producción a gran escala, en laboratorios comerciales, ya se hace a base de biorreactores, los cuales permiten bajar costos de producción, no depender tanto de la mano especializada de cortadores, y la obtención de plantas más robustas y el pase a suelo puede ser un tanto más eficiente. Sin embargo, se requiere profesiones como los ingenieros químicos, ingenieros industriales, que puedan entender las necesidades de los sistemas biológicos. Esta tesis es la primera parte de un proyecto a más largo plazo, en donde se cuente con los sistemas de CTV tradicionales y, posteriormente, producir a gran escala en biorreactores.

Como se expone a continuación Cuna de Moisés (*Spathiphyllum sensation*) no es una especie fácil de reproducir bajo condiciones *in vitro*, por ello, la gran importancia que tiene esta parte porque no se ha logrado con un sistema eficiente de producción de brotes adventicios o embriones somáticos.

Muchos sistemas de CTV se probaron y cada uno de ellos se presenta como capítulos.

CAPÍTULO III: HIPÓTESIS, OBJETIVOS Y ESTRATEGIAS

3.1. HIPÓTESIS

Si se elige el explante adecuado de *Spathiphyllum sensation* y se emplea la mejor técnica de CTV bajo las condiciones óptimas de método de desinfección, mezcla de antioxidantes y medio de cultivo, entonces se podrá inducir callo, brotes adventicios y embriones somáticos.

3.2. OBJETIVOS

3.2.1. Objetivo general

Establecer cultivos celulares de (*Spathiphyllum sensation*) probando diferentes explantes y distintos medios de cultivo.

3.2.2 Objetivos particulares

1. Obtener plantas libres de patógenos y sanas bajo condiciones de invernadero.
2. Diseñar un método de desinfección y seleccionar explantes (rizoma, lígulas, láminas foliares, ápice y otros).
3. Determinar la mejor mezcla de antioxidantes para evitar la oxidación de los explantes.
4. Seleccionar el mejor explante en cuanto a su capacidad de desdiferenciación y diferenciación de brotes adventicios.
5. Determinar la(s) mejor técnica de CTV para obtener cultivos de callos, brotes, y/o embriones somáticos.
6. Diseñar diferentes medios de cultivo para inducir a la formación de callo, así como, brotes adventicios y embriones somáticos a partir de distintos explantes.

3.3. ESTRATEGIAS

El presente trabajo se llevó a cabo en el laboratorio de CTV del Departamento de Bioquímica, Facultad de Química de la UNAM.

Para el cumplimiento de los objetivos, las estrategias que se realizaron para lograr la regeneración de *Spathiphyllum sensation* se basaron en elección del material biológico adecuado y en la selección de distintos medios de cultivo, así como antioxidantes, los cuales se utilizaron en las diferentes técnicas de CTV. En la Fig. 7 se muestra la ruta crítica que se implementó junto con las estrategias.

Cabe señalar que se realizó una búsqueda amplia sobre las diferentes técnicas de CTV, la especie, así como los distintos medios de cultivo y antioxidantes. Esta información se presenta en el CAPÍTULO IV, además de la metodología para selección del o los métodos de desinfección, explantes y antioxidantes.

En el CAPÍTULO V se desarrolla la metodología con su revisión de literatura sobre el establecimiento de los Protoplastos.

En el CAPÍTULO VI se presenta la revisión de literatura sobre embriogénesis somática y la metodología para lograr obtener embriones somáticos mediante la inflorescencia, un explante poco explorado en las técnicas de CTV.

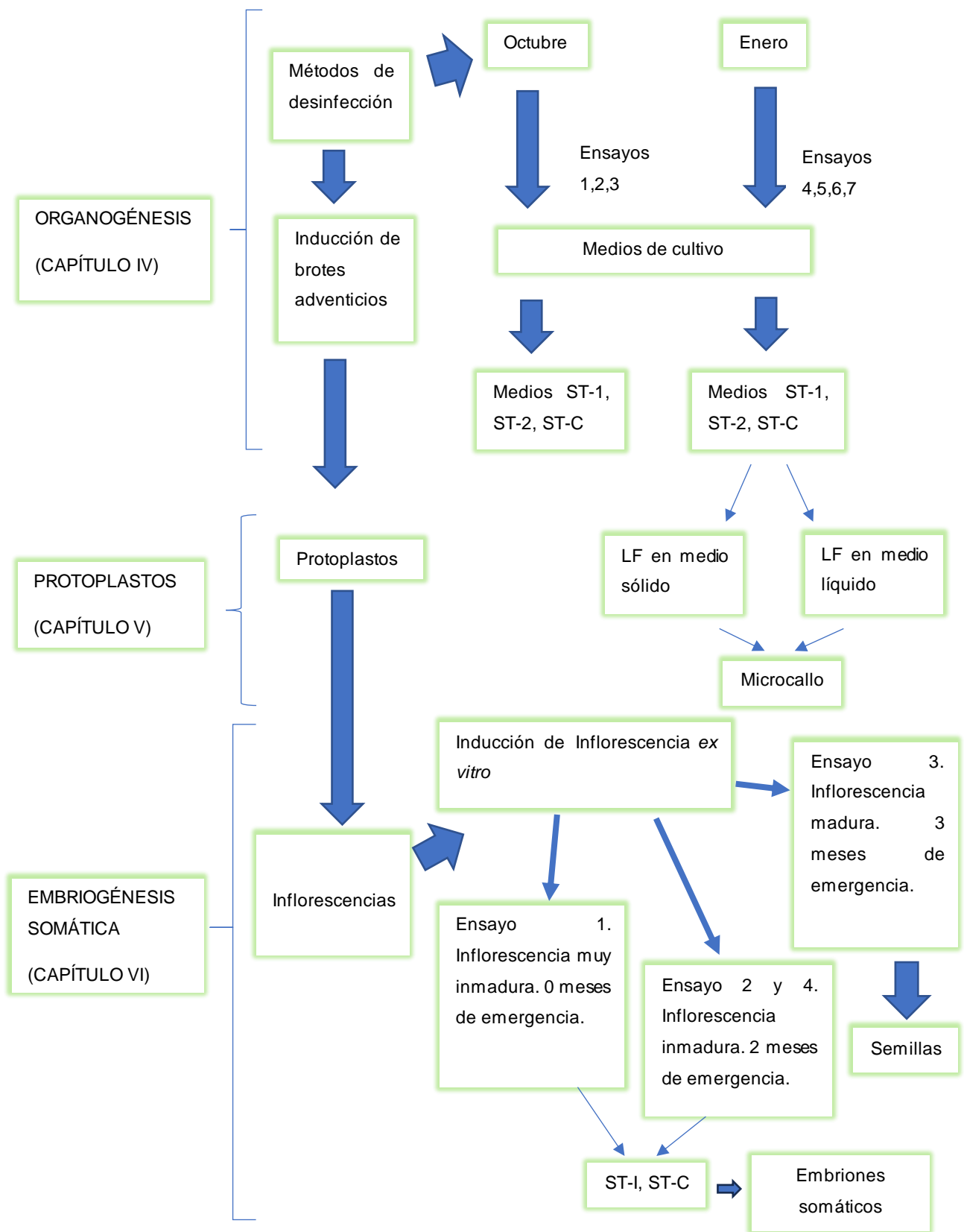


Fig. 7. Diagrama de las metodologías probadas para obtener cultivos de *Spathiphyllum sensation*.

CAPÍTULO IV: ESTABLECIMIENTO DE CULTIVOS ASÉPTICOS DE DISTINTOS EXPLANTES Y DIFERENTES MEDIOS

4.1. MARCO TEORICO

4.1.1. Organogénesis

Es muy frecuente que se obtengan plántulas *in vitro* a partir de brotes formados de yemas, rizoma o alguna parte de la planta con zonas meristemáticas (que tienen potencial e información genética de la planta madre para generar una nueva ya que son las responsables del crecimiento vegetal). Esta vía regenerativa se conoce como organogénesis y puede ocurrir de forma indirecta o directa. En el caso de la vía directa dichas zonas en presencia de una citocinina desarrollarán brotes adventicios (Sherrington y George, 1984; Su, 2002). Para la organogénesis indirecta en el proceso se cuenta con un paso intermedio: formación de callo; una masa amorfa de células indiferenciadas desorganizadas que lograrán su organización con la presencia de: citocinina, auxina débil, aminoácidos y sacarosa. Una vez organizadas las células surgirán brotes que se individualizarán y desarrollarán (Su, 2002).

Este proceso morfogénético cuenta con cuatro etapas: inducción de brotes, proliferación, alargamiento y enraizado de brotes (Dimitri, 1987, citado por Su, 2002). En este capítulo se hablará de los protocolos de desinfección y medios de cultivos probados para la inducción de brotes de *Spathiphyllum sensation*.

4.1.2. Tipos de contaminante en el cultivo *in vitro*

Indiscutiblemente para que tengan éxito las técnicas de cultivo de tejidos, es prioritario tener un protocolo adecuado de desinfección de los explantes. Por ello se debe tomar en cuenta los tipos de microorganismos que contienen las plantas donadoras de explantes. A continuación, se presentan los microorganismos que más pueden desarrollarse en los medios de cultivo.

Bacterias: Es el microorganismo contaminante más común *in vitro*. Las consecuencias más comunes de la contaminación bacteriana de los tejidos vegetales son la muerte total de los explantes, crecimiento desigual, necrosis local, baja tasa de crecimiento de los brotes axilares y bajo potencial de raíces. Normalmente, la contaminación bacteriana se puede detectar por la presencia de manchas acuosas multicolores en los tejidos de las plantas, turbidez en medios líquidos y colonias redondas en medios semisólidos (Suarez, 2020).

Hongos: Los hongos son microorganismos que suelen actuar como contaminantes externos de los explantes, pero algunos están asociados al sistema vascular (Suárez, 2020). La contaminación se caracteriza por un crecimiento micelial que cubre rápidamente los explantes, provocando una rápida muerte del tejido, pero la presencia de levaduras puede confundirse con una contaminación bacteriana (Carlisle et al., 2001, citado en Suarez, 2020).

Otros: Algunas partículas infecciosas como son los virus (Khanacademy, 2024), cuando llegan a un hospedero pueden ser enfermedades difíciles de detectar y, resultan más comunes en bulbos, raíces o zonas foliares. Para su detección es necesario hacer pruebas de ELISA, sin embargo, resultan costosas y se recomiendan más en tubérculos de consumo humano como la papa. En el caso de plantas ornamentales no es un problema si se realizan los cultivos con zonas en crecimiento (meristemáticas) o alejadas del suelo.

Los micoplasmas (bacterias sin pared celular), también son agentes que pueden infectar, pero su presencia es escasa en las plantas *in vitro*. Son bacterias que pueden eliminarse con antibióticos.

4.1.3. Fuentes de contaminación

El establecimiento de cultivos asépticos no es un trabajo fácil de conseguir, no sólo es asegurar la asepsia de los medios de cultivos y los distintos explantes, sino que

pueden presentarse otros factores. Los más frecuentes son el material vegetal, el aire y el operario.

Material vegetal: Muchos microorganismos e insectos se encuentran en la superficie de las plantas sin afectar su crecimiento y desarrollo, e incluso en algunos casos favoreciendo el desempeño vegetal. Sin embargo, una vez que entran en contacto con las condiciones *in vitro*, se convierten en patógenos para células, órganos o tejidos cultivados *in vitro* (Suarez, 2020).

Aire: El aire en condiciones normales mantiene suspendidas partículas de polvo, esporas de hongos, bacterias, ácaros y otros agentes. Por ello, es necesario contar con un mecanismo que proporcione una buena calidad del aire para disminuir los riesgos por contaminación (Suárez, 2020). Para garantizar la asepsia, es necesario realizar los subcultivos en una campana de flujo laminar que contenga papel filtro de $0.22 \mu\text{m}$, así mismo se le debe dar mantenimiento y verificar que no haya rupturas en los filtros y una buena presión del aire.

Trabajador u operario: Dentro de las fallas más comunes se encuentran la utilización de utensilios contaminados, ya sea por falta de tiempo en la esterilización o por mal manejo del operario (Suárez, 2020). En el laboratorio 116 de CTV los tiempos de esterilización térmica son los siguientes: 18 minutos para medio de cultivo y agroquímicos (Captán 50 y Agri-mycin® 500), 30 minutos para material de cristalería y 40 minutos para agua deionizada.

Frecuentemente, el hablar dentro de la campana durante la realización de subcultivos es una fuente de contaminación, por ello se debe evitar hacerlo. Otra práctica común es introducir material sin que esté debidamente esterilizado y mantenerlo dentro de campana, así como colocación de herramientas y tejidos dentro del área de trabajo, sin sacarlos cuando se abran los frascos con medio de cultivo, esto puede ser un factor importante en la contaminación de los cultivos. Indiscutiblemente que, contar con pinzas y bisturí estériles es un requisito que no puede pasar, por ello se deben calentar el tiempo suficiente las pinzas y bisturíes

para el manejo de las muestras y el subcultivo de tejidos contaminados (Suárez, 2020).

4.1.4. Oxidación

Spathiphyllum sensation es una especie muy propensa a la oxidación, por ello se hizo una revisión bibliográfica acerca de la oxidación y antioxidantes que ayudaran a combatir la oxidación.

4.1.4.1. Definición

La oxidación es un problema común en el CTV que provoca una reducción del crecimiento (Uchendu *et al*, 2011; Laukkanen *et al.*, 2000; Jones y Saxena, 2013), menores tasas de regeneración o recalcitrancia (Beckman, 2000; Tabiyeh *et al.*, 2006; Jones y Saxena, 2013) y, en última instancia, puede conducir a la muerte de la célula/tejido/planta (Aliyu, 2005; Toth *et al.*, 1994; Thomas, 2008; Jones y Saxena, 2013). La intensidad del oscurecimiento varía según las especies, los cultivos y el estado fisiológico de la planta/tejido, pero en muchos casos limita demasiado la capacidad para manipular el crecimiento y el desarrollo de las plantas. La razón por la que ocurre dicho oscurecimiento es la acumulación y posterior oxidación de compuestos fenólicos en los tejidos y en los medios de cultivo, aunque estos compuestos están generalmente presentes en los tejidos sanos de las plantas y pueden acumularse en tipos de células especializadas (Beckman, 2000), se producen en mayor abundancia y/o se liberan como respuesta de defensa, especialmente tras la herida o el estrés del tejido (Beckman, 2000; Dixon y Paiva, 1995; Jones y Saxena, 2013). La mayoría de los protocolos de CTV implican herir el material para extraer los explantes y cultivarlos en entornos bastante estresantes, lo que a menudo provoca la producción y liberación de compuestos fenólicos. Como resultado, esta respuesta de defensa natural puede conducir a la acumulación de compuestos tóxicos que, en última instancia, dañan o matan las células y los tejidos vegetales.

4.1.4.2. Compuestos que inhiben la oxidación

4.1.4.2.1. Adsorbentes

Los adsorbentes pueden retrasar el proceso de oxidación del explante. Algunos adsorbentes usados son el CA y el PVP, usados en concentración (0.1-0.3%) (Smith, 2013).

El CA puede estimular la morfogénesis mediante la absorción de compuestos inhibidores y la disminución de metabolitos tóxicos, exudación y acumulación de fenoles. También adsorbe vitaminas y reguladores del crecimiento vegetal del medio, y puede liberarlos gradualmente al explante (Thomas, 2008). Mientras que el PVP (Fig. 8) puede retener metabolitos secundarios nocivos como los fenoles (PhytoTech Labs, 2022).

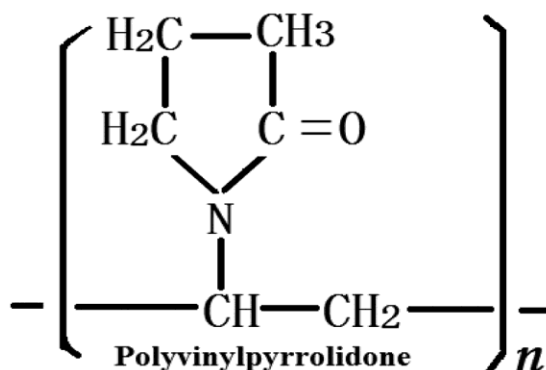


Fig. 8. Fórmula química del PVP (Tomado de Ingole y Kumbharkhane, 2020).

4.1.4.2.2. Nitrato de plata

El AgNO₃ inhibe la acción del etileno (Fig. 9). El ion plata es capaz de bloquear específicamente la acción del etileno exógenamente en respuestas clásicas como la abscisión, la senescencia y el retraso del crecimiento. Además, es un compuesto muy viable debido a su solubilidad en agua y falta de fitotoxicidad a concentraciones efectivas (Kumar *et al.*, 2009).

La preparación del nitrato de plata se puede consultar en el anexo 5.

El mecanismo de acción del AgNO_3 aún no está claro, sin embargo, se cree que los iones de plata perturban los sitios de unión del etileno (Rodríguez *et al.*, 1999). En la Fig. 9 se muestra cómo el etileno está envuelto en varios aspectos del ciclo de la planta, ya sea afectando (inhibición de algunos factores fisiológicos) o promoviendo (abscisión foliar, maduración y senescencia). A su vez se muestra cómo los iones de plata inhiben la acción del etileno.

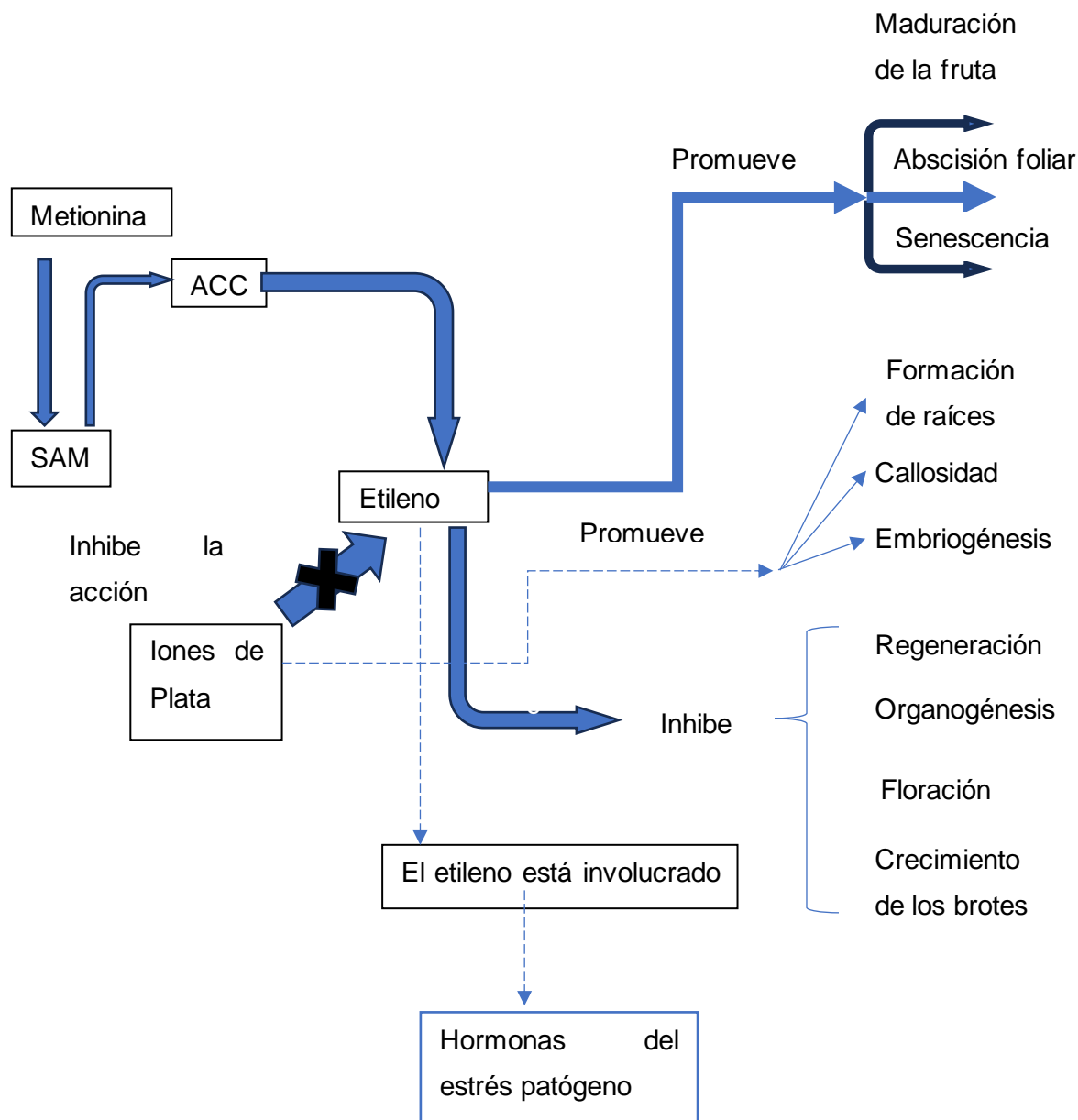


Fig. 9. La biosíntesis del etileno y su influencia en diversos procesos (Tomado de Kumar *et al.*, 2009) y modificado y traducido por (Vieyra, 2023).

4.1.5. Métodos de desinfección

En el protocolo de desinfección se necesitan factores importantes para combatir los hongos y bacterias: una solución de desinfección compuesta por dos microbicidas, (hipoclorito de sodio y microdyn®), un surfactante (Tween®-20), además de antibióticos.

4.1.5.1. Hipoclorito de sodio

El hipoclorito de sodio es un desinfectante comúnmente usado en los protocolos de desinfección, así como en la industria, sobre todo en la alimentaria.

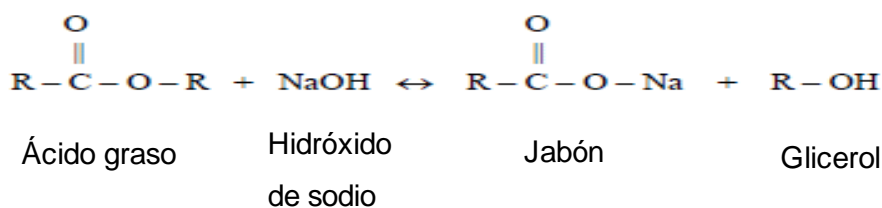
Mecanismo de acción: El hipoclorito de sodio media su acción bactericida reaccionando con ácidos grasos y aminoácidos. Mediante la reacción de saponificación, actúa como disolvente orgánico y de grasas, degradando los ácidos grasos para formar sales de ácidos grasos (jabón) y glicerol (reacción 1) (Estrela *et.al.*, 2002). Esto reduce la tensión superficial de la solución restante. El hipoclorito de sodio puede reaccionar con los aminoácidos para neutralizarlos y formar agua y sal (reacción 2), en esta reacción salen los iones hidroxilo (OH^-) del aminoácido lo cual aumenta el pH hasta 12.5, este pH altera la integridad de la membrana citoplasmática mediante daños químicos a compuestos orgánicos y transporte de nutrientes o por medio de la descomposición de fosfolípidos o ácidos grasos insaturados de la membrana citoplasmática. Los ácidos hipoclorosos (HOCl^-) presentes en las soluciones de hipoclorito de sodio pueden actuar como disolventes en contacto con el tejido orgánico para liberar cloro, que forma cloraminas al combinarse con el grupo amino (NH_2^-) (reacción 3) de las proteínas que alteran el metabolismo celular (Estrela *et.al.*, 2002). El cloro en la solución es un fuerte oxidante que inhibe las enzimas bacterianas esenciales (L-cisteína) provocando una oxidación irreversible de los grupos SH (grupo sulfhidrilo) (Estrela *et.al.*, 2002). Finalmente, el ácido hipocloroso y los iones hipoclorito (OCl^-) degradan e hidrolizan algunos aminoácidos como la glutamina y la L-asparagina (Waters, 2024), así mismo péptidos. Cabe mencionar que, debido a que el hipoclorito de sodio es una base fuerte ($\text{pH}>11$) que actuando en conjunto con la liberación de los iones hidroxilo se asocia a efectos biológicos nocivos en las células bacterianas, ya que

interfiere en la integridad de la membrana citoplasmática que es donde tienen lugar funciones esenciales como el metabolismo, la división celular y el crecimiento. Con esta interferencia se da una inhibición enzimática irreversible y alteraciones biosintéticas en el metabolismo celular. Otro factor a considerar del hipoclorito de sodio es su concentración ya que de ello depende la eficiencia de la desinfección (Fukuzaki, 2006) en donde se ha demostrado que a concentraciones más altas es más agresivo, mientras que en concentraciones más bajas (0.5% a 1%), es biocompatible (Estrela *et.al.*, 2002).

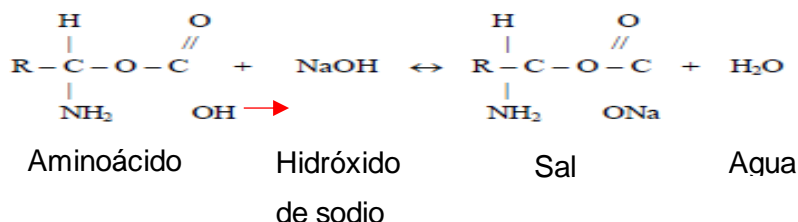
En resumen, el hipoclorito de sodio presenta actividad bactericida porque actúa sobre sitios enzimáticos esenciales bacterianos promoviendo la inactivación irreversible originada por los iones hidroxilo y la acción de cloraminación.

En la Fig. 10 se presentan las reacciones del mecanismo de reacción del hipoclorito de sodio.

Reacción 1. Reacción de saponificación



Reacción 2. Reacción de neutralización de aminoácidos



Reacción 3. Reacción de cloraminación

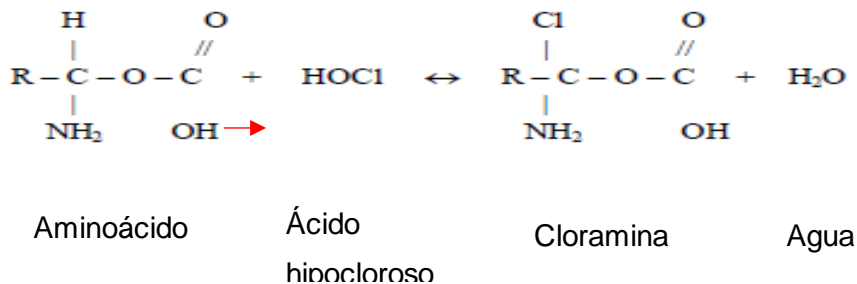


Fig. 10. Mecanismo de reacción del Hipoclorito de sodio (Tomado de Estrela *et al.*, 2002) y traducido por (Vieyra, 2023).

4.1.5.2. Tween®-20

Es un agente tensoactivo normalmente usado junto con el desinfectante en los protocolos de desinfección, la concentración normalmente utilizada es (0.01-0.1%) (Sharry *et al.*, 2015; Ramírez, 2001; Salgado, 2007).

Como surfactante, reduce la tensión superficial del agua y permite una mayor dispersión de los productos de limpieza y desinfección, lo que ayuda a que sea más efectivo en la eliminación de microorganismos (TCKlean Lab, 2023).

4.1.5.3. Microdyn®

Es un bactericida usado para agua, alimentos y utensilios. Su composición consta de agua bidestilada, gnetinas de origen animal y plata ionizada. Elimina aproximadamente más de 600 microorganismos entre ellos: la salmonela, el cólera y los estreptococos. No contiene yodo ni cloro (Farmalisto México, 2023).

4.1.5.4. Antibióticos

Los antibióticos usados en los protocolos de desinfección fueron: cefotaxima, vancomicina y amoxicilina, dichos antibióticos pertenecen a dos distintos grupos, que a continuación se explican.

Cefotaxima: Pertenece al subgrupo de las cefalosporinas, más concretamente al grupo de los β -lactámicos que son compuestos bactericidas que inhiben las fases finales de la síntesis del peptidoglicano, en la que intervienen activamente las enzimas PBP (proteínas de unión a la penicilina). Los β -lactámicos bloquean estas enzimas porque tienen una estructura similar a la del residuo acil-D-alanin-D-alanina de las cadenas del peptidoglicano, un sustrato natural de las PBP. Las bacterias poseen varias PBP (Calvo y Martínez, 2009).

Amoxicilina: Forma parte del grupo de los β -lactámicos, pero se encuentra en el subgrupo de las penicilinas (Calvo, 2009).

Vancomicina: Pertenece al subgrupo de carbapenems, específicamente al grupo de los glucopéptidos, cuya acción al igual que los β -lactámicos tiene lugar en la etapa de la formación estructural del peptidoglicano, sólo que los glucopéptidos actúan en un paso previo a estos debido a que impiden la transferencia del

disacárido pentapéptido, unido al transportador lipídico de la membrana citoplásmica, al aceptor de la pared celular (Calvo y Martínez, 2009), alterando así dicha membrana.

La preparación de los antibióticos se muestra a detalle en el anexo 3.

4.2. MATERIALES Y MÉTODOS

4.2.1 Material biológico

Para el desarrollo del presente trabajo, se utilizaron plantas de Cuna de Moisés (*Spathiphyllum sensation*) proporcionadas por una viverista, la Ing. Hortensia Cerón, quien trajo en dos periodos plantas, la primera entrega fueron 3 plantas en el mes de octubre de 2022 (Fig. 11) se observan las plantas 2 y 3 porque la 1 ya había sido sembrada. La segunda entrega se llevó a cabo transcurridos 3 meses de la primera y constó de 5 plantas (Fig. 12). Todas las plantas provenían del vivero *fragans* localizado en el estado de Morelos: Av. Benito Juárez s/n Tetecalita. Municipio: Emiliano Zapata. C. P. 62768.



Fig. 11. Plantas recibidas en la primera entrega plantas 2 y 3 (Vieyra, 2022).

4.2.2 Programa fitosanitario y de fertilización

Todas las plantas se mantuvieron bajo condiciones de invernadero y se sometieron a un programa fitosanitario y de fertilización. El programa fitosanitario consistió en riegos con dos agroquímicos, Captán 50 y Agri-mycin® 500, a una concentración de 2 g/l cada semana. En el programa de fertilización, se regaron las plantas con una solución fertilizante que contenía sales del medio MS al 50%, excepto los microelementos quelantes que se incorporaron al 100%. Además, se agregaron vitaminas MS modificadas al 100% y BA a razón de 2 a 3 mg/l como regulador de crecimiento. Posteriormente, se recibieron cinco plantas transcurridos 3 meses de la primera entrega (Fig. 12) nombradas de la siguiente manera: 1A a 5E, siendo sembradas en ese orden excepto la planta 5E, las condiciones se mantuvieron iguales a las de las plantas recibidas en la primera entrega, excepto que en el programa de fertilización se agregó AG₃ a razón de 3 mg/l para estimular la floración. Los riegos se llevaron a cabo tres veces por semana; un día se regó con agroquímicos y fertilización, y los otros días solo se regó con agua corriente.

Transcurridos 5 meses se dejaron de agregar los agroquímicos a la solución de riego y después de 10 meses se añadió Kn (2 mg/l) al programa de fertilización, para estimular la formación de más brotes, se esperaba obtener más brotes de los que se obtuvieron con BA.

Un año después de que se implementó este programa de fertilización ya no se añadieron sales MS a la solución de riego, sólo se agregaron los reguladores de crecimiento, y se adicionó agua de coco al 20 % en sustitución a la Vit-R2.



Fig. 12. Plantas recibidas en segunda entrega plantas 1A a 5E (Vieyra, 2023).

4.2.3. Método de desinfección

Se probaron varios protocolos de desinfección, los cuales se modificaron para cada siembra en función de los resultados obtenidos en el ensayo anterior. Los métodos de desinfección constaron de dos partes, la primera parte consistió de un pretratamiento y preparación de las zonas de donde se aislaron los explantes, ésta se llevó a cabo fuera de campana, esto es, sin condiciones asépticas, la segunda parte se llevó a cabo bajo condiciones asépticas en la campana de flujo laminar. En la tabla 3 se muestran los diferentes protocolos de desinfección probados para *Spathiphyllum sensation*, ensayos 1 a 5, en la tabla 4 se muestran los protocolos de desinfección para los ensayos 6 y 7.

Tabla. 3. Diferentes métodos de desinfección probados en el establecimiento de cultivos celulares de Cuna de Moisés (<i>Spathiphyllum sensation</i>).					
Pasos	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3	Ensayo 4	Ensayo 5
Planta / Componentes de los métodos de desinfección	Octubre	Octubre	Octubre	Enero	Enero
Separación de los diferentes explantes <i>ex vitro</i>					
Lavado con jabón y agua corriente de los explantes					
Lavado con Vanish (200 mg/l)		No aplica			
Mantenimiento de los explantes en solución antioxidante con antibióticos ⁶	No aplica				
En campana de flujo laminar (bajo condiciones asépticas)					
Solución de Captán 2 g/l	40 min	30 min	15 min	30 min	

⁶ Los antibióticos utilizados fueron: Cefotaxima (250 mg/l), Enrofloxacin (5 mg/l), adicionalmente se agregó como antimicótico Terbinafina (150 mg/l).

Solución de Agri-mycin® 500 2 g/l	40 min	40 min +L-cisteína 1g/l	No aplica		
Enjuagues 3 a 4 veces durante 1 minuto con H ₂ O deionizada estéril					
Solución de NaClO comercial al 6% de ingrediente activo					
Enjuagues 3 a 4 veces durante 1 minuto con H ₂ O deionizada estéril					
Preparación, disección y limpieza de los explantes ⁷					

⁷ Los explantes se separaron afuera de la campana de flujo laminar, sin embargo, algunos de ellos, después de incubación con antioxidantes, se prepararon para su siembra eliminando las partes oxidadas, si así lo requerían.

			central y pecíolo, ápice	central y ápice	central y ápice
Solución antioxidante y antibióticos ⁸	16 h		22 h	No aplica	
Solución de medio de cultivo líquido ⁹ con antioxidante y antibióticos	No aplica			24 h	
Siembra de explantes					

Tabla. 4. Diferentes métodos de desinfección probados en el establecimiento de cultivos celulares de Cuna de Moisés (*Spathiphyllum sensation*).

Pasos	Ensayo 6	Ensayo 7
Planta/ Componentes de los métodos de desinfección	Enero	Enero
Separación de los diferentes explantes		
Lavado con jabón y agua corriente de los explantes		
Lavado con Vanish (200 mg/l)	No aplica	

⁸ Los antioxidantes utilizados fueron (AA y AC razón de 100 mg/l, 0.25 g de PVP y a partir del ensayo 2 se agregó L-cisteína a una concentración de 1g/l).

⁹ Como medio líquido se utilizó el medio ST-1.

Mantenimiento de los explantes en solución antioxidante con antibióticos		
En campana de flujo laminar (bajo condiciones asépticas)		
Solución de Captán 50 2 g/l	No aplica	30 min
Solución de Agri-mycin® 500 2 g/l	No aplica	
Enjuagues 3 a 4 veces durante 1 minuto con H ₂ O deionizada estéril	No aplica	
Solución de NaClO comercial al 6% de ingrediente activo	15% durante 10 minutos	
Enjuagues 3 a 4 veces durante 1 minuto con H ₂ O deionizada estéril		
Preparación, disección y limpieza de los explantes	Rizoma, lígulas, láminas foliares, nervadura central y ápice	
Solución antioxidante y antibióticos	No aplica	
Solución de medio de cultivo líquido con antioxidante y antibióticos	24 h	
Siembra de explantes		

En la Fig. 13 se presenta el pretratamiento y en la Fig. 14 se presentan los pasos realizados en campana del protocolo de desinfección de explantes de la planta madre.

En la Fig. 13 se muestra el pretratamiento antes de entrar a campana del protocolo de desinfección de *Spathiphyllum sensation*. **A.** Planta en condiciones de invernadero, **B.** Después de sacar la planta de la maceta se retira el exceso de tierra de raíces y hojas con agua corriente, **C.** Corte de las raíces, **D.** En laboratorio después de lavar suavemente con jabón y enjuagar las hojas, tallo y raíces, se quitan las hojas más maduras, **E.** Con ayuda de un bisturí quitar las hojas maduras más cercanas al rizoma desde donde comience cambio de coloración, quedarse con la hoja/hojas más jóvenes, **F.** Quitar cuidadosamente con bisturí las raíces, **G.** Cortar las lígulas de las hojas más jóvenes y adicionar antioxidantes, **H.** Cortar las láminas foliares en segmentos y agregar antioxidantes, **I.** Rizoma en antioxidante (ver anexo 5 para preparación), **J.** Rizoma seccionado en parte basal y apical.

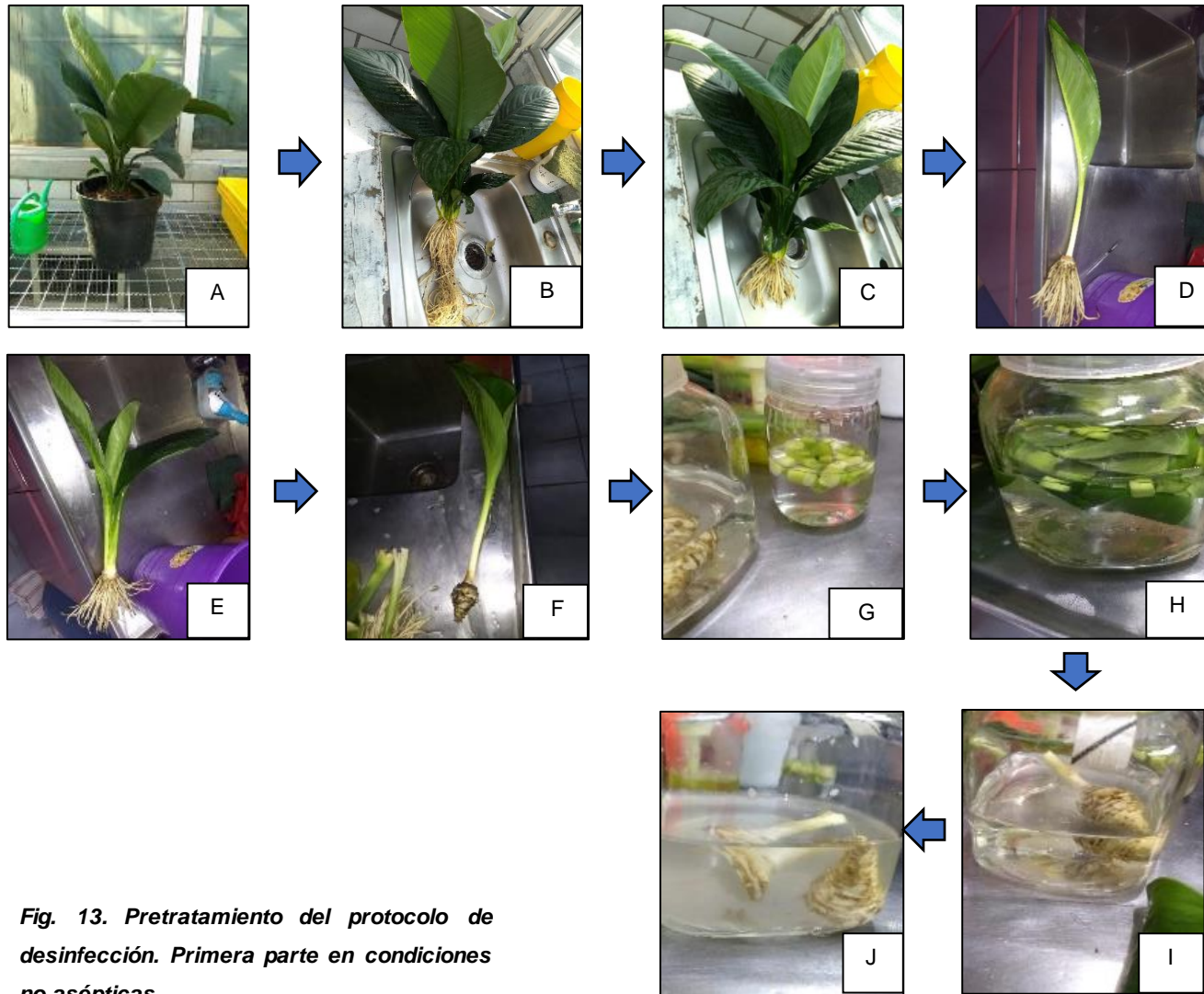


Fig. 13. Pretratamiento del protocolo de desinfección. Primera parte en condiciones no asépticas

En la Fig. 14 se muestra la continuación del protocolo de desinfección de *Spathiphyllum sensation* mostrando los pasos realizados en campana. **K.** Rizoma, láminas foliares, lígulas y nervadura central en solución de Captán, **L.** Rizoma, láminas foliares, lígulas y nervadura central después de decantar el Captán, **M.** Cloro, microdyn® y Tween®-20 necesarios para preparar la solución de NaClO al 15% v/v, **N.** Rizoma, láminas foliares, lígulas y nervadura central en la solución de NaClO, **Ñ.** Rizoma apical en solución con antioxidantes más antibióticos que posteriormente se sembrará, **O.** Rizoma basal, láminas foliares, lígulas y nervadura central después del enjuague en la solución de NaClO al 15% v/v, **P.** Nervadura central en antioxidantes más antibióticos preparada para estar en agitación durante 24 h en la oscuridad, **Q.** Láminas foliares en antioxidantes más antibióticos preparadas para estar en agitación durante 24 h en la oscuridad, **R.** Rizoma basal a punto de ser seccionado para siembra.

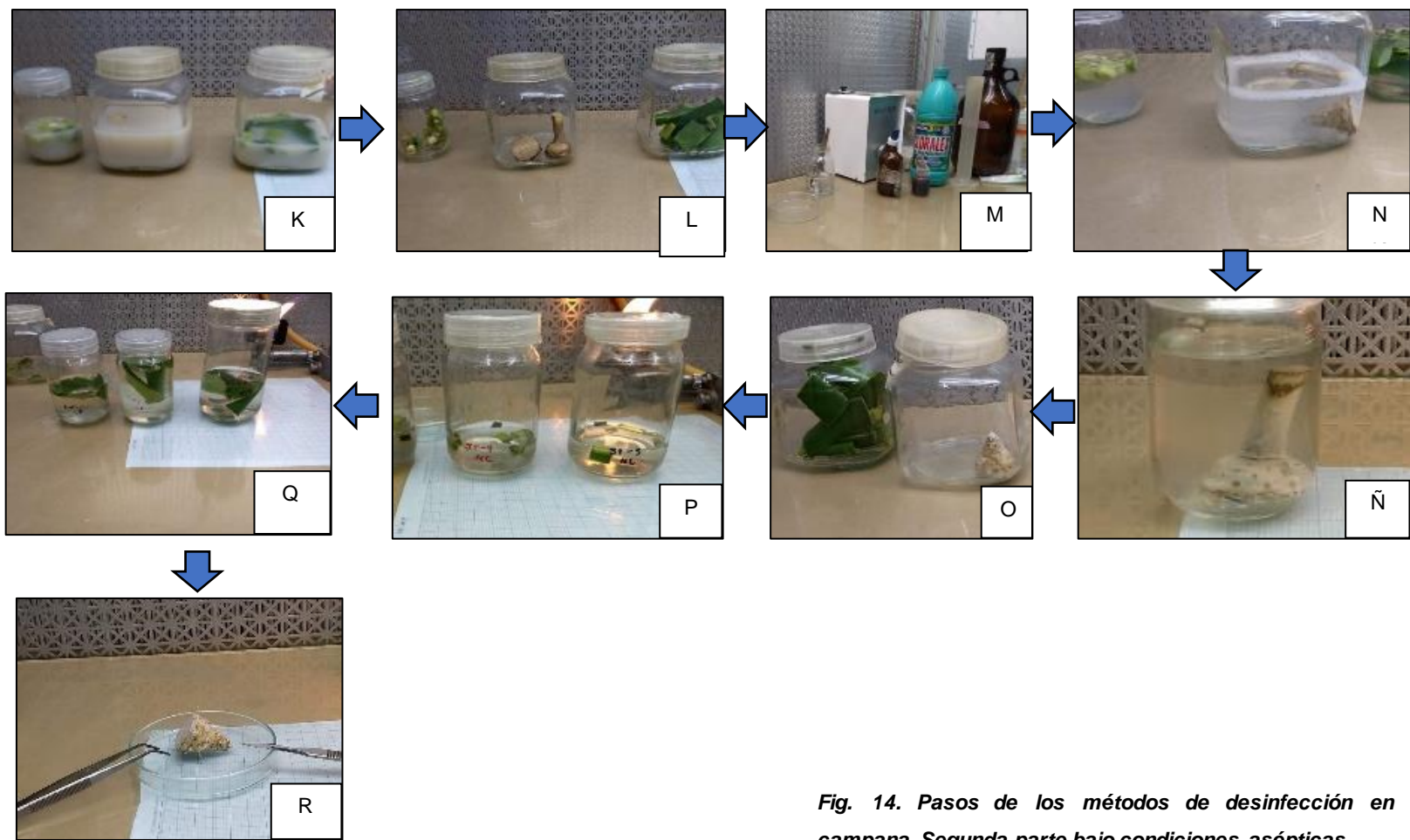


Fig. 14. Pasos de los métodos de desinfección en campana. Segunda parte bajo condiciones asépticas

4.2.4. Medio de cultivo

Se realizaron distintos medios de cultivo de inducción para observar cual era el adecuado para la planta, haciendo variaciones de éstos, basándose principalmente en los diferentes antioxidantes y sus combinaciones y concentraciones que podía servir para disminuir la oxidación de los explantes. De manera general se diseñaron diferentes medios basados en: sales inorgánicas, antioxidantes (para el control de la oxidación) y, diferentes reguladores de crecimiento (para inducir callo o brote).

Se probaron los medios: MS (ST-1 y ST-2) para inducir brotes adventicios y B5 (ST-C) para la inducción de callo embriogénico (Tabla 5). Todos los medios de cultivo se prepararon a partir de soluciones concentradas (Anexo 1) MS (ST-1 y ST-2) y B5 (ST-C). Los medios se suplementaron con 3% de sacarosa, vitaminas modificadas del medio MS al 100% (R2), glicina en una concentración de 2 mg/l, así mismo antioxidantes (AA y AC a razón de 100 mg/l y PVP 0.25 g/l), en el caso de la L-cisteína (1g/l) se adicionó a partir del ensayo 3 y el CA se adicionó a partir del ensayo 5. A todos los medios de cultivo se les ajustó el pH a 5.7 utilizando HCl o NaOH 1 N según fuera necesario. A los medios de cultivo sólidos se les agregó como agente gelificante Gelzan a una concentración de 3.5 g/l. En cuanto a los reguladores de crecimiento y otros compuestos orgánicos probados, en la Tabla 6 se especifican los utilizados en cada ensayo.

Tabla. 5. Medios de cultivo probados en los diferentes ensayos.				
Explante/ Proceso Morfogenético	Medios/Ensayos			
	ST-1	ST-2	ST-C	ST-A
Brote	Ensayo 1-7	Ensayo 1-7		
Callo			Ensayo 2-7	
Ápice				Ensayo 3-7

Tabla. 6. Medios de cultivo probados y sus componentes.				
Componentes de los medios de cultivo	Medios de cultivo (1 litro)			
	ST-1	ST-2	ST-C	ST-A
Sales minerales	MS (100%)		B5	MS
Vitaminas	R2 (100%) ver anexo 2			

Glicina	2 mg
Coctel 22	Ver anexo 2
BA	1 mg
Dicamba	1 mg
ANA	1 mg
AIB	1 mg
AG ₃	1mg
AgNO ₃	2mg
CA	1 g

4.2.5. Experimentos con variación de concentración de L-cisteína

En noviembre de 2022 se observó que los tres medios empleados (ST-1, ST-2 y ST-C) presentaron partículas blancas desde la superficie y en algunos frascos desde la mitad del medio. No se sabía si se trataba de contaminación, precipitación de algún reactivo o reacción entre los antibióticos y antifúngicos que se adicionaron a los medios [Cefotaxima (250 mg/l), Nistatina (50 mg/l), Vancomicina (25 mg/l), Ketoconazol (50 mg/l), Meropenem (20 mg/l)] así que se probaron los siguientes medios con distintas combinaciones de antibióticos y antifúngicos (Tabla 7).

Tabla. 7. Variación de antibióticos y antifúngicos en medio MS.			
No. Experimento	Cantidad medio de cultivo (ml)	Variación	Tipo de experimento
1	100	Cefotaxima, nistatina, vancomicina, ketoconazol, meropenem	Control positivo
2	100	Cefotaxima, nistatina, vancomicina, meropenem	Tratamientos
3	100	Cefotaxima, nistatina, vancomicina, ketoconazol,	
4	100	Cefotaxima, nistatina, ketoconazol, meropenem	
5	100	Sin nada	Control negativo

Todos los medios que se probaron presentaron partículas, de lo cual se descartó que dichas partículas se debieran a la reacción entre antibióticos y antifúngicos, así que sólo quedaban las opciones de que se debiera a contaminación o a precipitación de algún reactivo utilizado en la preparación del medio. La primera opción se descartó dado que se sembró una planta a un medio ST-1 que presentó dichas partículas en la superficie, dos días después se sembró en un medio MS sin antibióticos y antifúngicos para observar si había contaminación, 8 días después se observó que la planta no tenía contaminación, que se esperaba que hubiera ocurrido debido al efecto de contaminación cruzada, el cual no fue el caso.

Así que solo quedaba la opción de que se debiera a la precipitación de algún reactivo, para lo cual se probaron las diferentes concentraciones de L- cisteína (Tabla 8).

Tabla. 8. Variación de la concentración de L-cisteína en medio ST-1.	
Cantidad medio de cultivo (ml)	Concentración de L-cisteína (g/L)
100	1
100	2
100	3
100	4
100	0

De estos experimentos se observó que los medios con concentraciones de L- cisteína de 2g/l, 3g/l y 4g/l presentaron precipitación, por lo cual se decidió usar la concentración de 1g/l de L-cisteína para la preparación de los medios de cultivo ST-

1, ST-2, ST-C, ST-I. Finalmente, los medios probados se presentan en la tabla 1 del anexo 1.

4.2.6. Secciones del Rizoma

El primer explante que se eligió para los ensayos fue el rizoma, que se dividió en tres partes iguales para identificar en los explantes sembrados y así poder observar su tipo de respuesta. Estos tipos de explantes se desinfectaron según el ensayo 4, presentado en la Tabla 3. Los explantes se tomaron de cada zona del rizoma y dichas partes se muestran en la Fig. 15.

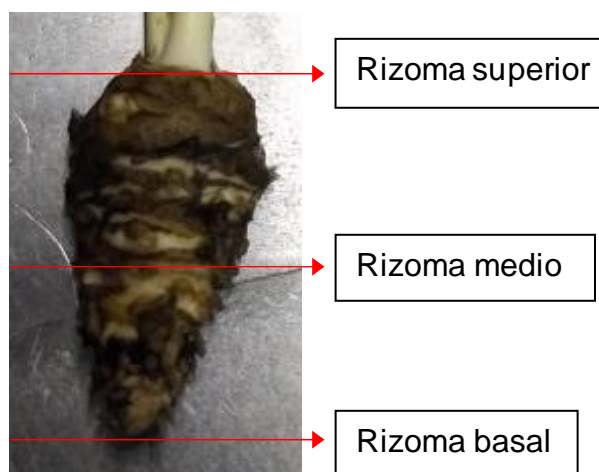


Fig. 15. Partes del rizoma usadas en los ensayos.

4.2.7. Protocolo de desinfección de brotes planta 5E

Los brotes también fueron un explante seleccionado, el protocolo de desinfección de los brotes es el siguiente, y es diferente a los antes presentados en las tablas 3 y 4:

1. Se lavaron con jabón y agua deionizada corriente.
2. Se colocaron los brotes en una solución antioxidante con 150 mg de AA y AC.
3. Posteriormente se realizó un enjuague con una solución de alcohol al 60%.
4. Se enjuagaron con agua deionizada estéril dos veces.
5. Los brotes se sumergieron en una solución de NaClO al 7% v/v más 1 gota/l de Tween®-20 y 15 gotas/l de microdyn® y se dejan durante 12 a 15 minutos.

6. Se realizaron tres veces enjuagues con agua deionizada estéril.
7. Posteriormente, los explantes se enjuagaron con Captán (2g/l) durante 15 minutos.
8. Se realizaron tres a cuatro enjuagues con agua deionizada estéril
9. Se dejaron en una solución de Agri-mycin® 500 (2g/l) durante 15 minutos.
10. Posteriormente se enjuagó cuatro a cinco veces con agua deionizada estéril.
11. Finalmente se dejaron los brotes en solución antioxidante conteniendo ácido ascórbico y cítrico a razón de 100 g/L de ambos antioxidantes y con antibióticos [Cefotaxima (250 mg/l), Vancomicina (25 mg/l), Amoxicilina (350 mg/l) y el fungicida Terbinafina (150 mg/l)].
12. Se diseccionaron los ápices desde el más grande al más chico, quitando primeramente las hojas nuevas y después cortando el rizoma y el ápice de cada tamaño presentado en la Tabla 9.

4.2.8. Protocolo de desinfección de brote Octubre 2023

Derivado del protocolo de la sección 4.2.7, al presentarse mucha contaminación del brote sembrado en octubre de 2023 (el cual también proviene de la planta 5E) se hicieron modificaciones para tratar de salvarlo, se enlistan a continuación los pasos utilizados para dicho fin:

1. Se enjuagó dos veces con agua deionizada estéril.
2. Se enjuagó en una solución de NaClO al 5% v/v durante 10 minutos. Agregue 1 gota/l Tween®-20, 15 gotas/l microdyn®.
3. Se enjuagó cuatro veces con agua deionizada estéril.
4. Se enjuagó con Terbinafina durante 30 minutos.
5. Se enjuagó cuatro veces con agua deionizada estéril.
6. Se sembró en medio sólido NaP6-4.

4.3 RESULTADOS

4.3.1. Resultados

Después de cada desinfección se sembraron los explantes elegidos: rizoma, ápice, brote, lígula, nervadura central y lámina foliar, en medios de cultivo ST-1, ST-2 y ST-C con una concentración de L-cisteína de 1g/l dicha concentración se fijó de acuerdo con los resultados obtenidos en la sección 4.2.5 de este CAPÍTULO, en la Fig. 16 se puede observar fotos de dicho ensayo.

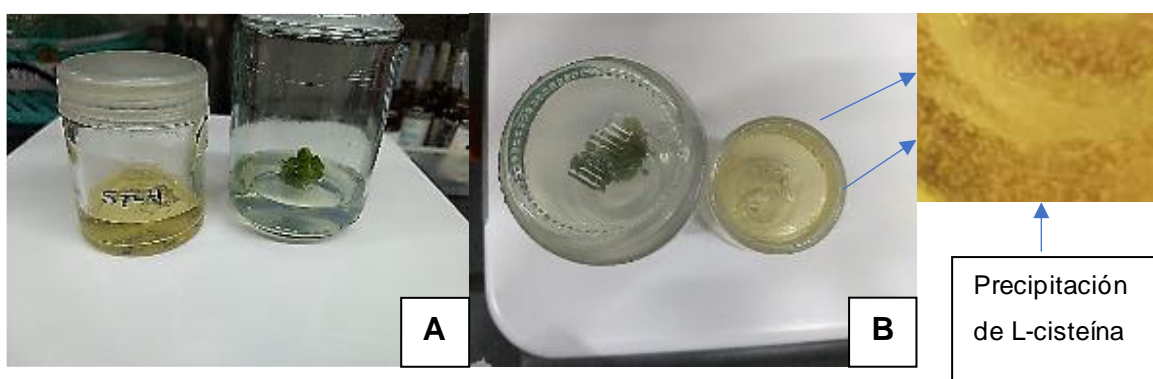


Fig. 16. Comparación medio ST-1 con planta en otro medio. A. Medio ST-1 que se pensaba tenía contaminación, B. Planta que había sido sembrada en el medio ST-1 ahora en un nuevo medio MS.

4.3.1.1. Rizoma

En los explantes de las diferentes zonas del rizoma se observó que el oscurecimiento del tejido se presentó en algunos explantes más que otros; en la Fig. 17 se observa esta respuesta.

En la Fig. 17 se presentan los explantes de rizoma: **A.** Rizoma seccionado en parte basal, media y superior en medios de cultivo líquidos ST-1, ST-2 y ST-C, el rizoma después de ser desinfectado y seccionado se dejaba en agitación en los distintos medios líquidos, aquí los explantes se muestran después de 24 h en agitación (ensayo 4), no se observa oxidación, **B.** Rizoma superior en medio ST-2 después de 3 días después de la siembra, se observa cerca de un 80% de oxidación (ensayo 4), **C.** Rizoma medio aún sin oscurecimiento en medio ST-1 después de 4 días de ser sembrado (ensayo 3), **D.** Rizoma medio con oscurecimiento en medio ST-2

después de 4 días de ser sembrado (ensayo 3), **E.** Comparación entre explante oxidado, no oxidado y el medio de cultivo 14 días después de ser sembrados (ensayo 3), **F.** Explantes oxidados en medios ST-1 y ST-2 14 días después de ser sembrados (ensayo 3), **G.** Vista superior de un explante de rizoma medio oxidado y contaminado 16 días después de ser sembrado (ensayo 3), **H.** Rizoma medio al ser seccionado dentro de la campana de flujo laminar después de 15 días de ser sembrado, en los subcultivos, a los explantes se les quitó la parte superficial oxidada para verificar si el tejido estaba vivo o no. Se observó que el tejido presentó oxidación esto posiblemente a que el tejido ya estaba muerto (ensayo 3), **I.** Rizoma superior antes de ser retirada su parte superficial después de 28 días de ser sembrado, se observó una oxidación superficial del 100% (ensayo 3), **J.** Rizoma superior después de ser retirada su parte superficial después de 28 días de ser sembrado (ensayo 3), se observó que el tejido internamente seguía vivo y sin oxidación, **K.** Rizoma superior en medio ST-1 con CA, este adsorbente se adicionó a partir del ensayo 4, se observó que no hay tejido oxidado.

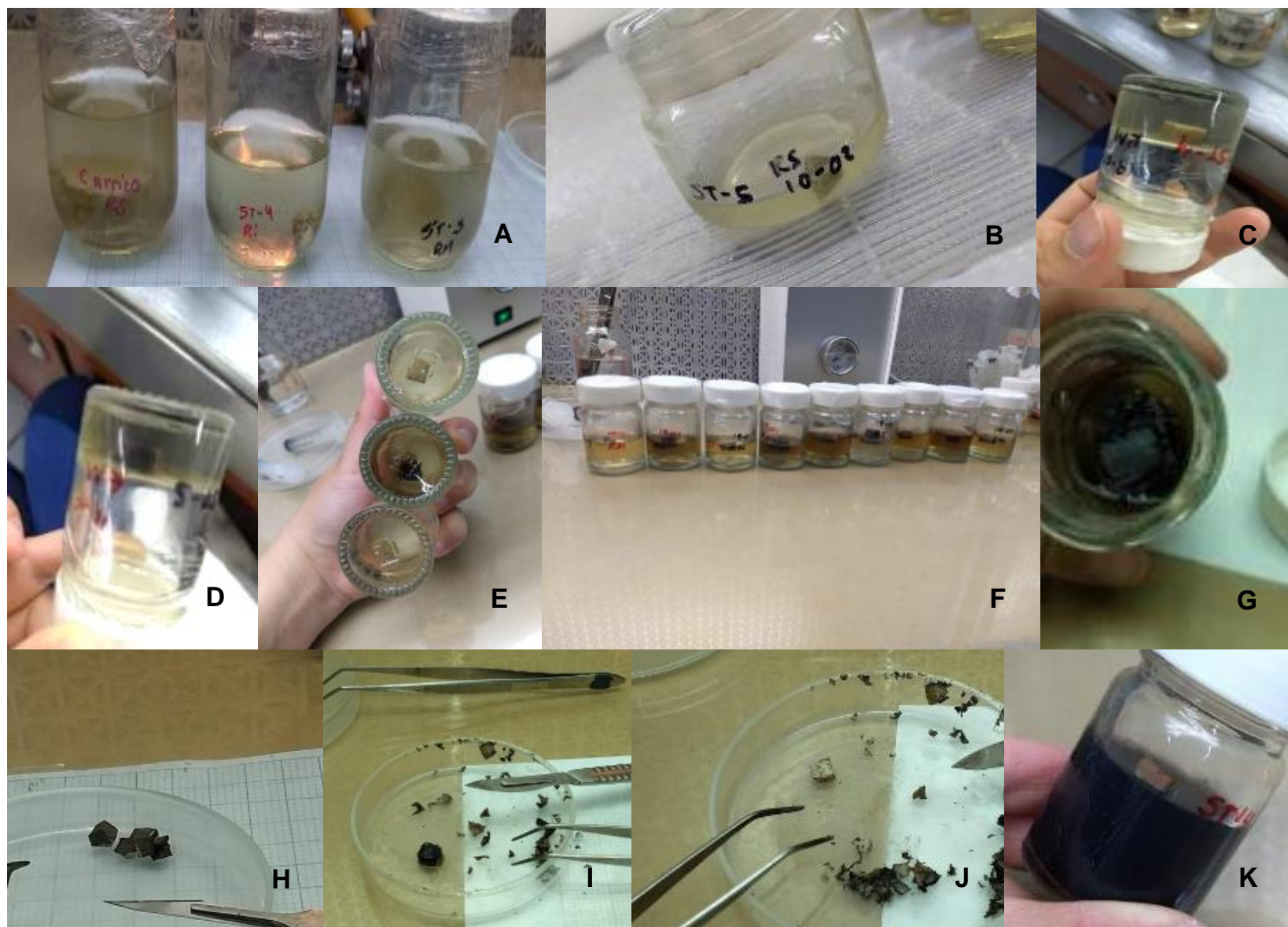


Fig. 17. Explantes de rizoma.

4.3.1.2. Ápice

El segundo explante probado fue el Ápice, en conjunto con la yema y el meristemo.

La Fig. 18. corresponde a los Ápice y meristemas: **A.** Ápice planta 2B (ensayo 5) 17 días después de ser sembrado, no presentó oxidación, **B.** Hojas planta 2B 17 días después de ser sembradas, no se observó oxidación aún después de varios días, **C.** Hojas, foto de microscopio estereoscópico al momento de ser sembradas, no se observó oxidación, **D.** Yema del rizoma planta 2B 17 días después de ser sembrada, no se observó oxidación aún después de varios días, **E-G.** Yema del rizoma, foto de microscopio estereoscópico al momento de ser sembrada, no se observó oxidación, **H.** Yema de hoja o raíz planta 2B 17 días después de ser sembrada, no se observó oxidación aún después de varios días, **I.** Yema de hoja o raíz, foto de microscopio estereoscópico al momento de ser sembrada, no se observó oxidación, **J.** Yema de hoja o raíz planta 2B 17 días después de ser sembrada, no se observó oxidación aún después de varios días, **K.** Yema de hoja o raíz planta 2B al momento de ser sembrada, **L.** Yema planta 2B 17 días después de ser sembrada, no se observó oxidación aún después de varios días, **M.** Yema planta 2B al momento de ser sembradas, **N.** Meristemo planta 2B al momento de ser sembrado se observó oxidación.

A partir del ensayo 4, los meristemas se sembraron en los medios de cultivo antes mencionados y fueron suplementados con CA como se muestra en la Fig.18.

Estos ápices y sus correspondientes meristemas se oxidaron fácilmente, por lo cual no dieron respuesta, se considera que es debido al tamaño tan pequeño de los explantes.

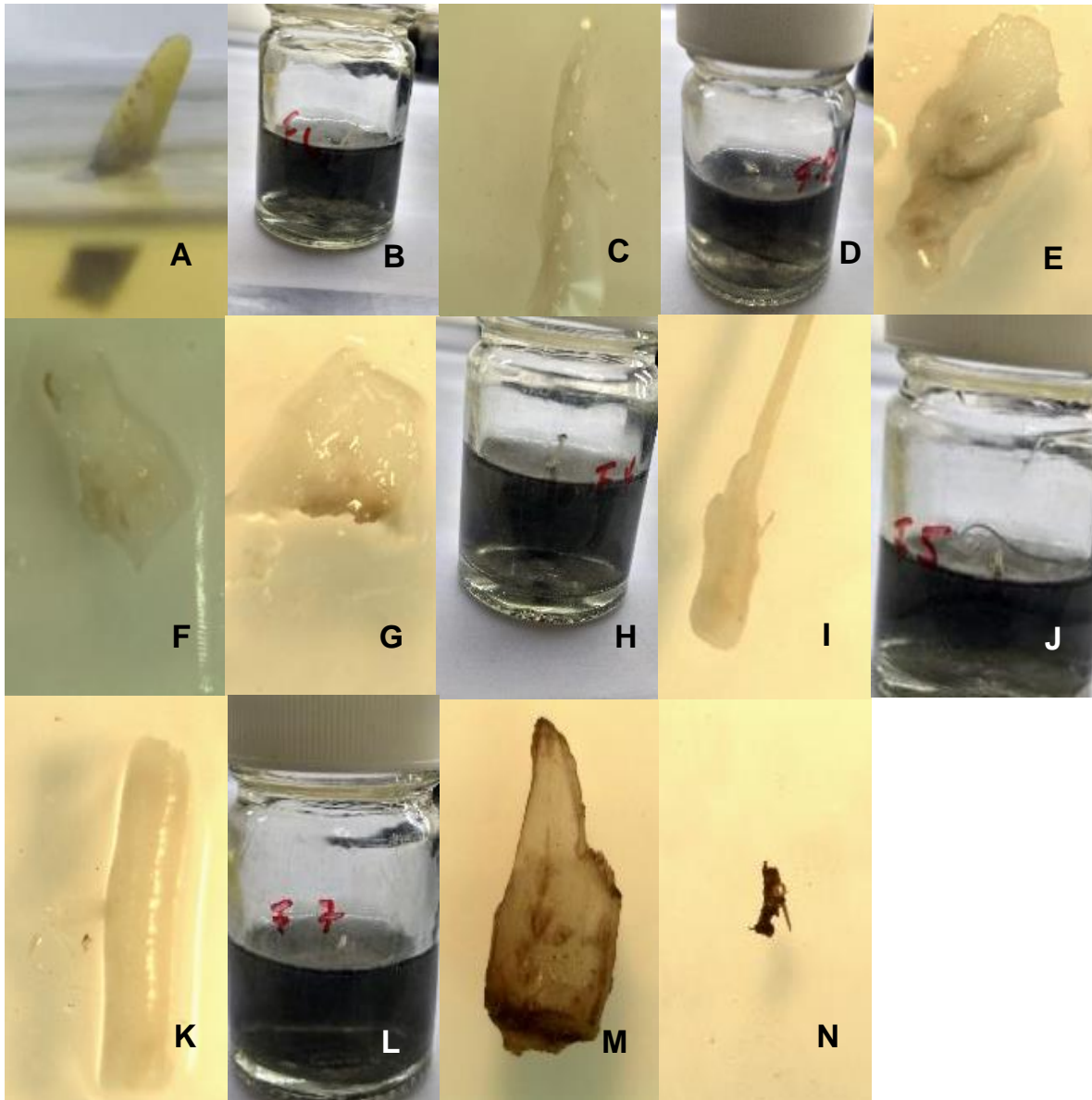


Fig. 18. Ápice y meristemas.

Con los resultados obtenidos de la primera siembra, se sembraron una vez más tres brotes y ápices de la planta 5E. Cabe mencionar que estos tres brotes adventicios fueron el resultado del programa de fertilización al que se sometieron las plantas. La Fig.19 muestra los tamaños de los brotes.

Fig. 19. Brotes planta 5E: **A.** Brote grande planta 5E, **B.** Brote mediano planta 5E, **C.** Brote chico planta 5E.

Las medidas de los brotes se muestran en la tabla 9.

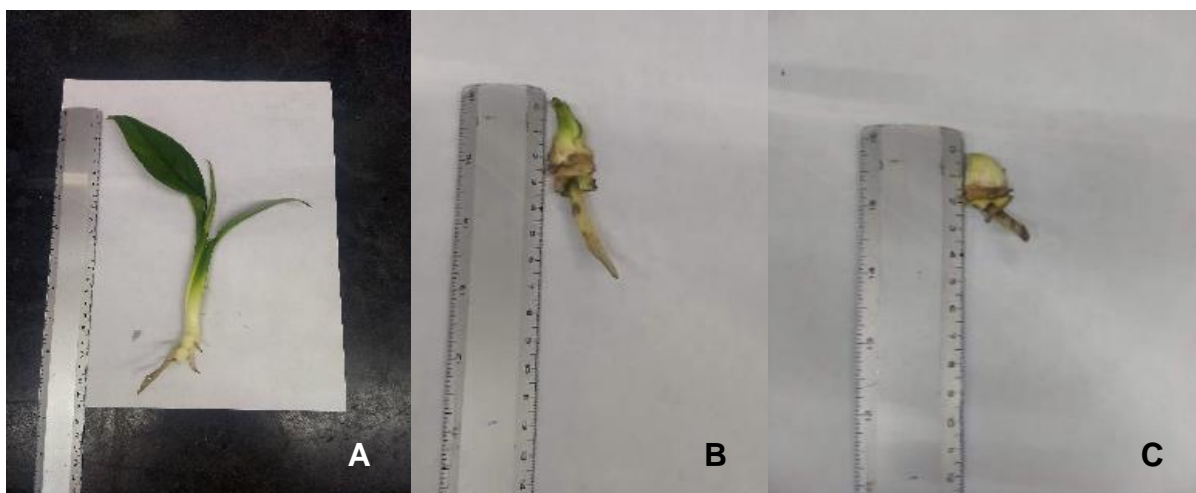


Fig. 19. Brotes ex vitro planta 5E.

Tabla. 9. Tipo de brote y medidas de planta y rizoma.		
Tipo de brote	Medida planta (cm)	Medida rizoma (cm)
Brote grande	12	2.5
Brote mediano	2.5	0.5
Brote chico	2	sin

El proceso de desinfección utilizado fue el mismo que se usó en la primera siembra de los brotes, y en la Fig. 20 se muestran los resultados.

Fig. 20. Brotes *in vitro* planta 5E: **A.** Brotes en solución Captán (2g/l) mismo día de siembra, de acuerdo al protocolo de desinfección de brotes de la planta 5E, **B.** Ápice grande 30 min después de la desinfección y siembra, **C.** Rizoma brote grande 30 min después de la desinfección y siembra, **D.** Ápice brote mediano 30 min después

de la desinfección y siembra, **E**. Rizoma brote mediano 30 min después de la desinfección y siembra, **F**. Brote chico 9 días después de la siembra.

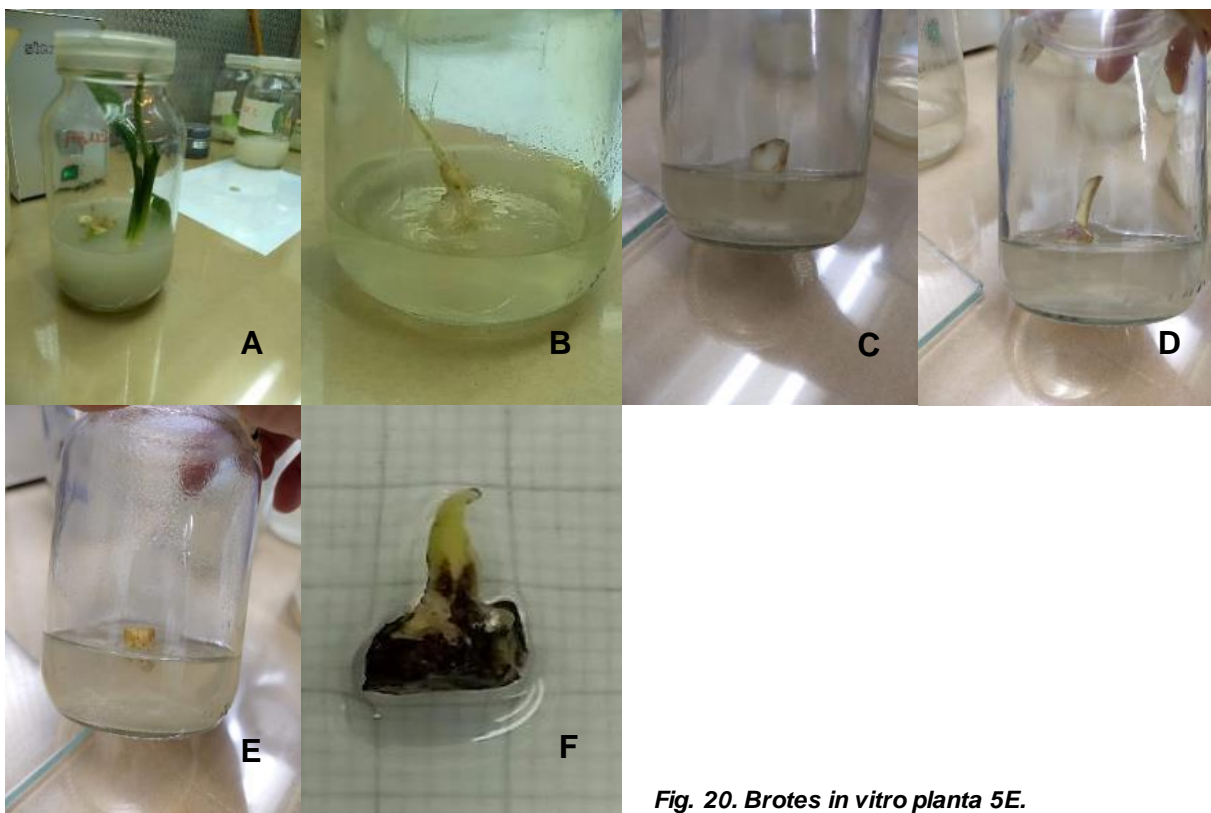


Fig. 20. Brotes in vitro planta 5E.

Los brotes y ápices se subcultivaron a medio con CA como se percibe en la Fig.21.

Fig. 21. Brotes planta 5E en CA 29 días después de la siembra: **A**. Ápice brote grande, **B**. Brote chico, **C**. Hoja, **D**. Hoja, **E**. Brote chico, **F**. Ápice brote mediano, **G**. Rizoma brote mediano.

En esta figura se observa contaminación además de tejido muerto.

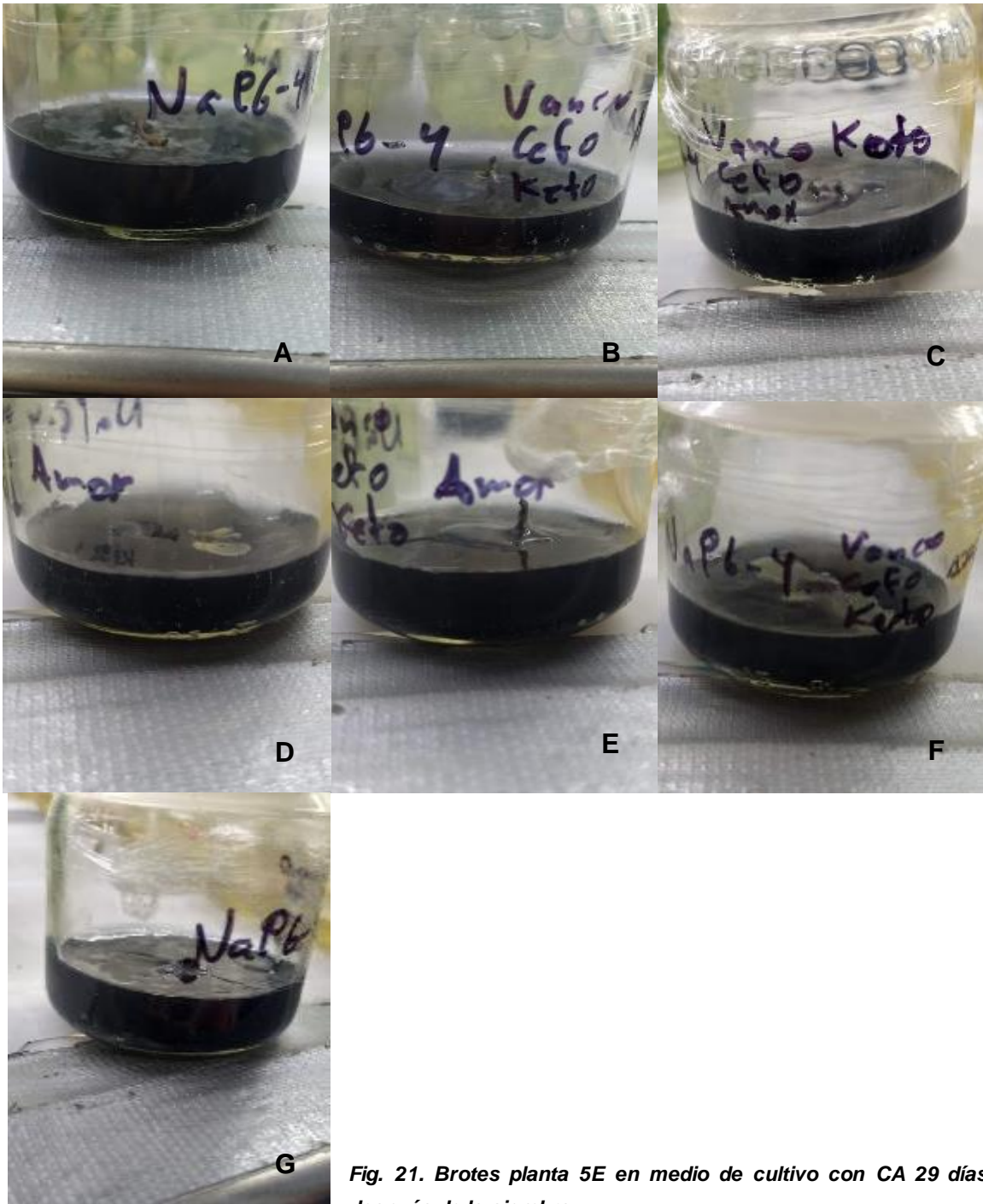


Fig. 21. Brotes planta 5E en medio de cultivo con CA 29 días después de la siembra.

Se realizó una vez más una siembra de un brote. La Fig. 22 muestra el brote ex vitro.



Fig. 22. Brote ex vitro octubre 2023.

En la Fig.23 se muestran algunas fotos del protocolo de desinfección del brote, siendo el mismo protocolo que se utilizó en los brotes anteriores.

Fig. 23. Protocolo desinfección de brote octubre 2023: **A.** Brote ex vitro en solución antioxidante con antibióticos, **B.** Brote en campana de flujo laminar en solución de NaClO al 7%, **C.** Brote en campana de flujo laminar en Captán (2g/l), **D.** Brote después del protocolo de desinfección, **E.** Brote después de quitar raíces y hojas maduras.

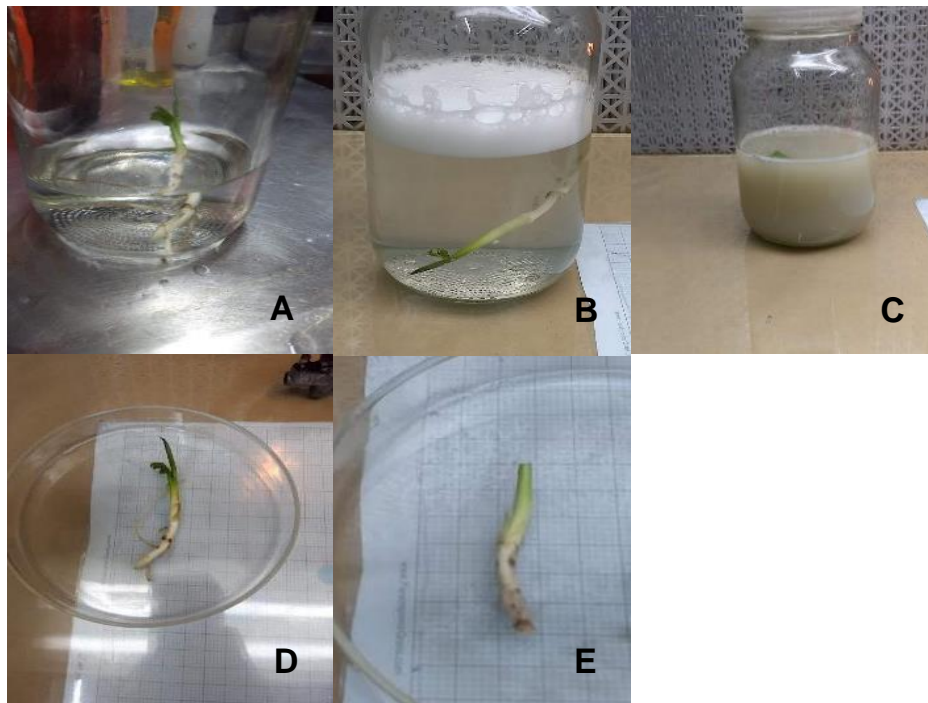


Fig. 23. Protocolo desinfección de brote octubre 2023.

El brote sembrado, aun cuando se sometió a un protocolo de desinfección modificado con base a los resultados obtenidos, se infectó 4 veces más, y se desinfectó de acuerdo con el protocolo de desinfección presentado en la sección 4.2.8.

En la Fig. 24 se observa la transición del brote sembrado y después de las desinfecciones. Como se observa el brote murió debido a las repetidas desinfecciones y por la presencia del hongo.

A. Brote sembrado en medio NaP6-4, **B.** Brote infectado después de desinfecciones.

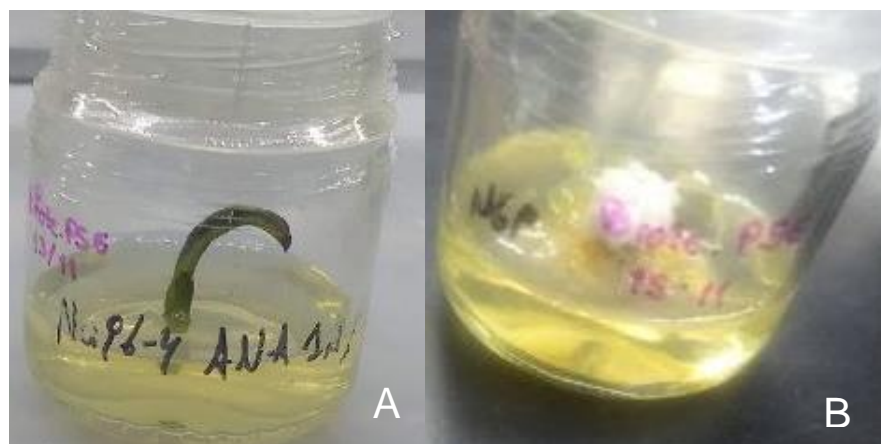


Fig. 24. Brote octubre planta 5E 1 mes después de desinfección.

4.3.1.3. Lámina foliar.

El tercer explante seleccionado fueron las láminas foliares.

La Fig. 25. Corresponde a los explantes de láminas foliares: **A.** Láminas foliares en los distintos medios líquidos con antibióticos y antifúngicos: ST-1, ST-2 y ST-C para su agitación durante 24 h (ensayo 4), **B.** Lámina foliar en medio ST-13 días después de la siembra (ensayo 4), **C.** Lámina foliar en medio ST-C 3 días después de la siembra (ensayo 4), **D.** Explantes de lámina foliar 3 días después de la siembra (ensayo 4), **E.** Láminas foliares en medio ST-1 con CA en el día de la siembra (ensayo 5), **F.** Láminas foliares oxidadas después de 5 meses y 29 días (ensayo 5), **G.** Láminas foliares oxidadas después de 7 meses y 12 días (ensayo 3), **H.** Láminas

foliares oxidadas 12 días después de la siembra, I. Lámina foliar con cambio de coloración e hinchamiento 12 días después de la siembra (ensayo 5).

A partir del ensayo 4, las láminas foliares se sembraron en los medios de cultivo antes mencionados pero adicionados con CA como se muestra en las fotos E, F, I. Sin embargo, pasados 5 meses de subcultivo las láminas foliares se oxidaron, en las fotos F-H se puede observar dicho tejido oxidado.

Cabe señalar que no todas las láminas foliares se oxidaron, algunas dieron respuesta de las siguientes formas: cambiando de coloración, es decir se presentaban secciones color verde claro alrededor de la lámina foliar, o se hinchaban. Dicha respuesta se representa en la foto I. Estos segmentos de láminas foliares se usaron para el protocolo de protoplastos que se realizó y que se presenta en el CAPÍTULO V.

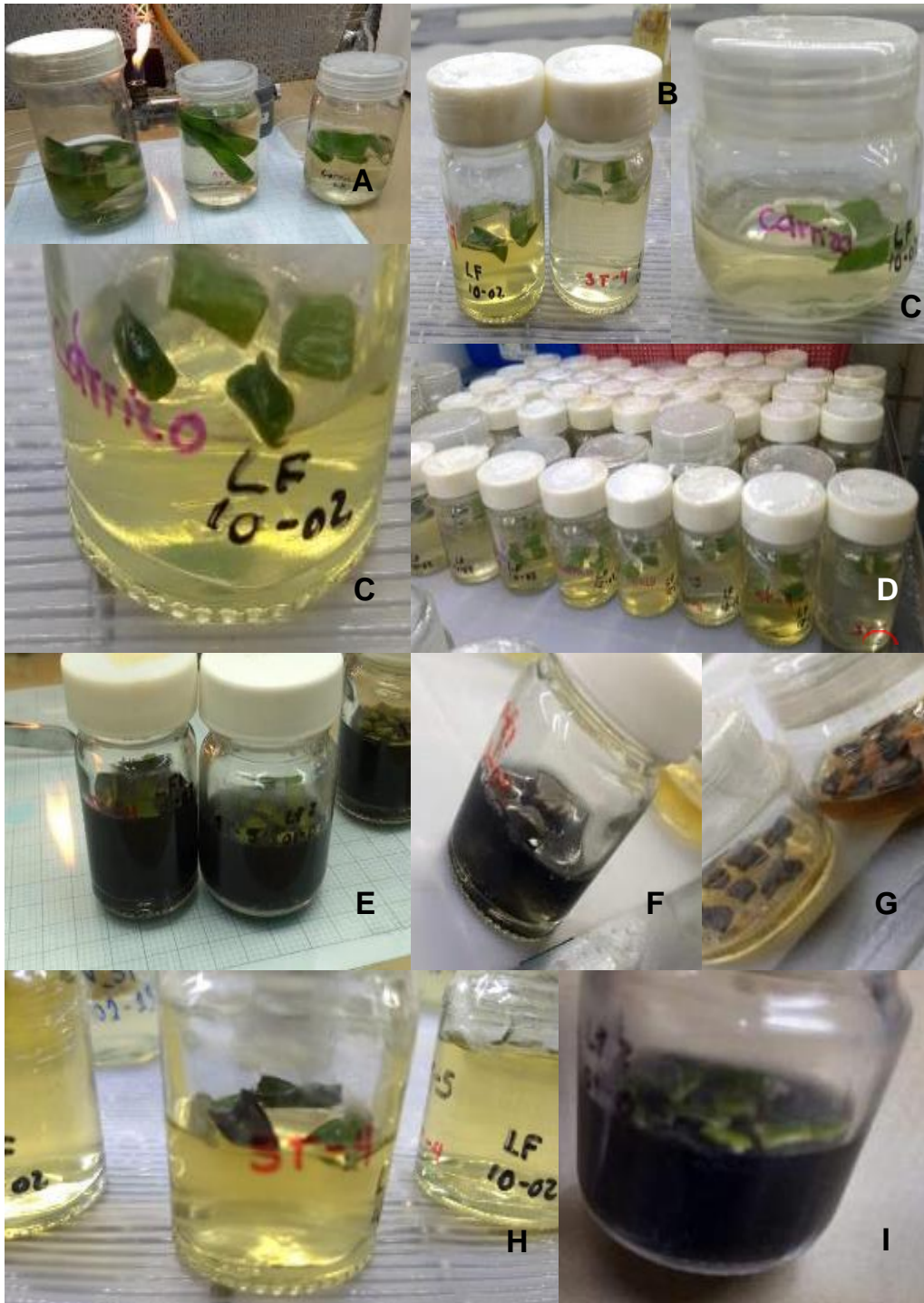


Fig. 25. Explantes de lámina foliar.

4.3.1.4. Lígulas

El cuarto explante seleccionado fueron las lígulas.

En la Fig. 26. Se muestra las respuestas de este explante. En la foto A se puede ver su aspecto al ser seccionadas en la campana.

Las lígulas no se oxidaron tanto como los rizomas, sin embargo, se oxidaron un poco más en comparación con las láminas foliares.

En la Fig. 26 se muestran los explantes de lígula: En el panel **A**, está la Lígula al ser seccionada en la campana de flujo laminar el día de siembra (ensayo 5), mientras que en el **B** aparecen explantes de lígula en medios ST-C y ST-1 con sus respectivos medios líquidos en la parte superficial 3 días después de la siembra.

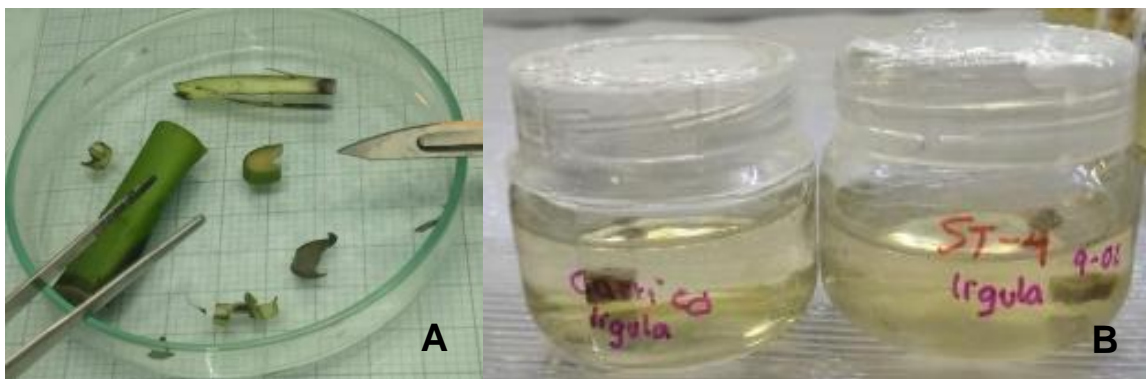


Fig. 26. Explantes de lígula.

A partir del ensayo 4, las lígulas se sembraron en los medios de cultivo antes mencionados pero adicionados con CA como se muestra en la Fig. 27. Estas fotos muestran el aspecto después de 5 meses y 1 día después de la siembra (ensayo 5).



Fig. 27. Explantes de Lígula en medio ST-2 con CA.

4.3.1.5. Nervadura central

El quinto explante seleccionado fueron las nervaduras centrales. Tras la desinfección no presentó oxidación, como se aprecia en la Fig. 28 foto A, donde se observan en los distintos medios líquidos con antibióticos y antifúngicos: ST-1, ST-2 y ST-C (anteriormente nombrado Carrizo) para su agitación durante 24 h (ensayo 4), como parte final del protocolo de desinfección.

A partir del ensayo 4, las nervaduras centrales se sembraron en los medios de cultivo antes mencionados pero adicionados con CA, como se muestra en la Fig. 28 foto B, en donde se observa la nervadura central oxidada después de 5 meses y 29 días de la siembra (ensayo 5).

Fig. 28. Explantes de nervadura central: **A**. Nervaduras centrales en los distintos medios líquidos, **B**. Nervadura central oxidada después de 5 meses y 29 días de la siembra (ensayo 5).

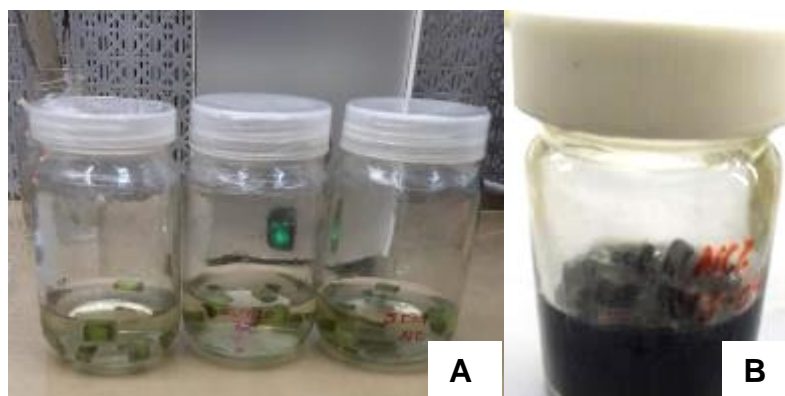
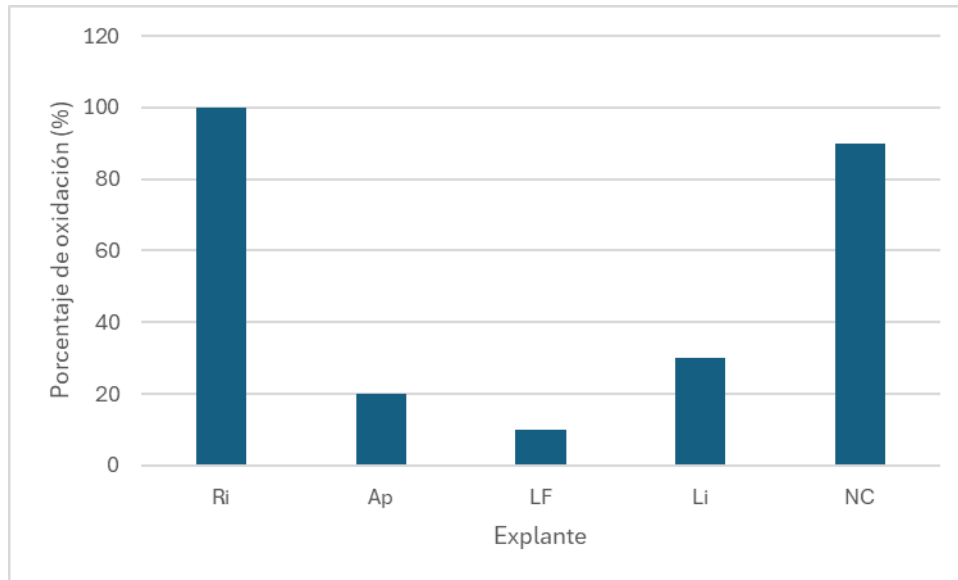
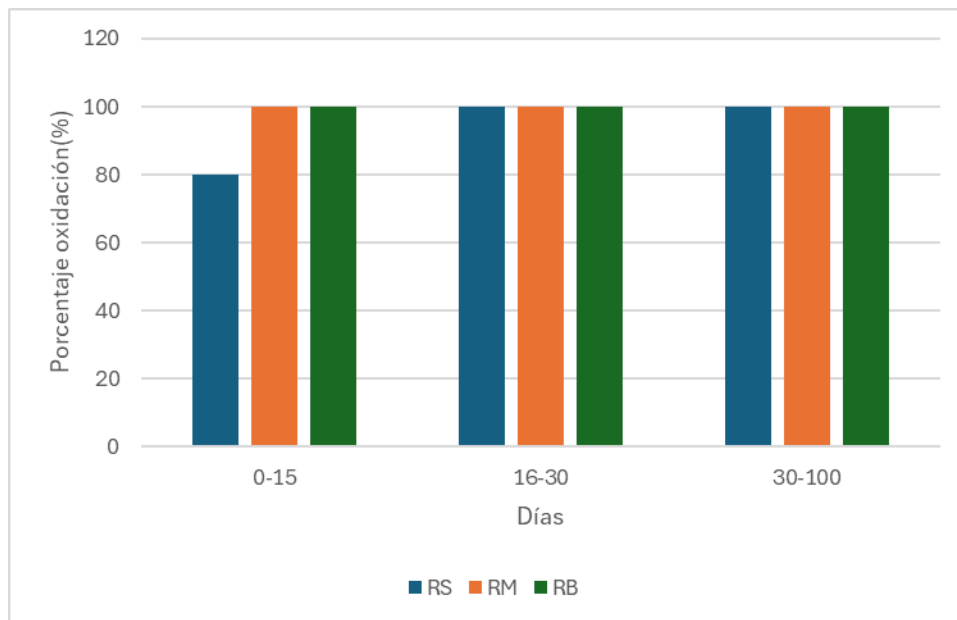


Fig. 28. Explantes de nervadura central

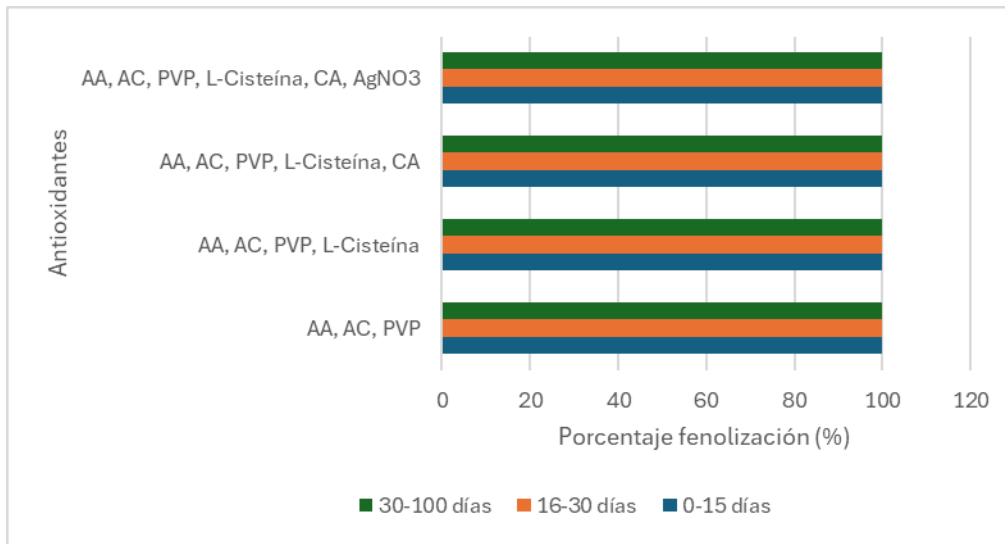
A continuación, se presentan las gráficas de los parámetros que se consideraron para evaluar la respuesta morfogénica de *Spathiphyllum sensation* con la técnica de organogénesis: porcentaje de oxidación y tipo de explante.



Gráfica 1. Porcentaje de oxidación en cada explante.



Gráfica 2. Porcentaje de oxidación en cada explante del rizoma de acuerdo al transcurso de los días.



Gráfica 3. Porcentaje de oxidación con respecto la combinación de antioxidantes en el transcurso de los días en LF, Li, Ap, Nc, Ri.

4.4. DISCUSIÓN

La desinfección química llevada a cabo en los diferentes ensayos fue un proceso largo y riguroso debido a que el objetivo fue la eliminación de hongos y bacterias presentes en la superficie de las plantas, siempre que éstos fueran superficiales.

Durante esta etapa se tuvieron varios factores fundamentales para lograr el establecimiento de cultivos asépticos, los métodos de desinfección y los antioxidantes. Además, la respuesta morfogénica no sólo depende de conseguir la asepsia, sino también del tipo de explante y medio de cultivo.

Como se describió en materiales y métodos, los métodos de desinfección se hicieron en dos partes, la primera desde la selección de la planta, el lavado de las diferentes secciones de la planta donadora, y la segunda dentro de campana. Cabe señalar que los antioxidantes se utilizaron desde la primera parte. Por ello se discutirá primero la respuesta de los distintos explantes sometidos a los diferentes antioxidantes.

4.3.3.1. Antioxidantes en el medio de cultivo y oxidación

Se probaron distintos explantes: rizoma, ápice, lámina foliar, lígula, nervadura central, y todos ellos presentaron una oxidación desde el inicio. Se observó que, en los órganos o tejidos, al inicio del aislamiento, ya iniciaba la oxidación y ésta, al cabo de dos horas, ya era evidente en casi todos los explantes. Esta situación provocó que, en un par de días, los explantes no presentaran respuesta alguna a los diferentes medios de cultivo. Sin embargo, si se logró observar que había grados de oxidación en los diferentes explantes, de mayor a menor oxidación se enlistan: rizoma, nervadura central, ápice, lígula, lámina foliar, como se muestra en la gráfica 1. La lámina foliar no se oxidó rápidamente e incluso se observó un poco de hinchazón y cambio de coloración en el transcurso de varias semanas. Aun cuando las hojas también presentaron algo de oxidación, se decidió mantenerlas para obtener protoplastos ya que éstas no presentaban contaminación y su oxidación fue moderada.

Todos los explantes utilizados en los ensayos 1 a 3 se oxidaron y contaminaron, pero sirvieron para definir los criterios para los siguientes métodos de desinfección, evaluados en los ensayos 4-7.

Todos los explantes presentaron diferencias en cuanto al tiempo en que se evidenció la oxidación, así como el porcentaje de tejido oxidado. De esta manera se observó que el rizoma se oxidó desde 1-4 días después de la siembra; ápice, yemas, lígulas y meristemos se oxidaron después de 5 meses de haber sido sembrados, mientras que las láminas foliares se oxidaron después de casi 6 meses después de la siembra; y las nervaduras centrales se oxidaron después de 1 día de la siembra. Estas diferencias de oxidación en cada explante se deben a que algunos tejidos de la planta son más maduros que otros, entre los tejidos maduros tenemos al rizoma y la lígula, en los tejidos jóvenes a las láminas foliares ya que provenían de hojas jóvenes, ápice y nervadura central, y se reporta que los tejidos jóvenes son menos susceptibles a la oxidación que los tejidos maduros (Sherrington y George, 1984).

Como se puede observar, la LF es el explante que más se tardó en oxidar y la nervadura central la que se oxidó rápidamente.

Al no contar con información sobre el cultivo *in vitro* de esta especie, y específicamente sobre métodos de desinfección se tuvieron que hacer observaciones sobre la respuesta de estos tejidos y se constató que la oxidación no permitió que los explantes respondieran a los diferentes medios de cultivo.

Es importante destacar que la elección, el aislamiento y desinfección de los diferentes tejidos u órganos, es el primer paso para tener éxito en el establecimiento de los cultivos *in vitro* de cualquier especie.

En el caso del explante, es importante su estado fisiológico, edad no sólo del tejido, sino también de la planta donadora de explantes. El grado de desarrollo y crecimiento y, sin duda alguna su estado fitosanitario.

Durante el proceso de desinfección la manipulación, el método utilizado, también son factores muy importantes para lograr el establecimiento de cultivos asépticos (Franclet *et al.*, 1987).

Aun cuando se eligieron los tejidos y órganos saludables, se utilizaron compuestos no tan agresivos, y la manipulación fue cuidadosa, aun así, se presentó una condición de estrés para los explantes. La separación de los tejidos en la planta madre, la separación y/o disección ya bajo las condiciones asépticas, la concentración y tiempo de exposición a la desinfección, posiblemente provocaron que los tejidos se dañaran y se presentara una reacción a través de la producción de metabolitos secundarios tales como los compuestos fenólicos. Estas sustancias desencadenan reacciones de hipersensibilidad, las cuales pueden ser desde cantidades pequeñas de exudación al medio de cultivo hasta la muerte de células en donde se produjo la reacción, hasta las células vecinas y finalmente, la muerte del tejido o explante.

Algunos autores mencionan que el daño mecánico puede generar reacciones fenólicas y los fenoles sintetizados pueden ser de tres tipos:

1. La síntesis de productos fenólicos monoméricos (fitoalexinas).
2. La síntesis de derivados polifenólicos.
3. La oxidación de componentes fenólicos sintetizados anteriormente que dan lugar a quinonas y a material polimerizado (ligninas).

(Stonier, *et al.*, 1971).

Los fenoles son sustancias lábiles y fáciles de oxidar, dando como resultado productos fitotóxicos, provocando alteraciones en las respuestas morfogénicas, en la inhibición del crecimiento y desarrollo de los explantes.

George y Sherrington, 1984 sostienen que es necesario controlar la biosíntesis de fenoles y/o retardar o impedir su oxidación cuando llegan al medio de cultivo. Esta oxidación de fenoles provoca un ennegrecimiento tanto del medio de cultivo como de los explantes, dando paso a la muerte o necrosis del tejido.

En los resultados obtenidos en el presente trabajo, se pudo corroborar que esta planta produce tejidos altamente sensibles al estrés y la producción de fenoles, por lo que su oxidación requiere de poco tiempo para expresarse a través de la necrosis de los explantes. Sin embargo, los tipos de explantes responden de diferente manera y ello puede deberse al grado de diferenciación del tejido, a la madurez de este y a su estado fitosanitario.

Para evitar el necrosamiento de los tejidos, muchos autores recurren al uso de antioxidantes y adsorbentes, así como a alguna técnica de manejo de los cultivos. Los antioxidantes más utilizados son el AA, el AC, la L-cisteína, entre otros. En cuanto a los adsorbentes, el CA y el PVP son los más utilizados en CTV.

En el caso del rizoma, los explantes no dieron respuesta debido a la oxidación y contaminación. En la gráfica 2 se muestran los porcentajes de oxidación con respecto a la sección del rizoma empleado y el número de días.

Como se puede observar RM y RB obtuvieron 100% de oxidación desde el día 0, por su parte el RS es el único que obtuvo un porcentaje de oxidación del 80% en los días 0-15, pero dicho porcentaje aumentó al 100% en los días posteriores.

El ápice se oxidó fácilmente al igual que el rizoma, pero se observó que esto sólo ocurría de ápices provenientes de la planta madre más no de los brotes adventicios que surgieron posteriormente de la planta **5E**, estos brotes se obtuvieron ya que dicha planta se rigió bajo más diferentes soluciones de riego, una modificación fue la de añadir Kn que es una citocinina natural (Díaz, 2017; Industrias Agrícolas Unidas [IAUSA], 2016), mientras que el BA aunque también lo producen las plantas naturalmente, se agregó de forma sintética, con esto se esperaba que la planta tuviera mayor afinidad a la Kn y con ello se lograra un mayor número de brotes adventicios, lo cual sucedió ya que de la planta 5E se obtuvieron 4 brotes los cuales se muestran en las Fig. 19 y 22. Todos los brotes adventicios se contaminaron, pero se notó un menor grado de oxidación comparado con los otros ápices obtenidos de las tres plantas de octubre y las cuatro plantas de enero.

Dado que todos los explantes se oxidaron, esto hace suponer que parte del problema de la oxidación proviene de toda la planta, y de acuerdo con Concepción *et al.*, 2005 las plantas con flores contienen diversos tipos de fenoles cuya función se desconoce en la mayoría de los casos. Sin embargo, todos poseen un anillo aromático al que se unen diversos grupos sustituyentes, como el hidroxilo, u otras estructuras cíclicas no aromáticas. Además, al observarse que el crecimiento inhibido de los explantes de *Spathiphyllum sensation* pudiera ser debido a la oxidación, se considera que esta especie contiene altos niveles de taninos (compuestos polimerizados que forman parte de los compuestos fenólicos), (Moreno, 2022), u otros hidroxifenoles, basándose de acuerdo a (García, 1999; Moreno, 2022), en lo reportado a la familia de las aráceas, también dentro de esta familia se ha reportado que los anturios y las monstera son tóxicas principalmente por la presencia de oxalatos de calcio en forma de rafidios (agujas) que están presentes en casi todas las partes de la planta: raíces, hojas, tallos, frutos, y enzimas que potencian el efecto de dichos cristales, causando una acción mecánica irritativa en ojos y boca en personas muy sensibles (Galicia *et al.*, 2023), estos efectos irritativos se confirmaron con la manipulación de esta especie en el primer protocolo de desinfección por lo que se utilizó para los ensayos 2-7 guantes, sin embargo los oxalatos de calcio actúan también como mecanismo de defensa por ejemplo en la inflorescencia previniendo que depredadores los ataquen (Coté y Gibernau, 2012). Los oxalatos de calcio tienen una relación directa con los radicales libres (ROS), ya que estos regulan la formación y crecimiento de los cristales (Khan, 2014), y dado que la familia *Araceae* los contiene entonces se produce una sobreproducción de ROS y una disminución en la capacidad antioxidante (Khan, 2014), por ello se presentó mucha oxidación.

La oxidación ocurre porque en las células vegetales durante las reacciones redox de varias vías metabólicas se forman especies de oxígeno reactivo también conocidos como (ROS), que son formas parcialmente reducidas del oxígeno atmosférico como el OH^\cdot , H_2O_2 (Azofeifa, 2009). También se forman RNS que son similares a los ROS, pero se forman a partir del O_2^- con el NO_2^- . El OH^\cdot se ha reportado que ocasiona el colapso celular al ser altamente destructor de lípidos,

polisacáridos, proteínas y ácidos nucleicos (Bray *et al.*, 2000; Cassells y Curry; Mittler *et al.* 2004, citados por Azofeifa, 2009).

A su vez Tang *et al.*, 2004, citados por Azofeifa, 2009, correlacionó la muerte celular con altos contenidos de H₂O₂. Cabe mencionar que los ROS no pueden ser eliminados completamente o inhibidos porque las plantas los producen para la: germinación, mitosis, elongación celular por mencionar algunas (Azofeifa, 2009). Los ROS ocasionan un tipo de estrés en la planta conocido como estrés oxidativo, y es este estrés oxidativo lo que conocemos comúnmente como oxidación.

Este estrés oxidativo se da al aislar el material vegetal en la etapa de establecimiento *in vitro*, ya que los explantes de *Spathiphyllum sensation* luego de ser cortados se observaba un oscurecimiento, liberando así frecuentemente exudados oscuros al medio de cultivo: metabolitos secundarios que modulan el desarrollo de la planta y su respuesta a estreses bióticos y abióticos (Azofeifa, 2009). Estos exudados liberados en la mayoría de los casos inhiben el crecimiento del explante, perdiendo su capacidad de proliferar y por último mueren (George 1996; Ogita, 2005, citados por Azofeifa, 2009). Como fue el caso de *Spathiphyllum sensation* que aun con una solución conteniendo diferentes antioxidantes, y empleando diferentes estrategias, los tejidos continuaron oxidándose hasta que llegaron a la muerte celular.

Debido a la complejidad del proceso de oxidación y de no haber logrado tejidos no oxidados, se implementó una solución integral que involucraba diversas estrategias para tratar de combatir este problema: como la eliminación del tejido lesionado del explante; subcultivos frecuentes; siembra en medio sólido agregando 1 ml de medio líquido del mismo tipo sobre la superficie del explante o también utilizando la solución de antioxidantes; los antioxidantes utilizados fueron: AC, AA, L-cisteína, PVP, AgNO₃ y CA; la L-cisteína, los ácidos y el PVP se implementaron en la solución de antioxidantes utilizados en los protocolos de desinfección antes mencionados, en la sección de materiales y métodos.

De acuerdo con lo expresado por Murashige, 1974, citado por Azofeifa en 2009 en la etapa de establecimiento *in vitro* es importante añadir un antioxidante que retarde

o evite la oxidación ya sea del explante o del medio de cultivo. En los medios de cultivo elaborados en el laboratorio 116 de CTV se utilizan como antioxidantes AA y AC, y más específicamente en la especie de *Spathiphyllum sensation* se utilizaron a razón de 100 mg/l. Estos agentes antioxidantes previenen la formación de los ROS o los descomponen una vez formados (Matkowski, 2008, citado por Azofeifa, 2009). Los antioxidantes contienen agentes reductores los cuales actúan de las siguientes formas: pueden remover oxígenos de las moléculas, reaccionan con intermediarios del equilibrio redox, evitan la oxidación de fenoles y ayudan a la remoción de quinonas¹⁰ formadas por el explante (Azofeifa, 2009). En la literatura (Seneviratne y Wijesekara, 1996, citados por Azofeifa, 2009), mencionan que la incorporación al medio de cultivo del AA y del AC disminuyó considerablemente la oxidación que ocurría en los explantes. En el anexo 6 tabla 14 se muestran las distintas combinaciones del AA y AC utilizados para la solución de antioxidantes y medio de cultivo, y se obtuvo que la concentración utilizada para esta investigación queda dentro de lo reportado. Sin embargo, el usar únicamente AC y AA para *Spathiphyllum sensation* no fue suficiente, lo cual coincide con Concepción *et al.*, 2005 quienes demostraron la ineficiencia de estos compuestos para el control de este fenómeno al obtenerse el mayor porcentaje de oxidación (97.8%), en las yemas de guayaba (especie que posee un alto contenido de compuestos fenólicos al igual que *Spathiphyllum sensation*), en comparación con la L-cisteína. Estos resultados demostraron que la L-cisteína resulta ser un buen antioxidante, por lo que se utilizó este agente antioxidante que de acuerdo con Vázquez *et al.*, 2021 es una alternativa para reducir la oxidación de los compuestos fenólicos y mantener una tasa de supervivencia de los explantes en especies recalcitrantes a la morfogénesis *in vitro*. En su estudio Vázquez *et al.*, 2021 reportaron la más alta supervivencia del 43% con L-cisteína a una concentración de 50 mg/l con el menor porcentaje de oxidación (30%) de los explantes de *Pimenta dioica* L. Merrill, una especie recalcitrante también. Que comparando dicha concentración con la utilizada para los medios de cultivo de explantes de *Spathiphyllum sensation* (1g/l), está muy por debajo.

¹⁰ Metabolitos secundarios con un sistema aromático (Moreno, 2022).

El uso del aminoácido L-cisteína en conjunto con los antioxidantes AA y AC no controló el problema de la oxidación así que se optó por añadir adsorbentes.

Comenzando por los compuestos utilizados como adsorbentes, el PVP fue utilizado en una concentración de 0.25 g/l y en la literatura su uso se reporta en un rango de concentración de (0.25-10 g/l), en el medio de cultivo para el manejo de la oxidación en diferentes especies vegetales (Azofeifa, 2009), el PVP adsorbe los fenoles a través de uniones hidrógeno, previniendo así la oxidación y polimerización (George, 1996, citado por Azofeifa, 2009), además en la literatura se menciona la conveniencia de utilizar el PVP en conjunto con algún agente antioxidante u otro adsorbente para disminuir la oxidación (Amin y Jaiswal, 1988; Texeira *et al.*, 1993; Gannoun *et al.*, 1995; Abdelwahd *et al.*, 2008, citados por Azofeifa, 2009), por ello se utilizó el CA como segundo adsorbente a una concentración de 1g/l en el medio de cultivo, el CA es un adsorbente comúnmente usado en la familia de las Araceae, esta familia presenta graves problemas de oxidación (Azofeifa, 2009), entonces el CA se usa prevenir dicha oxidación ya que remueve sustancias tóxicas del medio de cultivo que son producidas durante el autoclaveado como el HMF (5-(hidroximetil)-2-furaldehído) que se forma primeramente a partir de la fructuosa que a su vez es formada por la hidrolisis de la sacarosa durante el proceso de autoclaveado (Azofeifa, 2009), o producidas por el mismo explante como las quinonas (Ebert *et al.*, 1993; Petersen *et al.*, 1999; Bhatia y Ashwath, 2008, citados por Azofeifa, 2009). El CA es utilizado en un rango de concentraciones (0.5-10 g/l) siendo más frecuentes las dosis de 2 y 3 g/l (Azofeifa, 2009), y es comúnmente utilizado para la disminución de los metabolitos tóxicos, la exudación fenólica y la acumulación de exudado marrón (Thomas, 2008), no obstante la adición de CA al medio de cultivo no fue suficiente para controlar la seria y frecuente oxidación de los explantes de *Spathiphyllum sensation* por ello se consideró que la oxidación se debía al intercambio de gases que el explante generaba con su entorno, un gas generado es el etileno: una hormona gaseosa de la planta envuelta en varios aspectos del ciclo de vida de la misma (Fig. 9). Entonces se probó con la adición de AgNO₃ al medio de cultivo, este compuesto inhibe la acción del etileno el cual está asociado a hormonas del estrés patógeno (Kumar *et al.*, 2009), y es sabido que una

célula vegetal sometida a un estrés reacciona produciendo mayores niveles de ROS (240-720 $\mu\text{M/s}$ de O_2^- y entre 5 – 15 $\mu\text{M/s}$ de H_2O_2), siendo que en condiciones normales de crecimiento de la célula los niveles de ROS son bajos: 240 $\mu\text{M/s}$ de O_2^- y 0.5 $\mu\text{M/s}$ de H_2O_2 (Azofeifa, 2009), entonces al aumentar los niveles de ROS aumenta a su vez la oxidación. El modo de acción de AgNO_3 aún no está claro, sin embargo, pocas evidencias en la literatura sugieren una interferencia en el mecanismo de percepción del etileno (Beyer, 1976, citado por Kumar *et al.*, 2009), el AgNO_3 inhibe la acción del etileno debido a que es soluble en agua y carece de fitotoxicidad a concentraciones efectivas (Beyer, 1976, citado por Kumar *et al.*, 2009), la concentración utilizada en esta investigación fue de 2 mg/l. Un posible mecanismo de acción del AgNO_3 es el siguiente: los iones de Plata son capaces de generar una insensibilidad del etileno en las plantas al perturbar los sitios de unión de este (Rodríguez *et al.*, 1999), sin embargo después de la adición del AgNO_3 al medio de cultivo, se notó que los explantes reducían su tamaño en lugar de crecer, por lo que se optó por quitar el AgNO_3 al medio de cultivo, una razón por la cual la adición de AgNO_3 fue contraproducente es porque los metales pesados pueden desencadenar el estrés oxidativo y nitrosativo (Bray *et al.*, 2000; Pompeu *et al.*, 2008, citados por Azofeifa, 2009). También el CA se optó por eliminarlo del medio de cultivo ya que al ser un adsorbente este a su vez adsorbe las moléculas de agua impidiendo así el crecimiento de los explantes.

En cuanto a los antioxidantes empleados y el tipo de combinación, se muestra en la gráfica 3. Se observó que no hay diferencia alguna en cuanto al porcentaje de oxidación dado que todos los explantes se oxidaban como se mencionó sin importar el tipo de antioxidante empleado.

Otro factor que influye en la oxidación es el agente desinfectante, que de acuerdo a Seneviratne y Wijeskara, 1996, citados por Azofeifa, 2009; Salgado, 2007 encontraron que la desinfección de los explantes con NaClO a diferentes concentraciones promovió el oscurecimiento de los tejidos y la exudación de fenoles, pero el uso de HgCl_2 como agente desinfectante provocó menos problemas de oscurecimiento, en el caso de *Spathiphyllum sensation* nunca se cambió el

agente desinfectante por el cloruro de mercurio debido a su toxicidad y por su alto costo, por eso se varió solo el uso y combinación de antioxidantes, y se disminuyó el tiempo en que los explantes se sumergían en la solución de NaClO. Igualmente se redujo la concentración de Tween®-20 de 3 gotas/ 250 ml a 2 gotas/250 ml porque al ser un agente surfactante este hace que el NaClO penetre más rápido en el tejido y por consiguiente se oxide más el tejido.

Otro problema frecuente que se presentó aparte de la oxidación y que está ligado con la desinfección fue la contaminación.

4.3.3.2. Contaminación y desinfección de explantes de *Spathiphyllum sensation* y antibióticos.

Las plantas de ornato (grupo al que pertenece *Spathiphyllum sensation*), son susceptibles a un gran número de enfermedades causadas por hongos, bacterias, virus y nemátodos (Martínez, 2004; Verdeguer, 1985). El material biológico para esta investigación provenía de condiciones *ex vitro* razón por la cual se desinfectó en el establecimiento *in vitro* para solucionar dicho problema.

El protocolo de desinfección incluyó cuatro factores: agroquímicos, agente surfactante (Tween®-20), agente desinfectante (NaClO), y el uso de antibióticos y fungicidas tanto en el protocolo como en el medio de cultivo, los cuales son una alternativa para disminuir las bacterias y hongos sobre el material vegetal (Robert *et al.*, 2006; Fang y Hsu, 2012; Mbah y Wakil, 2012; Sabale *et al.*, 2015, citados por Echenique y Huanca, 2022).

Para lograr la asepsia total (George y Sherrington, 1984), recomiendan el empleo de bactericidas y fungicidas en tiempos prolongados. Estos mismos autores emplean desinfectantes útiles en la eliminación de patógenos, elaborados a base de bactericidas, también conocidos como agroquímicos, su uso puede activar ciertos mecanismos de defensa que existen en las plantas afectadas, estimulando la producción de sustancias fungitóxicas (Melgarejo, 2011). El agroquímico Agri-mycin® 500 actúa sobre los patógenos (los iones Cu^{2+} remueven los electrones de la pared celular de los hongos y bacterias ocasionando la inestabilidad funcional de

la misma porque destruye el funcionamiento de proteínas esenciales al metabolismo), (PortalTECNOAGRICOLA, 2024). Es una combinación de dos antibióticos y sulfato tribásico de cobre con una acción sinérgica y sistémica contra hongos y bacterias (Pfizer, 2019), el cobre estimula la producción de fitoalexinas, estas actúan como sustancias tóxicas contra los patógenos (Melgarejo, 2011). Agri-mycin® 500 se usó con una concentración de 2 g/l y sólo se utilizó en los dos primeros ensayos, ya que se observó que era muy agresivo con los explantes, debido a la presencia de mucho oscurecimiento en los antes mencionados. Además, se consideró que al ser un paso antes de la solución de NaClO esto impidió su correcta desinfección ya que el tejido podría haberse muerto internamente. Solo se mantuvo el enjuague con Captán 50 que es un fungicida agrícola que controla numerosas micosis y pertenece al grupo de los inhibidores multisitio (ADAMA, 2021), a una concentración de 2 g/l para posteriores ensayos; los tiempos en dicho agroquímico se ajustaron a media hora, ya que se consideró que era un tiempo óptimo en el que el tejido no se oxidaba demasiado, esto se constató bajo observación en cada ensayo.

La concentración de la solución de NaClO se preparó al momento porque es lo requerido para la desinfección de los explantes (Leifert *et al.*, 1994, citados por García, 1999), cuya acción germicida se basa en su elevado pH (acción del OH⁻) y en la oxidación del OCl⁻ (Estrela *et al.*, 2002; Fukuzaki, 2006). Este agente desinfectante se ajustó a 15% v/v siendo una concentración alta comparándola con lo reportado en la literatura para otras especies del mismo género: 1 - 3% (Salgado, 2007; 3%: García, 2015; 1.2%: Ramírez, 2001; 0.5 - 1%: Bandyopadhyay, 2011). El tiempo se fue variando en cada ensayo, basándose en el número de explantes contaminados que se obtenían después de cada ensayo, ajustándose finalmente a 10 minutos en los ensayos 6-7 para reducir la oxidación. Cabe resaltar que la contaminación prevalecía en cada ensayo, así que no hubo mucha discrepancia para variar mucho el tiempo de dicha solución, pero se consideró ajustar el tiempo a 15 min; tiempo máximo para que el tejido no se estresara demasiado ni se oscureciera. A la solución de NaClO se le agregó Tween®-20 el cual disminuye la tensión superficial y permite la penetración de las otras sustancias desinfectantes

ya que elimina las ceras de las plantas (George y Sherrington, 1984), este agente surfactante se utilizó a una concentración de 2 gotas/ 250 ml.

Después del protocolo de desinfección los explantes se dejaron en agitación durante cierto tiempo en una solución antioxidante o en medio líquido, ambas soluciones con antibióticos y fungicidas. Los antibióticos como la cefotaxima, la vancomicina y la amoxicilina operan en un sitio único de la célula interrumpiendo la maquinaria biosintética celular (Achicanoy, 2001), aunque tienen la desventaja de: ocasionar problemas por efecto residual, aparición de bacterias resistentes como fue el caso para *Spathiphyllum sensation*, fitotoxicidad y un elevado costo (Achicanoy, 2001). En el caso del meropenem es un bactericida de amplio espectro que inhibe la síntesis de la pared celular bacteriana en bacterias Gram- positivas y Gramnegativas, ligándose a las proteínas de unión a penicilina. Los fungicidas utilizados tienen diferentes mecanismos de acción, pero ambos interfieren con la biosíntesis. También se utilizó Terbinafina la cual interfiere específicamente en el primer paso de la biosíntesis del esterol fúngico, lo que produce la muerte celular del hongo (Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios [AEMPS], 2008); el Ketoconazol impide la síntesis del ergosterol (paso previo a la biosíntesis del esterol) alterando así la permeabilidad de la membrana fúngica (AEMPS, 2013).

La solución antioxidante sólo se utilizó en los tres primeros ensayos, para después cambiarse por el medio líquido que tiene más disponible los nutrientes, factor que contribuye a que los explantes vayan asimilando los nutrientes más rápidamente. Con esta estrategia se buscó que los tejidos se oxidaran menos o eso se esperaba lograr. El tiempo de agitación se varió de 16 h a 24 h para que hubiera un mayor grado de desinfección.

Debido a que el protocolo de desinfección se llevó a cabo de acuerdo con las medidas necesarias presentadas en las tablas 3 y 4, las Fig. 13 y 14 y se utilizó material estéril, la contaminación que se presentó no se pudo eliminar, por lo que se pensó que no fue una infección superficial sino endógena (Esposito *et al.*, 2017, citados por Echenique y Huanca, 2022). De acuerdo con Echenique y Huanca, 2022 entre los contaminantes microbianos, las bacterias y hongos causan pérdidas

elevadas en el cultivo *in vitro* de plantas (Leifert y Waites, 1992), fenómeno que también sucedió con *Spathiphyllum sensation*.

Se observó una mayor contaminación en los explantes de rizoma en comparación con los otros explantes, y de acuerdo con Verdeguer, 1985 ciertas bacterias como *Pectobacterium carotovorum* atacan a los órganos subterráneos de las plantas entre los que se encuentran las raíces y los tubérculos (el rizoma es un tubérculo), causando una alteración parenquimática. Así mismo se sabe que las bacterias atacan al tejido parenquimático y se instalan en los vasos conductores (Verdeguer, 1985) presentes en las hojas, tallos, flores y en los órganos subterráneos. La bacteria que más ataca las hojas, tallos y flores en la familia de las aráceas es *E. chrysanthemi*. En el caso de los meristemos no hay contaminación (Verdeguer, 1985), porque no hay haces vasculares, que es donde la contaminación se centra.

En cuanto al medio de cultivo las sales para los medios MS (ST-1, ST-2) y B5 (ST-C) siempre se mantuvieron al 100%. Esta es una de las razones por las que también pudo darse el oscurecimiento de los tejidos ya que, de acuerdo a Hohtola, 1988, citado por Azofeifa, 2009, los explantes de *Pinus sylvestris* se oscurecieron cuando se cultivaron en un MS normal y se obtuvo un crecimiento satisfactorio cuando las concentraciones de los compuestos nitrogenados se redujeron a la mitad.

CAPÍTULO V: ESTABLECIMIENTO DE CULTIVO DE PROTOPLASTOS

5.1 MARCO TEORICO

Como vía alternativa a la oxidación que se presentó en los explantes sembrados, se optó por obtener protoplastos como una vía de regeneración para *Spathiphyllum sensation*, al esperar obtener microcallo y por consiguiente callo, ya fueran embriogénicos u organogénicos.

El término protoplasto fue introducido por primera vez por el científico Hanstein en 1880. Y, su primer aislamiento fue realizado por Klercker en 1892 utilizando el método mecánico. Sin embargo, los grandes esfuerzos en el campo del cultivo de protoplastos comenzaron en 1960, cuando un científico llamado Cocking aisló protoplastos utilizando técnicas enzimáticas (Singh, 2023).

El protoplasto es una parte de la célula vegetal incluida dentro de la pared celular que puede ser plasmolisado y aislado (López, 2023), por lo tanto, se define como una célula vegetal sin pared celular, el cual está rodeado de su membrana plasmática que tiene el potencial de regenerar la pared celular, crecer y dividirse (Vasil, 1976, citado por López, 2023).

En los laboratorios de CTV se utiliza para regenerar una planta entera proporcionando un medio de cultivo y condiciones ambientales adecuadas. Este procedimiento se conoce como cultivo de protoplastos, aquí los protoplastos pueden ser aislados de cualquier parte de la planta: raíz, brote, hojas o el embrión y posteriormente se cultivan en el medio de cultivo en condiciones óptimas que favorezcan la división celular y la regeneración de la planta.

5.1.1. Cultivo de protoplastos

5.1.1.1. Tejidos y cultivos celulares para la obtención de protoplastos

Por definición un protoplasto es una célula desprovista de su pared celular. La obtención, puede ser a través de diferentes tejidos y células tales como: cultivo de callos, células en suspensión, epidermis y hojas jóvenes. A continuación, se hablará de dichas fuentes biológicas.

Epidermis: Todas las plantas presentan epidermis, la cual es la capa más externa de células que contienen los cuerpos primarios de las plantas (Atlas de Histología Vegetal y Animal, 2023). Al estar en la superficie de los tejidos, son fáciles de obtener, eliminando la cutícula que las protege, de ahí que muchos autores (Dietz *et al.*, 1992; Schulz y Weissenböck, 1986; Yao *et al.*, 2018; Rao y Prakash, 1995; Potrykus y Shillito, 1986), utilizan estos tejidos para lograr el aislamiento de los protoplastos.

Hojas jóvenes: Las hojas son órganos que están en constante crecimiento y, por ende, en divisiones celulares constantes. Muchos autores (Ren *et al.*, 2021; Kuzminsky *et al.*, 2016; Mota *et al.*, 2018; Abel y Theologis, 1994; Gandhi y Khurana, 2001), utilizan hojas jóvenes para obtener los protoplastos a través de la digestión con enzimas y poder liberar los protoplastos.

Cultivos celulares: Otra opción son los cultivos celulares (Wang *et al.*, 1993; Hansen *et al.*, 1995; Toriyama y Hinata, 1985; Gosch *et al.*, 1975; Hurwitz y Agrios, 1984), ya sea de callo o células en suspensión. Sin duda, éstos tienen gran ventaja ya que se encuentran en condiciones asépticas y en constante división, teniendo las células paredes delgadas y fáciles de degradar.

5.1.1.2. Etapas en el cultivo de protoplastos.

La obtención de cultivos de protoplastos se debe llevar a cabo a través de cuatro etapas. Durante la primera etapa se obtienen los protoplastos ya sea de distintos tejidos o células en suspensión. A través de una solución enzimática se eliminan las paredes celulares de las células. Los protoplastos obtenidos, regeneran su propia pared y, a partir de ahí se preparan para la división celular. En la segunda etapa se

efectúan divisiones celulares consecutivas, de una célula se obtienen dos células hijas y así geoméricamente, aunque su crecimiento es exponencial. La tercera etapa da inicio con la formación de microcallos, que son agrupaciones de células en división constante y que forman masas celulares, cuando estas masas celulares se hacen más evidentes dan lugar a la formación de callos. Cuando estos cultivos de callo se subcultivan a medios con reguladores que induzcan a la formación de yemas o de embriones se inicia la cuarta etapa, que es cuando se regeneran las plántulas (Raj, 2023). En la Fig. 29 se muestran las diferentes las etapas.

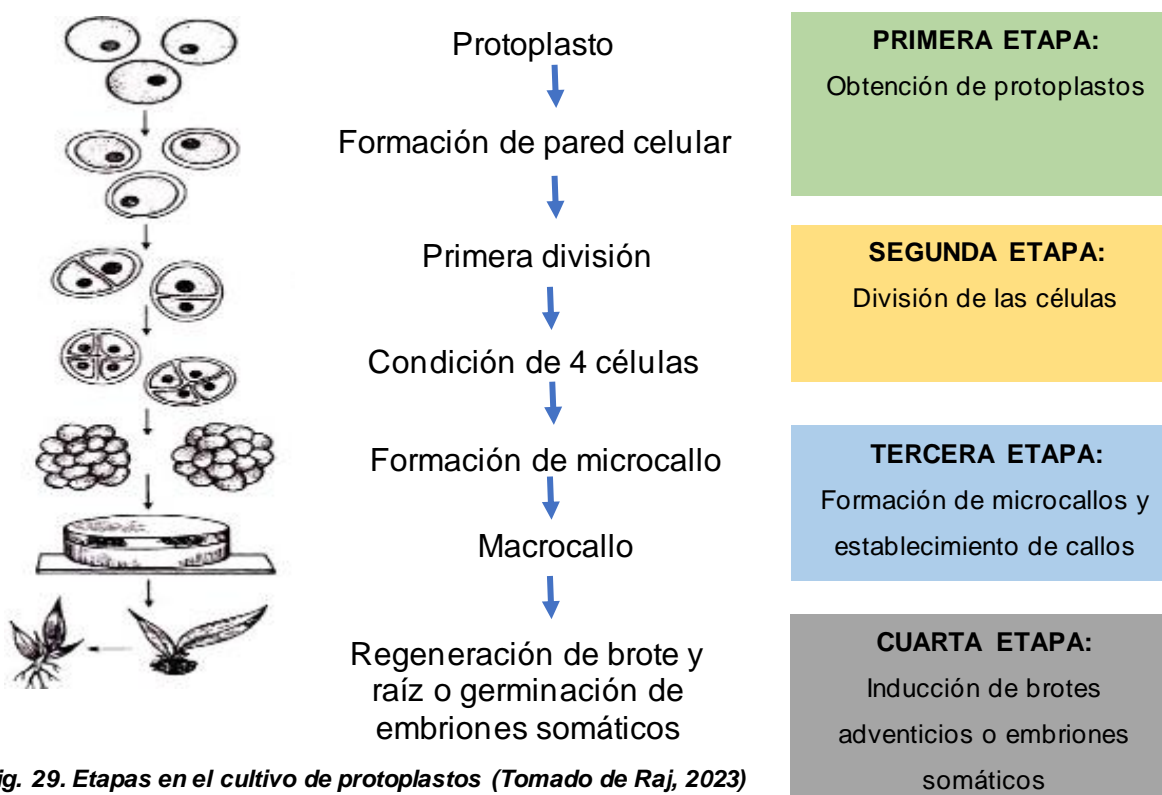


Fig. 29. Etapas en el cultivo de protoplastos (Tomado de Raj, 2023) y modificado por (Vieyra, 2023).

5.1.1.2.1. Primera Etapa: Obtención de protoplastos

En esta etapa se busca remover las paredes celulares de las células y obtener protoplastos en cantidades adecuadas evitando que se plasmolizen los protoplastos. Es importante contar con material vegetal desinfectado para obtener los protoplastos. Una vez logrado, la obtención de estos se puede hacer por dos métodos diferentes: mecánico y el enzimático.

Método mecánico: En este procedimiento, se toma un pequeño fragmento de epidermis de la planta y se somete a plasmólisis (la membrana plasmática se separa de la pared y condensa en citoplasma en el centro del lumen celular), lo que hace que los protoplastos se separen de la pared celular. A continuación, se procede a la disección del tejido para la liberación de los protoplastos. Este método puede parecer tedioso y sólo ayuda a aislar unos pocos protoplastos, aún con esta limitación algunos laboratorios prefieren esta técnica debido a los efectos nocivos que puede haber al utilizar enzimas (Singh, 2023).

Método enzimático: Esta técnica es la más utilizada. En este sistema los protoplastos se aíslan del material vegetal utilizando soluciones enzimáticas. Es un procedimiento rápido, eficiente y libera un mayor número de protoplastos viables (Singh, 2023).

La pared celular está formada de celulosa, hemicelulosa y pectina, por lo que las enzimas utilizadas para el aislamiento incluyen celulasa, hemicelulasa y pectinasa. El período de incubación de las fuentes de protoplastos con enzimas depende del tipo de enzimas utilizadas para preparar la solución enzimática. Existen dos formas de aislar los protoplastos con esta técnica:

Secuencial: Algunas veces se utilizan diferentes enzimas en forma secuencial. Por ejemplo, el uso de dos enzimas, pectinasa y celulasa. Primero, la pectinasa (Macerozyme R-10) separa las células de la laminilla media¹¹, y luego la celulasa separa el protoplasto del resto de la pared celular.

Simultáneo: También puede ser simultáneamente que se usen las diferentes enzimas. Aquí la macerocima como la celulasa se utilizan al mismo tiempo para el aislamiento completo (Singh, 2023).

Enzimas: Los tipos de enzimas más utilizadas son las siguientes:

¹¹ Une las paredes celulares de dos células vecinas.

- **Macerozyme R-10:** Proviene de *Rhizopus sp* (Probiotek, 2023), que es un género de mohos. Esta enzima es un sistema multienzimático compuesto de pectinasa, hemicelulasa y celulasa (PhytoTech Labs, 2024).
- **Celulasa:** Descompone la celulosa transformándola en glucosa (QUIMICA. ES, 2023), al hidrolizar (provoca la ruptura de enlaces covalentes introduciendo moléculas de agua), a la celulosa, la cual es una estructura básica de los vegetales (Regulación Comunidad Europea, 2008).
- **Hemicelulasa:** Tiene la capacidad de hidrolizar a la hemicelulosa presente en los tejidos hasta sus monómeros de pentosas (i.e. xilanos), esta es parte de los tejidos vegetales (Regulación Comunidad Europea, 2008).

Purificación de protoplastos: Finalmente para obtener los protoplastos, éstos son aislados mediante la técnica mecánica o con enzimas y se someten al proceso de purificación. Aquí se filtran todas las células y tejidos no descompuestos y los protoplastos dañados (Singh, 2023). Después de filtrar los protoplastos obtenidos se centrifugan, se lavan, se recuperan por decantación y se siembran.

Medios de cultivo comúnmente utilizados

El medio utilizado para obtener protoplastos debe tener los mismos componentes usados en los medios de cultivo utilizados para obtener callo (Raj, 2023), por ello, se utiliza principalmente el medio MS sin embargo, a menudo se encuentra un medio MS modificado, un medio B5 adecuado para la regeneración de plantas (Singh, 2023), o un medio CPW cuya composición puede consultarse en el anexo 4, elegir cuál medio usar depende de la especie de planta con la que se cuente y los objetivos que se quieran lograr. Además, hay que considerar algunos factores especiales al momento de diseñar este medio de cultivo: relación auxina/Kn elevada para inducir las divisiones celulares; por otra parte, se necesita una relación Kn/auxina elevada para la regeneración; vitaminas y osmolito (la sustancia química que aumenta la presión osmótica de la solución). Finalmente, los protoplastos pueden sembrarse en medio de cultivo sólido o líquido.

En cuanto al osmolito, uno muy comúnmente usado es el manitol. Este polialcohol se agrega al medio líquido de sales CPW que se adicionará a la superficie del medio sólido que soporta la suspensión de protoplastos. El manitol establece un gradiente osmótico entre la pared citoplasmática de las células y el tejido parenquimatoso (Asociación Española de Pediatría [AEP], 2020), lo que resulta en una inhibición de la reabsorción del agua y por consiguiente en la reducción del contenido de agua, esta reducción de agua ayuda a que los protoplastos se liberen con mayor facilidad y por consiguiente ayuda a su división

5.1.1.2.2. Segunda y Tercera Etapa: Mantenimiento de cultivo de protoplastos y obtención de microcallos y callos.

Los callos, como ya se mencionó, forman su nueva pared al cabo de 24 h y da lugar a la segunda etapa, en donde inician las primeras divisiones que tienen lugar a las 24 a 36 h después de la siembra, para entonces ya las células formaron sus paredes celulares e inicia la formación de colonias bien establecidas, haciéndose evidentes después de 21 días. Durante el cultivo, la presión osmótica del medio de cultivo puede reducirse para acelerar la velocidad (no la extensión), de la división. Para los protoplastos en agar o agarosa, se transfieren pequeños bloques que contienen los protoplastos en división a la superficie de un medio (generalmente el mismo), que contiene un nivel más bajo de plasmolítico. El mismo bloque se puede transferir más según sea necesario. Para cultivos líquidos, la adición de volúmenes medidos de medio (de menor presión osmótica), es fácilmente posible.

5.1.1.2.3. Cuarta Etapa: Regeneración de plántulas.

Los cultivos de callos pueden ser subcultivados a medios que contienen como reguladores de crecimiento Citocininas o Auxinas, dependiendo de la vía morfogenética que se busque (Power *et al.*, 1989).

A partir de la cuarta semana, las callosidades son suficientemente grandes para su transferencia, utilizando la punta de un bisturí, a la superficie sobre un medio de regeneración sólido.

En esta etapa, los callos se pueden mantener en cajas de Petri o pequeños frascos y generalmente se requiere subcultivos regulares con un medio para la producción de brotes o embriones somáticos. Los brotes pueden ser enraizados a través de la transferencia a un medio reduciendo las citocininas o sin ellas (Power *et al.*, 1989). Mientras que los embriones somáticos deberán germinar, reduciendo la auxina (puede ser 2,4-D, Dicamba o Picloram), a la mitad de la concentración o, simplemente quitarla. En caso de que sean evidentes los embriones, pero, éstos no logren germinar, se puede añadir AG₃ o ABA para lograr la madurez de estos (Suárez, 2020; Ramírez, 2022).

5.2. MATERIALES Y MÉTODOS

5.2.1. Material biológico

El material utilizado para la obtención de protoplastos fueron cultivos *in vitro* de láminas foliares en medio sólido y líquido que se obtuvieron del protocolo de desinfección y siembra mostrado en el capítulo IV. En la Fig. 30. Se muestran el aspecto de las láminas foliares utilizadas para el protocolo de obtención de protoplastos.

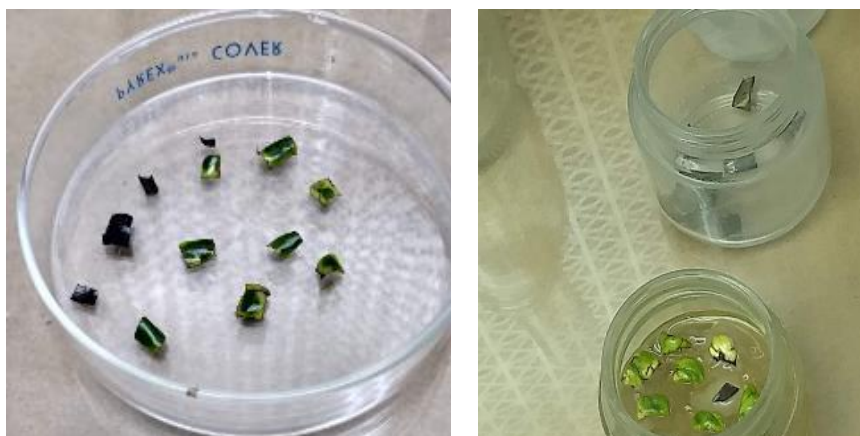


Fig. 30. Láminas foliares con respuesta a medio de cultivo.

5.2.2. Primera etapa: Obtención de los protoplastos.

Para obtener los protoplastos, lo primero que se procedió fue tener todo el material requerido estéril, este proceso se realizó uno o dos días antes en una autoclave vertical y bajo una temperatura de 121°C y una presión de 1.5 kg/cm² durante 30 minutos. Posteriormente todos los procesos se llevaron a cabo bajo condiciones asépticas en una campana de flujo laminar. Sólo la observación en microscopio se realizó fuera de la campana y se tomaron alícuotas de 1 ml y se observaron en un microscopio óptico Motic®. En el momento que se realizaron las observaciones también se tomaron las fotografías.

5.2.2.1. Método de obtención de protoplastos

Se realizaron dos ensayos para la obtención de los protoplastos, modificando algunos aspectos (Tabla 10), sin embargo, los pasos que se siguieron fueron los mismos. El protocolo que se utilizó se enuncia a continuación:

Protocolo de obtención de Protoplastos

1. Preparación de enzimas:
 - a) Pesar 0.9 g de celulasa “Onozuka” R-10. (Yakult Honsha Co., LTD.), y 3.6 g de Macerozyme R-10 (Yakult Honsha Co., LTD.) afuera de campana en balanza. Ver anexo 4 para cálculos.
- En campana:
 - b) En un tubo falcon, verter 15 ml de medio CPW13M.
 - c) Agregar con ayuda de una espátula o bisturí las dos enzimas (macerozyme y celulasa).
 - d) Al presentarse precipitación, se terminó de agregar l Macerozyme en otro tubo falcon con 15 ml de medio CPW13M.
 - e) Filtrar cada una de las enzimas. Para la celulasa se utilizaron 7 filtros (2 grandes y 5 pequeños) y para Macerozyme se utilizaron 5 filtros pequeños con tamaño de poro de 0.22 µm). Terminada la filtración las enzimas se vertieron en respectivos frascos estériles ámbar y se etiquetaron.

2. Pesar 1g de peso fresco de material de hoja de cada tipo de medio de cultivo (sólido y líquido).
3. Se toman los segmentos de hoja que están en medio de cultivo sólido y líquido (las cuales ya están desinfectadas) se colocan en cajas Petri, una para cada tipo de medio, se sumergen dichos segmentos de manera que el envés de las hojas quede hacia abajo en medio CPW 9M durante 30 min, seguido de medio CPW 13M durante otros 30 min. Este tratamiento favorece la plasmólisis gradual mientras se eliminan los restos celulares.
4. Medir 30 ml de la solución enzimática en un tubo falcon, añadir antibióticos: cefotaxima (250 mg/l) y vancomicina (25 mg/l).
5. Transferir los fragmentos de hoja a matraces de 100ml que contenga aproximadamente 20 ml de una solución enzimática esterilizada por filtración y se incuba en un cuarto oscuro a 27°C con agitación (100 rpm/min) durante 1 h.
6. Filtrar y después verter la solución enzimática de cada matraz en tubos falcon para centrifugar (5000 rpm durante 5 min). Tomar 1 ml de cada tubo y verter en tubos eppendorf para observar en microscopio óptico si hay presencia de protoplastos.
7. Transferir los segmentos de hoja a nuevas cajas Petri y hacer pequeños segmentos de 4 cm², ponerlos en 15 ml (aprox.) de solución CPW13M. Cubra completamente la superficie de hojas con la solución.
8. Incubar durante la noche 16 h a 27°C en la oscuridad, sin mover.

9. Tomar una muestra de 0.5ml de cada caja Petri y verter en tubos eppendorf. Observar en el microscopio.
10. Pasar los fragmentos de hoja a cajas Petri desechables y agregar 5ml de CPW21S para presionarlas y enjuagarlas, y poder liberar los protoplastos.
11. Juntar los dos líquidos (líquido CPW13M de 16 h y medio CPW21S de enjuague) de cada caja respectivamente y filtrar dos veces: una filtración por medio de dispersores celulares (tomar muestra de 0.4 ml para tubo eppendorf) seguida de bolsas de malla de nylon. Las filtraciones se vierten en frascos estériles y se etiquetan.
12. Pasar la mezcla filtrada de líquidos de cada frasco a tubos falcon y centrifugar (5000 rpm durante 5 min). El protoplasto se acumulará en la superficie. Después de la centrifugación tomar una muestra de 0.4 ml de cada tubo y observar al microscopio.
13. Quedarse sólo con la parte superficial si se ven protoplastos. Y poner en cada caja Petri con 12 ml de medio sólido para protoplastos, 0.7 ml de la solución de protoplastos seguido de 0.7 ml de medio líquido CPW9M para protoplastos en el caso de cajas Petri y 1 ml si se siembra en frascos.
14. Dejar en observación durante 2 semanas, e ir reduciendo la concentración de manitol cada 2 semanas de la siguiente manera: 9%M, 6%M, 3%M, 0%M.
15. Finalmente observar las células con la finalidad de ver si se regeneran sus paredes celulares y no se plasmolisan.

En la Tabla 10 se dan los elementos usados en cada ensayo para la obtención de los protoplastos:

Tabla. 10. Elementos usados en cada ensayo de protoplastos.				
	Ensayo 1		Ensayo 2	
Procedencia de lámina foliar	Medio líquido	Medio sólido	Medio líquido	Medio sólido
		Sí	Sí	No
Peso fresco de Hoja (g)	2			
Concentración de enzimas	Macerozyme R-10	Celulasa	Macerozyme R-10	Celulasa
	2%	0.5%	2%	0.5%
Núm. Filtros	12		6	
Núm. Centrifugaciones	3		2	
Tipo de soporte	Malla	Papel filtro	Malla	Papel filtro
	Sí	No	No	Sí
Apertura de poro (mm)	0.014		70	
Siembra en	Cajas Petri	Frascos	Cajas Petri	Frascos
	Sí	No	Sí	Sí

En la Fig. 31 se muestran los pasos para la obtención de protoplastos. A continuación, se describe cada uno de los paneles: **A.** Láminas foliares en medio de cultivo sólido, **B y C.** Láminas foliares en medio de cultivo líquido, **D.** Soluciones enzimáticas de Macerozyme R-10 y celulasa, la solución más oscura es la de Macerozyme, **E.** Láminas foliares de cada tipo de medio de cultivo previamente pesadas (1 g de cada tipo de medio) en cajas Petri, **F.** Aspecto de cajas Petri después del enjuague con CPW9M, **G.** Láminas foliares de cada tipo de medio de cultivo cortadas en segmentos en solución enzimática CPW13M, **H.** Segmentos de láminas foliares de cada tipo de medio después de decantar la solución enzimática y transportadas a cajas Petri pequeñas desechables para hacer el enjuague con CPW21S, **I.** Filtración con dispersor celular de la solución enzimática con suspensión de protoplastos del medio sólido, **J.** Siembra de protoplastos provenientes de medio sólido después de agregar 0.7 ml de suspensión de protoplastos y 0.7 ml de medio de cultivo CPW9M, **K.** Siembra de protoplastos provenientes de medio líquido después de agregar 0.7 ml de suspensión de protoplastos y 0.7 ml de medio de cultivo CPW9M.

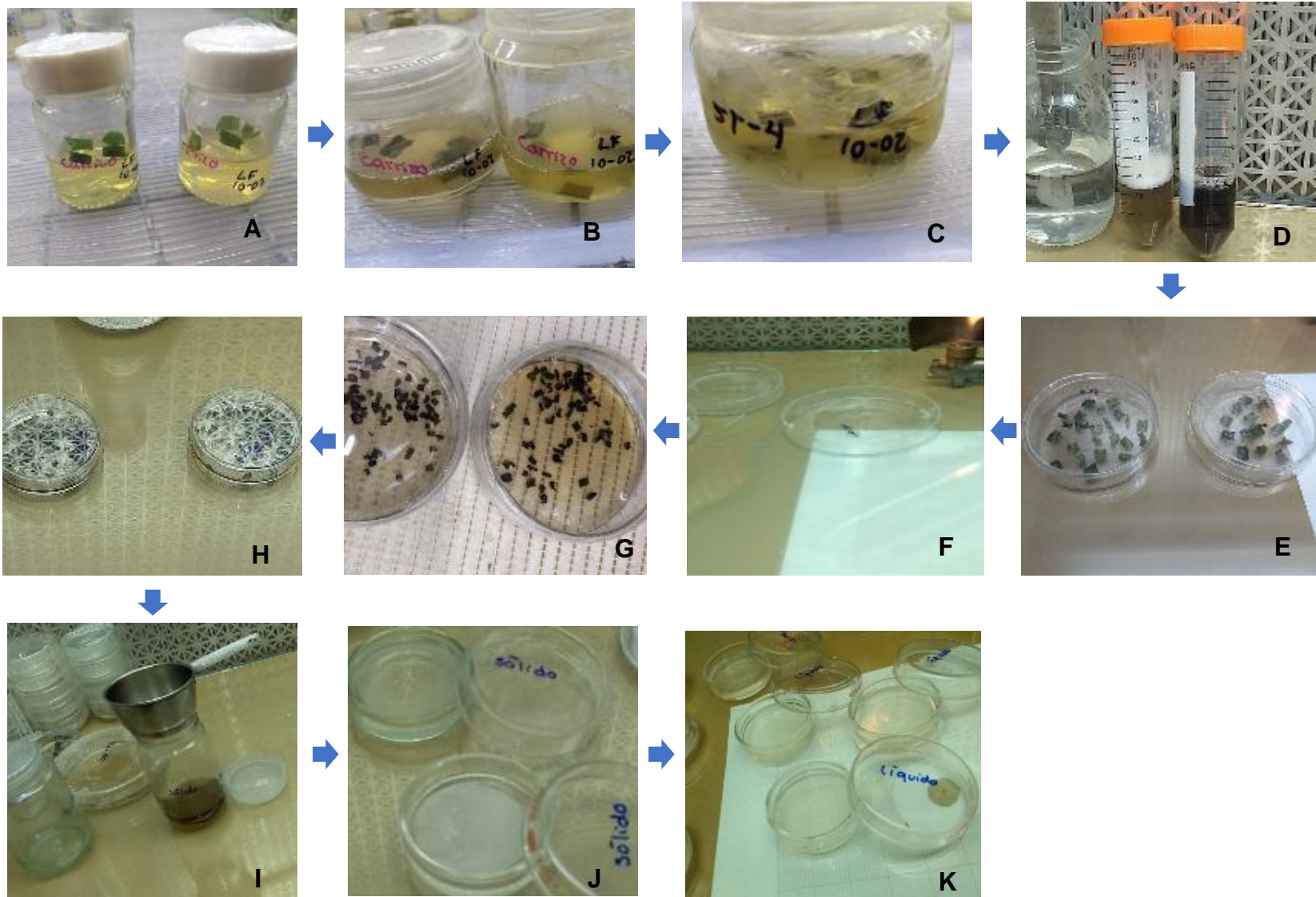


Fig. 31. Protocolo de obtención de protoplastos.

En la Fig. 32 se presenta la continuación del protocolo de obtención de protoplastos: **L.** Siembra de la suspensión de protoplastos proveniente de medio líquido, **M.** Siembra de la suspensión de protoplastos proveniente de medio de cultivo sólido, **N.** Cultivo de protoplastos, **Ñ.** Cultivo de protoplastos de medio de cultivo líquido, **O.** Cultivo de protoplastos de medio de cultivo sólido, **P.** Sobrante de soluciones enzimáticas de medio de cultivo líquido y sólido y segmentos de láminas foliares después de los enjuagues con los medios de cultivo líquido CPW.

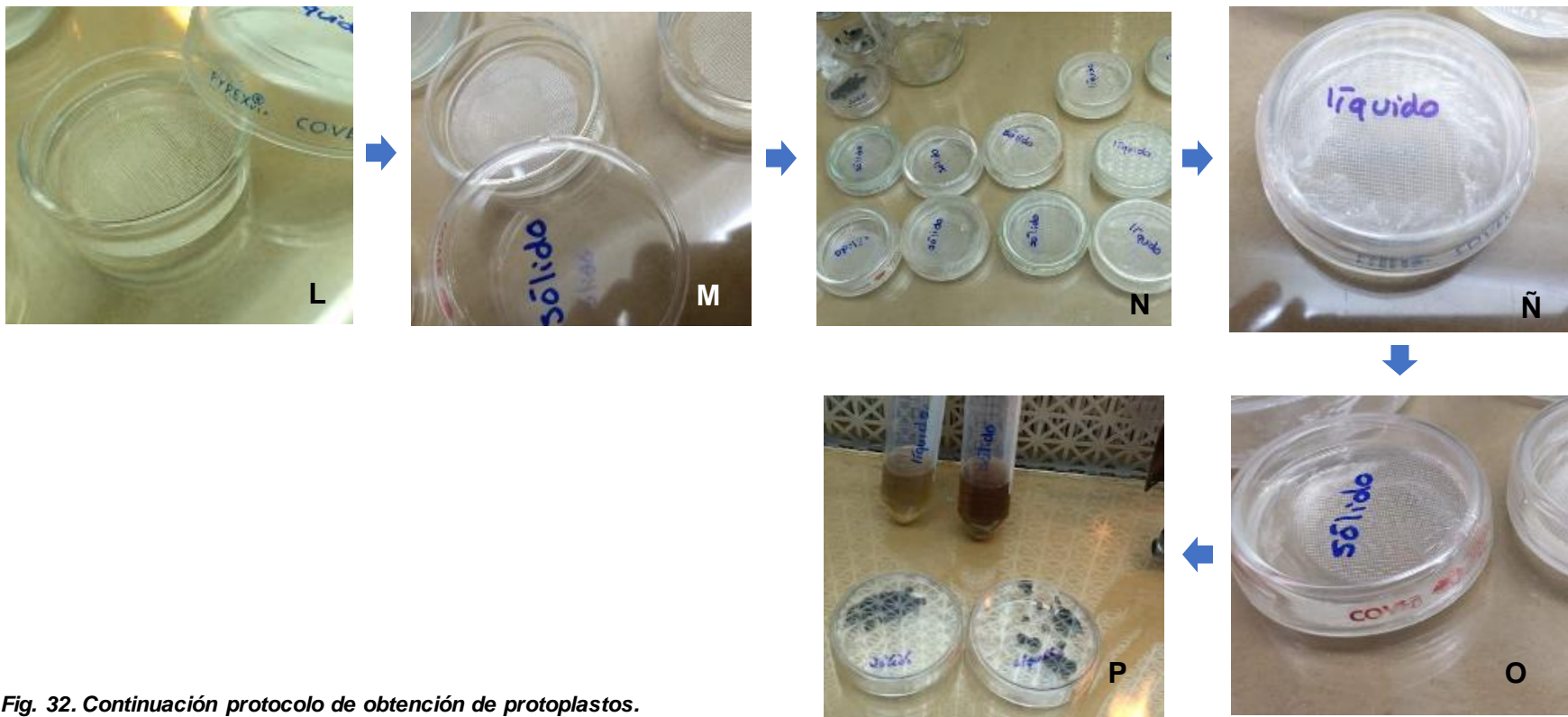


Fig. 32. Continuación protocolo de obtención de protoplastos.

Como se menciona en el protocolo, cada dos semanas se redujo la concentración de manitol del medio líquido que se agregó a los cultivos de protoplastos.

En la Fig. 33 se presenta el procedimiento para hacer un squash (técnica histológica que consiste en aplastar los agregados de células, separar células o protoplastos entre el portaobjetos y el cubreobjetos), a los protoplastos. **A.** Cultivo de protoplastos en microscopio estereoscópico, **B.** Se traspasan los microcallos a un portaobjetos, **C.** Portaobjetos y cubre objetos con contenido de microcallos listos para ver a través de microscopio óptico.

Fig. 33. Procedimiento para hacer squash.

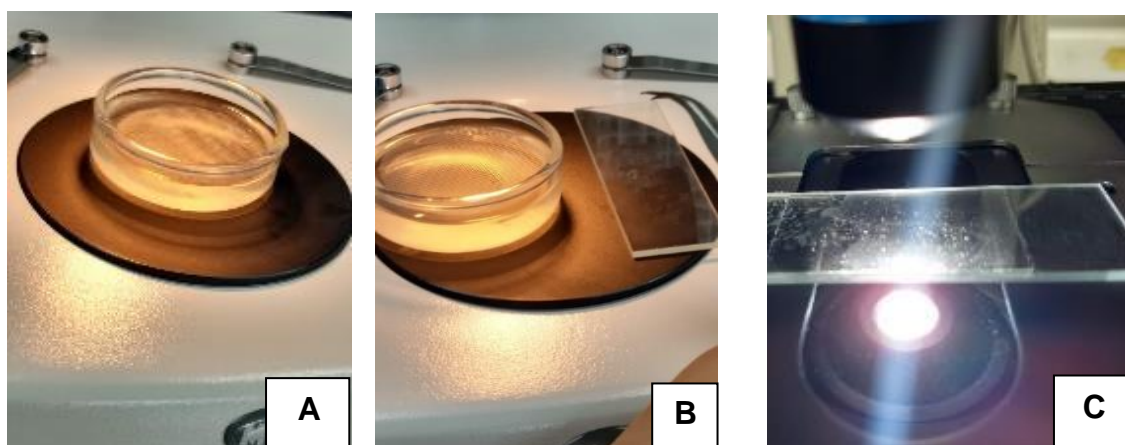


Fig. 33. Procedimiento para hacer Squash.

5.2.3. Medio de cultivo para protoplastos

La preparación de los medios de cultivo se especifica en el anexo 4 y sólo se indica a continuación, las cantidades y tipos de fuentes de carbono.

En la tabla 11 se muestran las cantidades de sacarosa, manitol y sales CPW para preparar los medios de cultivo líquidos descritos.

Tabla. 11. Medios de cultivo líquidos para protoplastos (1).				
Medio	CPW	CPW21S	CPW9M	CPW13M
Sales CPW (ml)	10			
Sacarosa (g)		210		
Manitol (g)			90	130
pH	5.8			

Cabe señalar que sólo el medio CPW13M tuvo enzimas (Macerozyme R-10 al 2% y Celulasa al 0.5%), que se añaden dentro de la campana de flujo laminar. A los medios CPW9M y CPW21S no se les agregó enzimas porque son para los enjuagues que se utilizaron dentro del protocolo de obtención de protoplastos.

5.2.4. Segunda etapa: Mantenimiento de los protoplastos.

Después de obtenidos los protoplastos, se sembraron en un medio sólido dependiendo de la etapa en la que estaban: duplicación o regeneración.

En la tabla 12 se muestran con más detalle los componentes para 1 litro de medio de cultivo sólido para los protoplastos.

Tabla. 12. Medio de cultivo para cultivo de protoplastos (1l).		
Medio	Duplicación	Regeneración
Componentes		
Sales MS I- V	100%	
Glicina	2mg	
Vitamina R2	100%	
ANA	2mg	1mg
BA	1mg	2mg
Sacarosa	30 g	
pH	5.7	
Gelzan	3.3	
Cefotaxima	250 mg	
Vancomicina	50 mg	

En esta etapa los protoplastos se sembraron en el medio de duplicación, esto se realizó desde la primera siembra hasta la cuarta semana que es donde se utiliza el medio de regeneración.

La tercera etapa: obtención de microcallos y callos se observará en resultados.

5.3 RESULTADOS

5.3.1. Resultados del primer cultivo de protoplastos

5.3.1.1. Primera etapa: Obtención de protoplastos

En esta etapa, se utilizaron explantes (segmentos de hojas), sembrados con anterioridad en medios líquidos y sólidos, lo que permitió contar con células en división celular y, por lo tanto, las células hijas presentaban paredes celulares laxas y delgadas, lo que facilitó obtener los protoplastos y, en el segundo enjuague se lograron observar en el microscopio. En la Fig. 34 se pueden ver algunas células todavía con pared celular, otras con partes de las células desprovistas de sus paredes y protoplastos ya obtenidos.

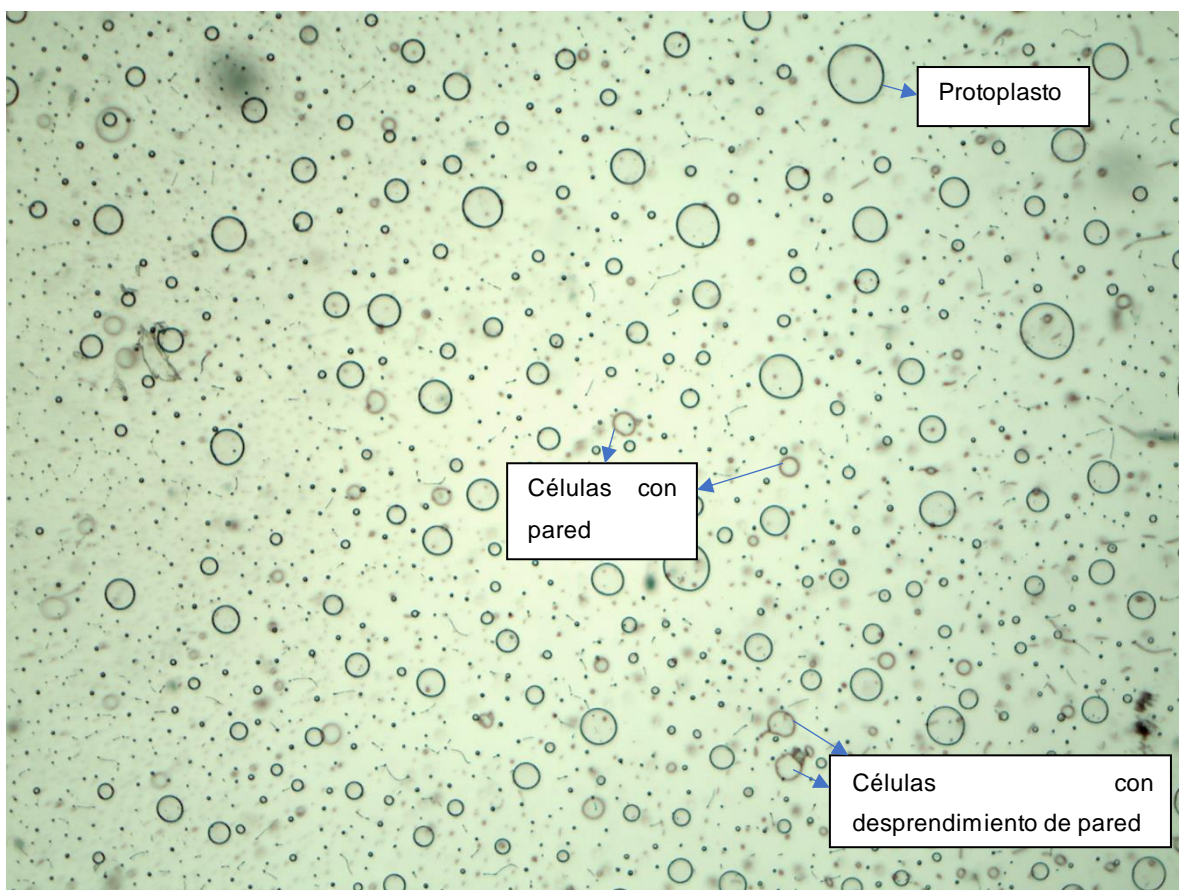


Fig. 34. Protoplastos, células observadas procedentes de LF de medio sólido.

En la Fig. 35. se muestran los protoplastos obtenidos el mismo día en que se realizó la siembra. **A.** Protoplastos de medio de cultivo líquido, **B.** Protoplastos de medio de cultivo sólido.

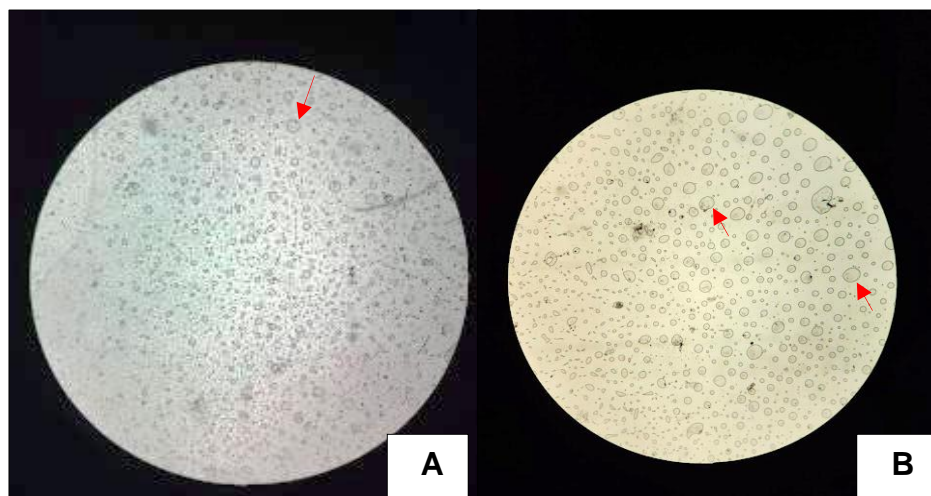


Fig. 35. Protoplastos después de una hora de haber terminado el protocolo. Las flechas rojas muestran los protoplastos.

En esta etapa, se utilizó una mezcla de enzimas: celulasa y Macerozyme R-10 a una concentración de 0.9 g/15ml y 3.6g/15ml respectivamente, estas enzimas degradaron la pared celular, y el manitol no permitió que se plasmolisaran los protoplastos obtenidos, por lo cual el protocolo probado fue adecuado para la obtención de protoplastos de esta especie, aun cuando no se contó con ninguna referencia de artículos ni trabajos previos con esta especie. Cabe señalar que se hicieron modificaciones a algunos protocolos utilizados en el laboratorio de CTV del dpto. de Bioquímica y protocolos del manual de cultivos de tejidos vegetales de (Power *et al.*, 1989).

En esta etapa se fue disminuyendo el agente osmótico mientras las células comenzaron a regenerar sus paredes celulares. Al inicio de esta etapa, se realizaron observaciones al microscopio con la finalidad de verificar el restablecimiento de las paredes celulares y realizar mediciones los protoplastos. En la Fig. 36 se muestran las longitudes de los diámetros obtenidas con el programa Motic® de los

protoplastos, las fotos fueron tomadas en un microscopio óptico con un objetivo de 4(x). Para el ensayo 1, se obtuvieron protoplastos con longitudes que fluctuaron de 1 μm a 6 μm siendo más frecuente el diámetro de 1 μm . Así mismo, se pueden observar los protoplastos, algunas células con parte de las paredes celulares que se están desprendiendo y, en menor cantidad células completas.

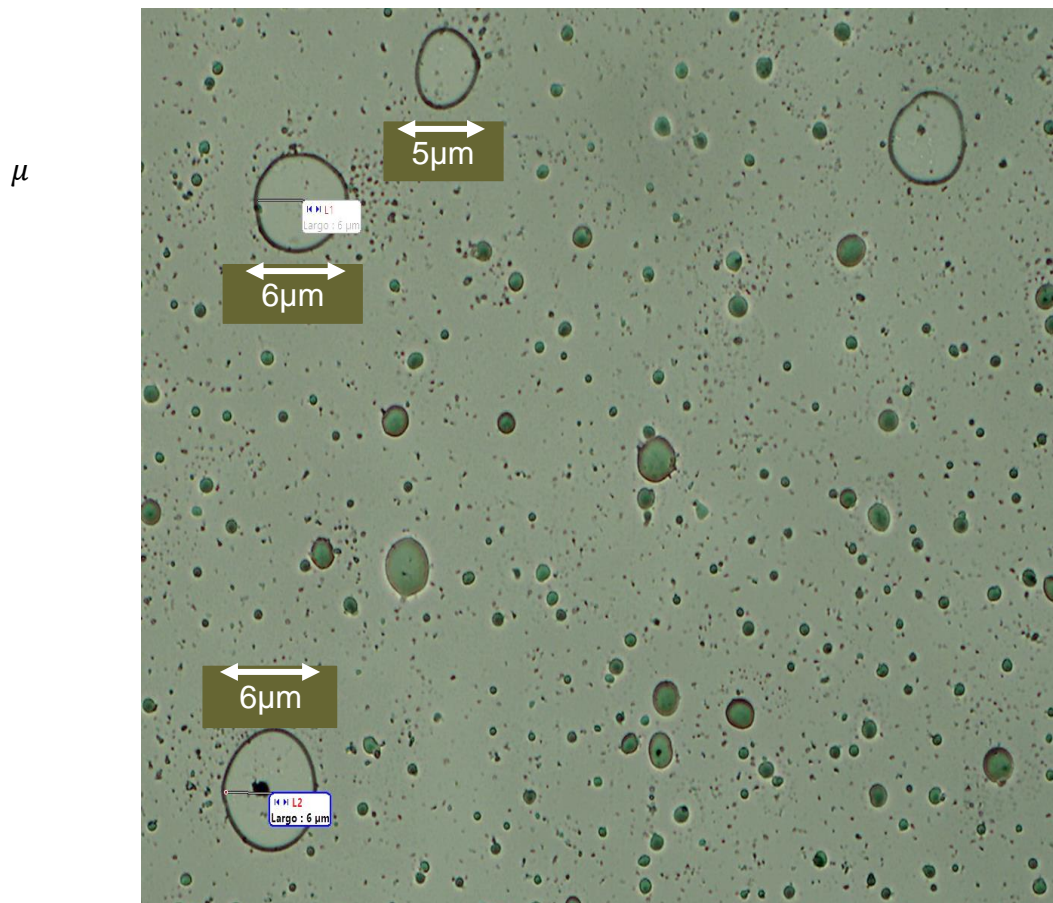


Fig. 36. Diámetros de los protoplastos obtenidos del primer ensayo de protoplastos en el mismo día de siembra del medio de cultivo sólido. Diámetros de 5 y 6 μm .

Adicionalmente en la Fig. 37 se muestra un acercamiento a algunos protoplastos para una mayor claridad de los diámetros obtenidos de los protoplastos.

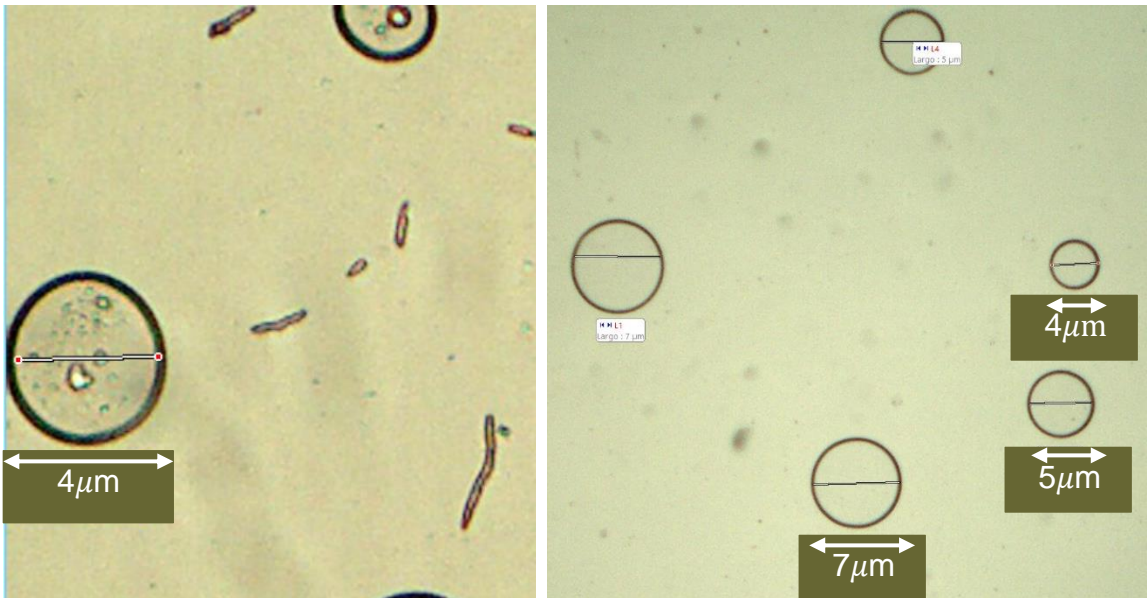


Fig. 37. Referencia de los diámetros de los protoplastos obtenidos en los ensayos de protoplastos.

En la Fig. 38. Se puede observar lo siguiente: **A.** Protoplastos del medio de cultivo sólido, **B.** Protoplastos con una filtración de dispersores celulares, **C.** Protoplastos con dos filtraciones: dispersores celulares y malla de nylon, y una centrifugación, **D.** Protoplastos con dos filtraciones: dispersores celulares y malla de nylon, y dos centrifugaciones, **E.** Protoplastos con dos filtraciones: dispersores celulares y malla de nylon, y tres centrifugaciones.

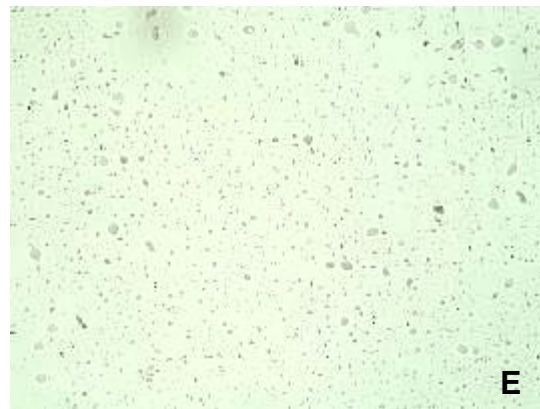
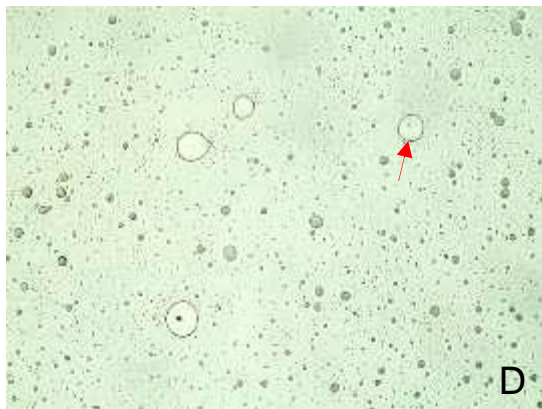
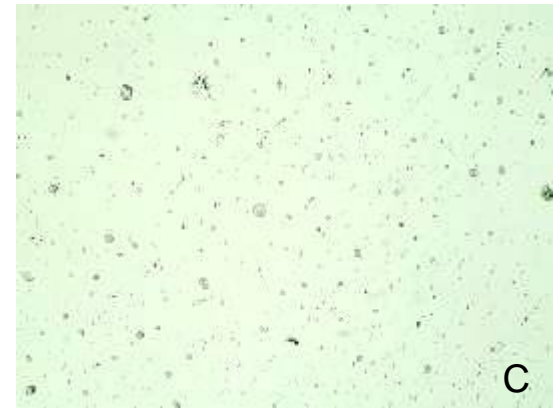
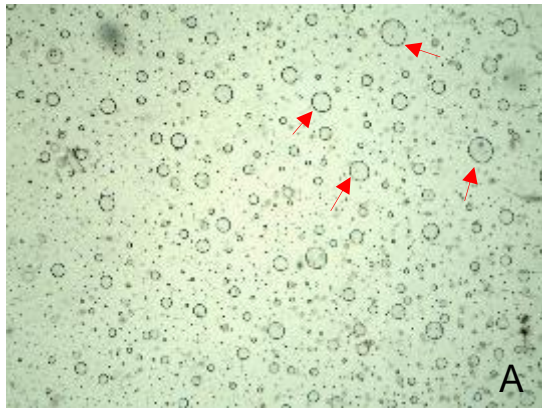


Fig. 38. Protoplastos obtenidos en el mismo día de siembra del medio de cultivo sólido.

En la Fig. 39 se observan las mismas fases, pero con el medio de cultivo líquido, se omitieron las fotos para la primera centrifugación y no se realizaron tres centrifugaciones ya que se observó que se perdían protoplastos: **A.** Protoplastos del medio de cultivo líquido, **B.** Protoplastos con una filtración de dispersores celulares, **C.** Protoplastos con dos filtraciones: dispersores celulares y malla de nylon, y dos centrifugaciones.

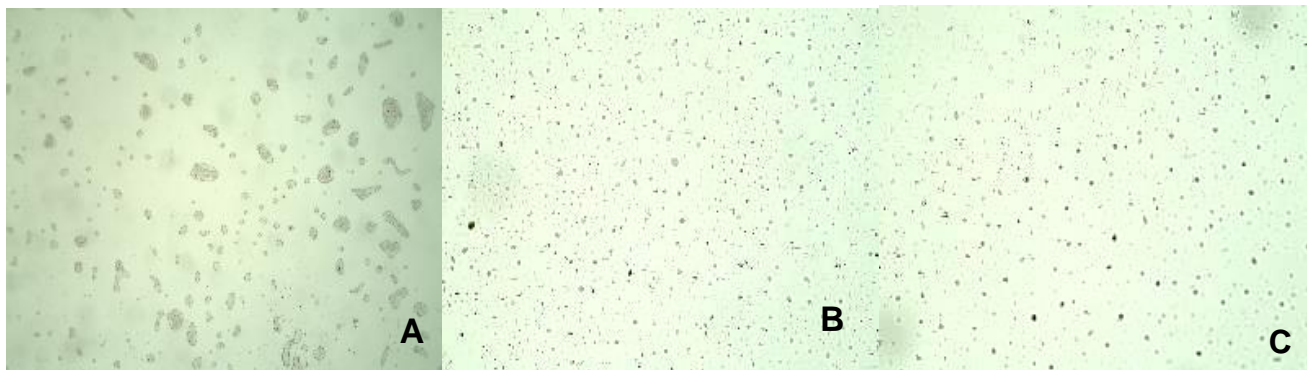


Fig. 39. Protoplastos obtenidos en el mismo día de siembra del medio de cultivo líquido.

5.3.1.2. Segunda etapa: División celular de los protoplastos y regeneración de las paredes celulares.

Cabe mencionar que se observó en la cuarta semana que algunas células ya empezaban a formar su pared, como se muestra en la Fig. 40, con fotos de células con pared con aumento 10 x después de 1 mes de la siembra, esto quiere decir que los protoplastos ya estaban formando su propia pared.

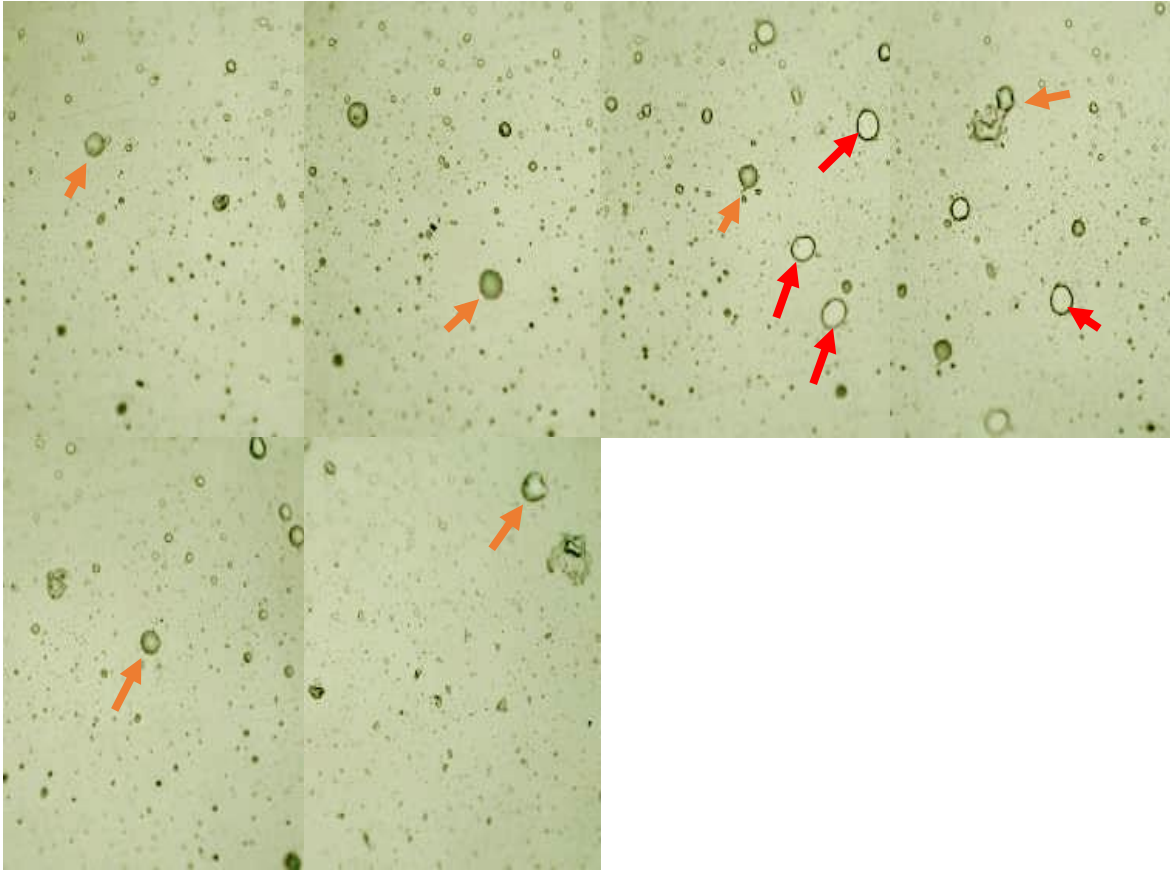


Fig. 40. Células con pared 10x después de 1 mes de siembra. Células con pared señaladas con flecha naranja.

5.3.1.3. Tercera etapa: Formación de microcallos y callos.

En la Fig. 41 se muestran los microcallos obtenidos 6 días después de la primera siembra de protoplastos: **A**. Microcallo del medio de cultivo sólido, **B**. Microcallo del medio de cultivo líquido.

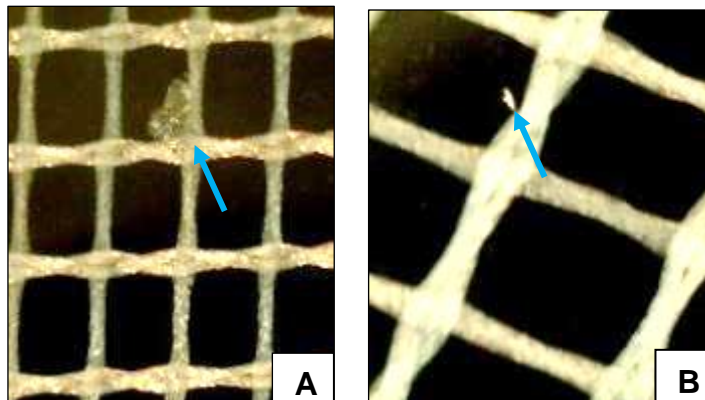


Fig. 41. Microcallos obtenidos 6 días después de la siembra. Señalados con flecha azul cielo.

En la Fig. 42 se muestran los microcallos obtenidos del medio de cultivo líquido y sólido dos semanas después de siembra de protoplastos: **A.** Microcallo líquido, **B.** Microcallo sólido.

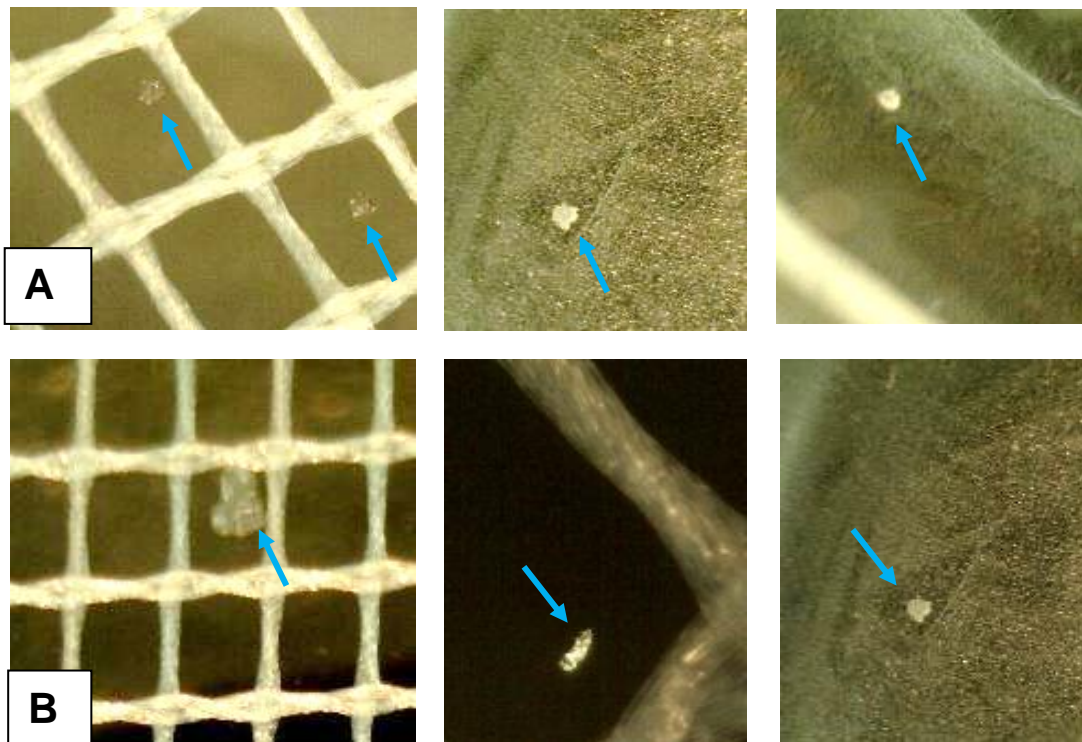


Fig. 42. Microcallos obtenidos del medio de cultivo líquido y sólido dos semanas después de la siembra.

En la siguiente sección se presentan fotos tomadas en microscopio óptico de células con pared con aumento 10 x, un microcallo con aumento 10 x y 40 x y posibles callos con aumento 10 x después de un mes de siembra, así como microcallos observados en el microscopio estereoscópico.

En la Fig. 43 se muestra un microcallo con aumento de 10 x y 40x y callo con aumento 10x un mes después de la siembra. **A.** Microcallo con aumento con 10x, **B-C.** Callo con aumento con 10x, **D.** Microcallo con aumento 40x.

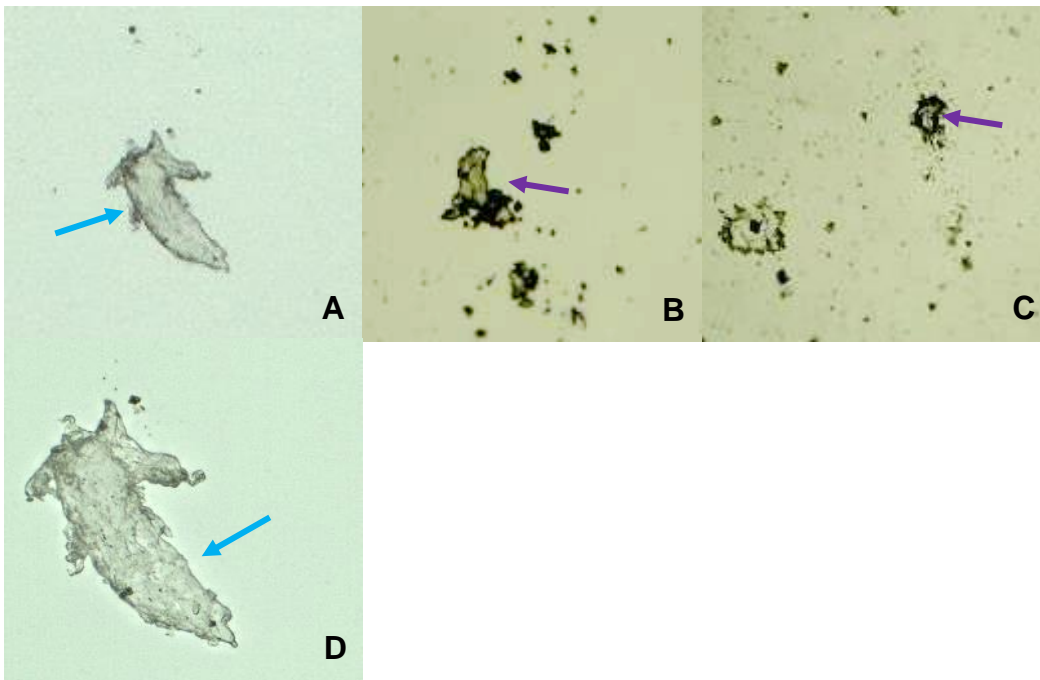


Fig. 43. Microcallo con aumento 10x y 40x y callo con aumento 10x un mes después de la siembra. Callos señalados con flecha morada.

En la Fig. 44 se muestran microcallos del medio de cultivo líquido después de un mes de siembra.



Fig. 44. Microcallos del medio de cultivo líquido después de un mes de siembra.

En la Fig. 45 se muestran los microcallos del medio de cultivo sólido.

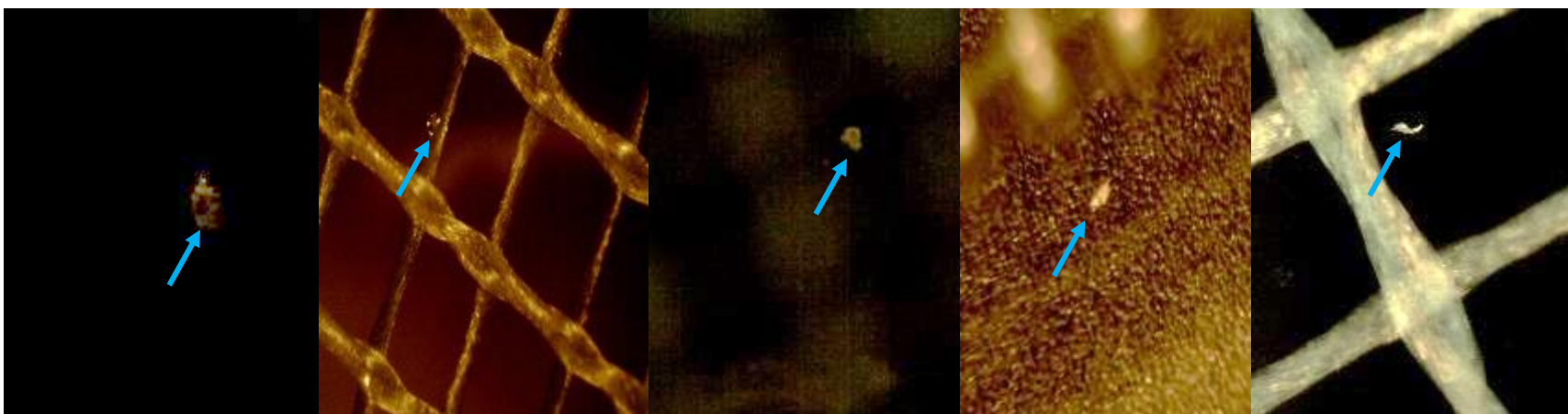


Fig. 45. Microcallos del medio de cultivo sólido después de un mes de siembra.

5.3.2. Resultados del segundo ensayo de protoplastos

5.3.2.1. Primera etapa: Obtención de protoplastos.

En la Fig. 46 se muestran las longitudes de diámetro de los protoplastos para el segundo ensayo de protoplastos. Para este ensayo se obtuvieron protoplastos de $1\ \mu\text{m}$ - $7\ \mu\text{m}$ siendo más ocurrente el diámetro de $3\ \mu\text{m}$.

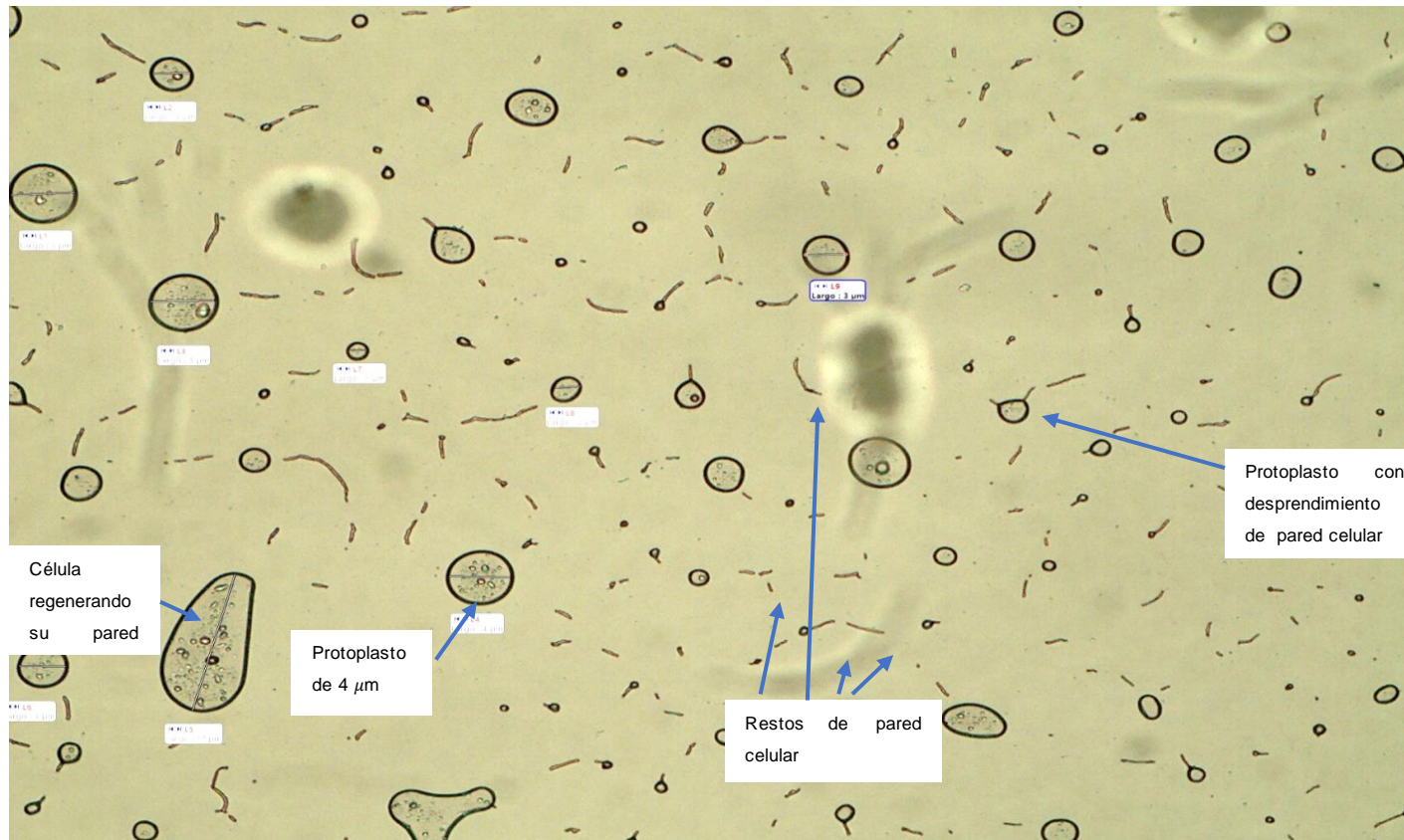


Fig. 46. Diámetros de los protoplastos obtenidos del segundo ensayo de protoplastos después de 1h con enzima en agitación y 24 h en refrigeración, tubo 1.

En la siguiente sección, se presentan protoplastos y microcallos del segundo ensayo de protoplastos. En la Fig. 47 se muestran protoplastos después de 1 h con enzima en agitación y 24 h en refrigeración, tubo 1 y 2. **A-B.** Tubo 1, **C-E.** Tubo 2.

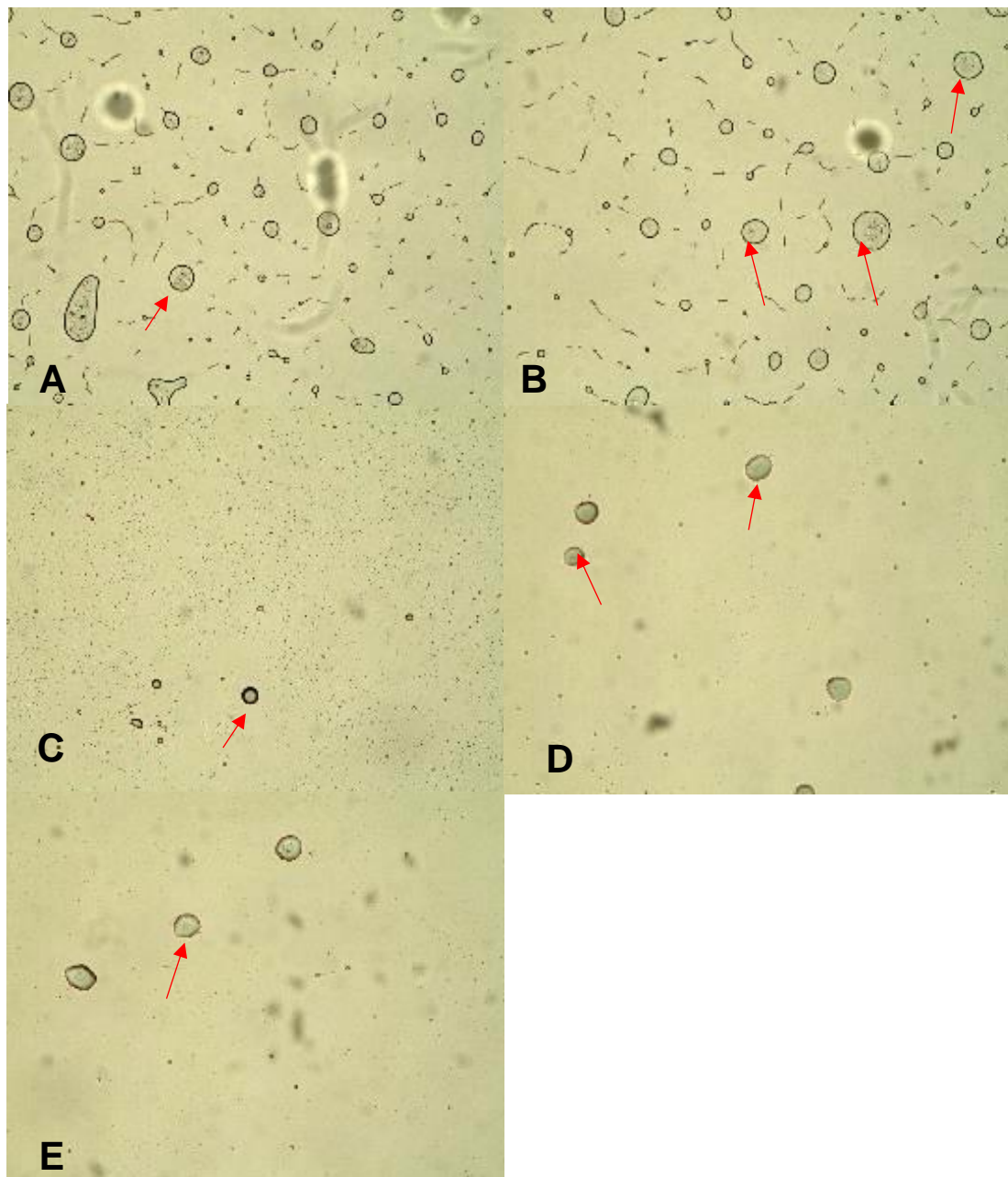


Fig. 47. Protoplastos después de 1 h con enzima en agitación y 24 h en refrigeración, tubo 1 y 2.

En la Fig. 48. Se muestran los protoplastos obtenidos de las cajas y frasco. **A-B.** Protoplastos después de 16 h con enzima Frasco, **C-D.** Protoplastos después de 16 h con enzima Caja 1 sin filtrar, **E.** Protoplastos después de 16 h con enzima Caja 2 sin filtrar.

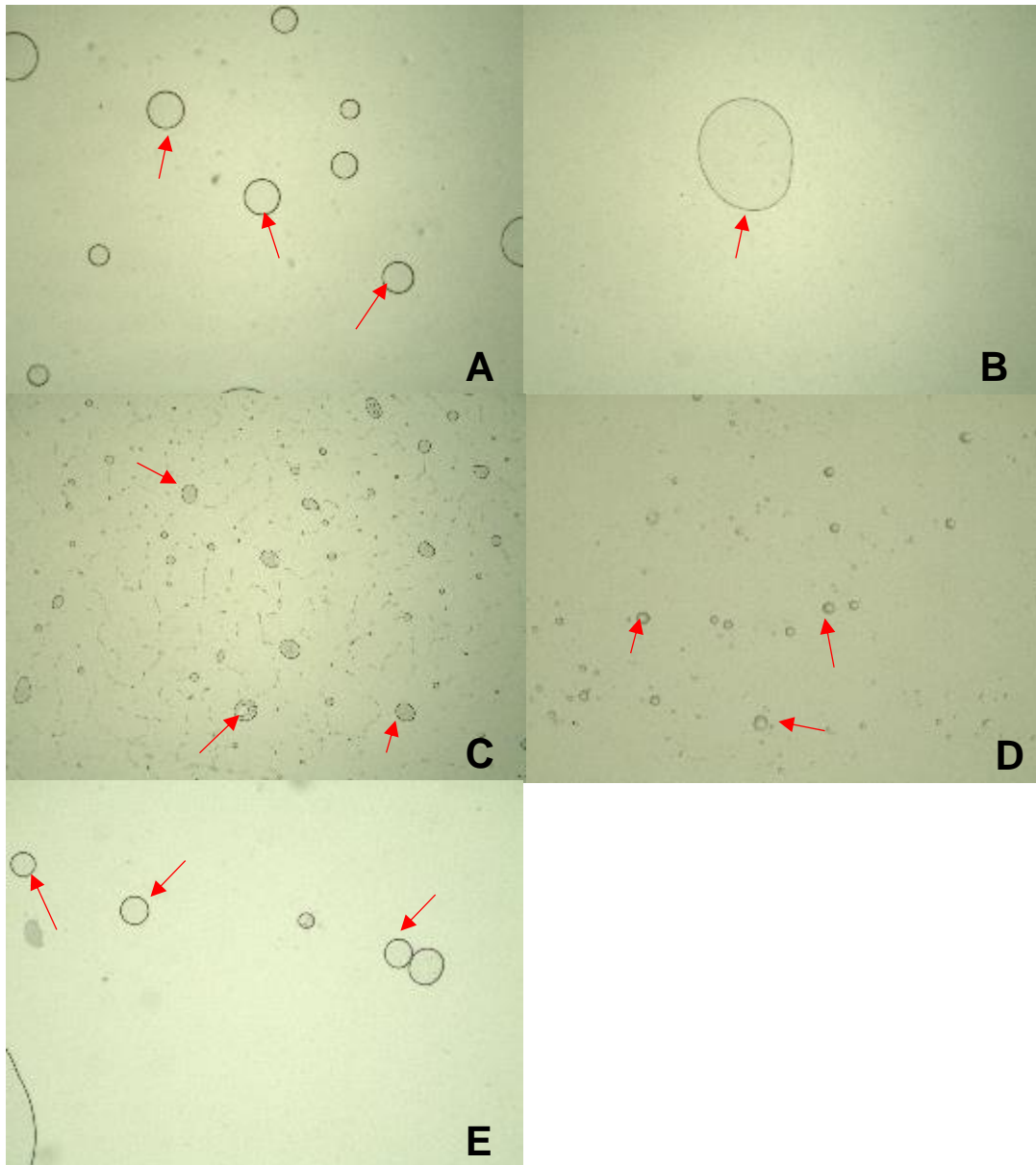


Fig. 48. Protoplastos de cajas y frascos después de 16 h.

5.3.2.2. Segunda etapa: División celular de los protoplastos y regeneración de las paredes celulares.

En la Fig. 49 se muestran células con pared celular y algunos protoplastos correspondientes al segundo ensayo de protoplastos.

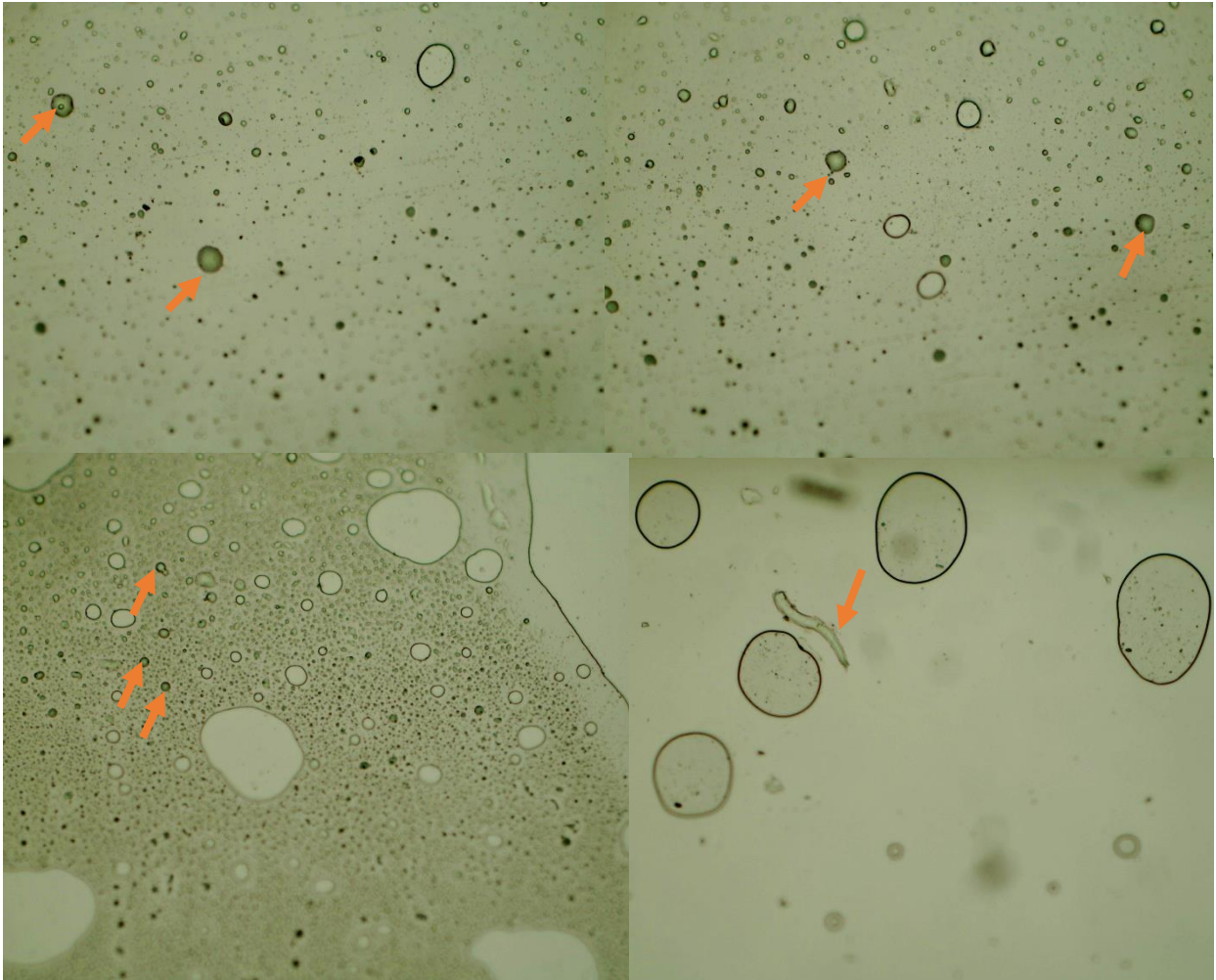


Fig. 49. Células con pared 10x después de 1 mes de la siembra. Células con pared señaladas con flecha naranja.

5.3.2.3. Tercera etapa: Formación de microcallos y callos.

En la Fig. 50 se muestran los microcallos obtenidos de los protoplastos generados por las dos cajas Petri que contenían láminas foliares sembradas en medio de cultivo sólido, en este ensayo no se utilizaron las láminas foliares sembradas en medio líquido ya que en el anterior ensayo se observaron muy pocos protoplastos y microcallos a comparación del medio de cultivo sólido. Fig. 50 se muestran los microcallos de las cajas 1 y 2 después de 8 días de la siembra. **A-B.** Microcallos caja 1, **C-E.** Microcallos caja 2. En este ensayo no se obtuvieron callos.

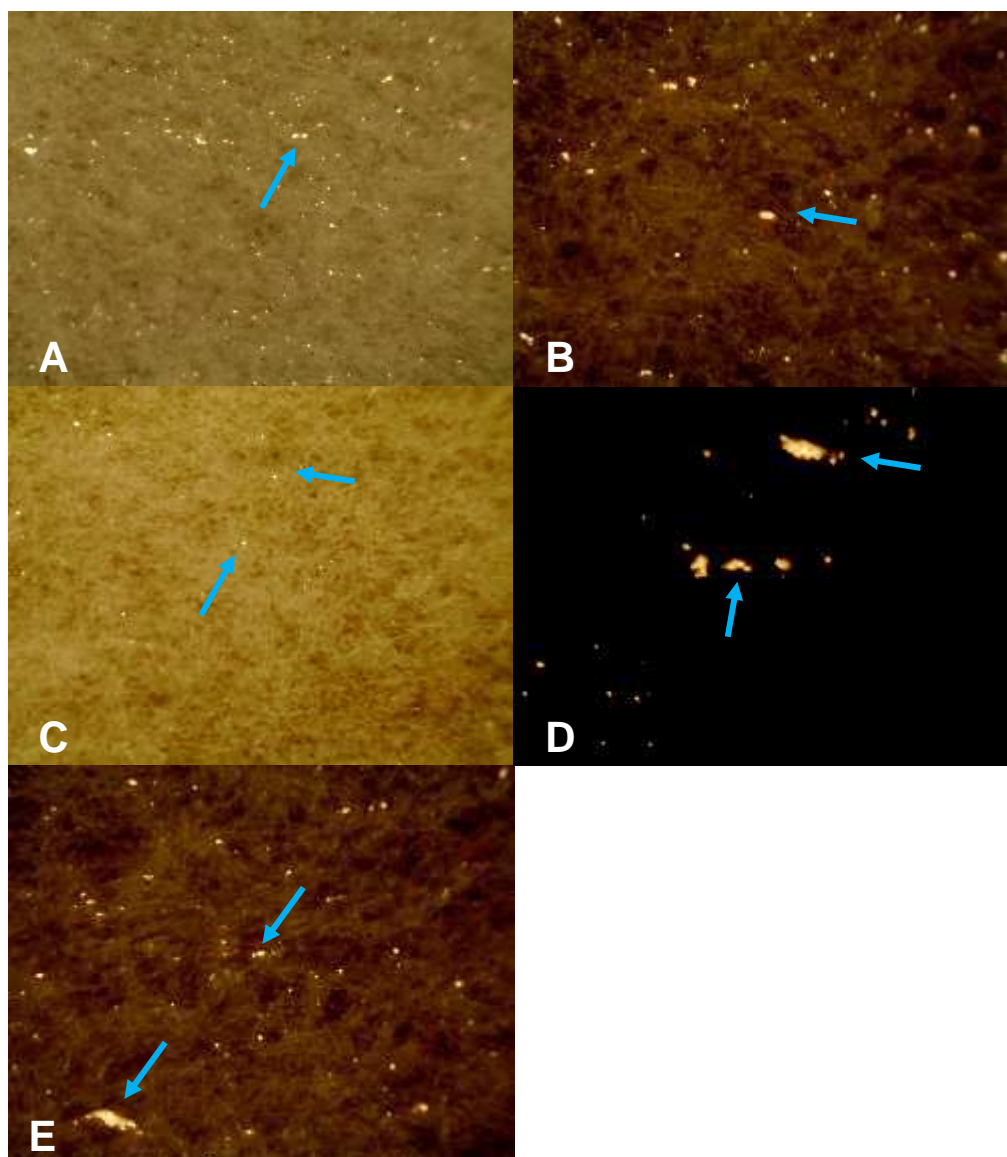
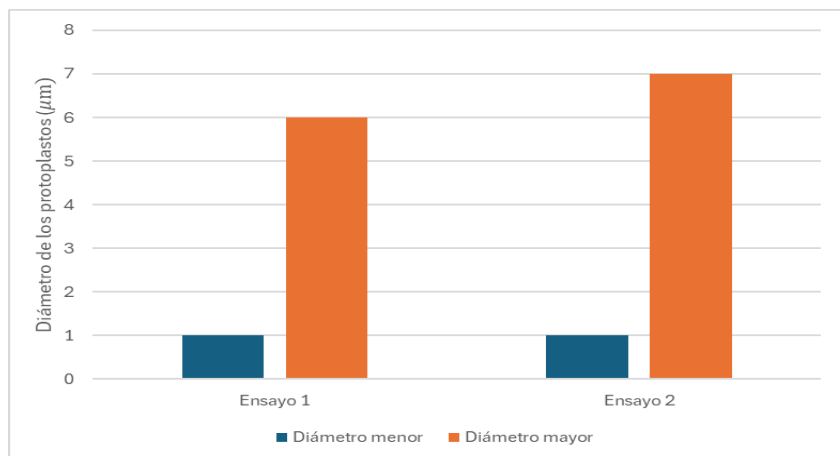


Fig. 50. Microcallos Caja 1 y 2 después de 8 días de la siembra.

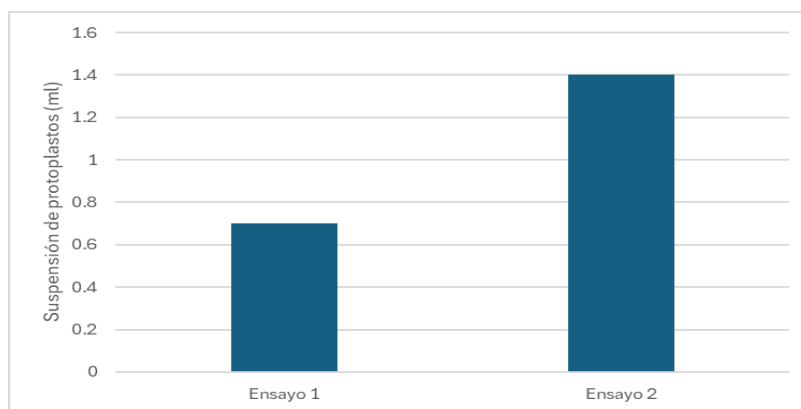
A continuación, se presentan las gráficas de los parámetros que se consideraron para evaluar la respuesta morfogénica de *Spathiphyllum sensation* con la técnica de protoplastos: diámetro promedio de los protoplastos y suspensión de protoplastos.

Los diámetros promedio de los protoplastos obtenidos en cada ensayo se muestran en la gráfica 4.



Gráfica 4. Diámetros promedio de los protoplastos obtenidos en los ensayos a partir de láminas foliares provenientes de medio sólido.

En la gráfica 5 se muestra la suspensión de protoplastos obtenida de cada ensayo de protoplastos.



Gráfica 5. Suspensión de protoplastos obtenidos en cada ensayo de protoplastos.

5.4. DISCUSIÓN

Las láminas foliares utilizadas para los ensayos provenían de los ensayos 4 y 5 presentados en el CAPÍTULO IV. Para obtener protoplastos, son varios factores importantes a considerar: la fuente del tejido usado para el aislamiento (hojas, suspensión de células, cotiledones o raíces); por lo que las láminas foliares mantenidas en medios sólidos resultaron un buen explante, la especie de planta y su variedad, en este trabajo, aun cuando no se contaba con información, se lograron obtener los protoplastos; mezcla de enzimas, en ambos ensayos se lograron obtener los protoplastos, por lo cual la mezcla de enzimas y los porcentajes probados fueron eficientes para lograr la separación de las paredes de las células, y otro factor que mencionan algunos autores es el estado fisiológico de la planta, por lo que mantener las plantas donadoras de explantes bajo un programa fitosanitario y de fertilización, permitió contar con tejidos jóvenes y en constante división celular (Power *et al.*, 1989).

Para lograr la obtención del aislamiento de los protoplastos, se utilizó un protocolo en el que intervinieron varios factores que se explicarán y discutirán a continuación.

Los principales factores que afectan el aislamiento de los protoplastos son la presión osmótica, la *concentración* enzimática y su combinación en la solución enzimática, así como el tiempo de exposición a las enzimas (Kantharajah y Dodd, 1990; Davey *et al.*, 2005, citados por Ren *et al.*, 2021).

Las hojas son comúnmente utilizadas como explantes en diferentes especies (Ren *et al.*, 2021; Kuzminsky *et al.*, 2016; Mota *et al.*, 2018; Abel y Theologis, 1994; Gandhi y Khurana, 2001). El uso de hojas jóvenes demostró en un estudio de (Ren *et al.*, 2021), una mayor viabilidad de protoplastos en comparación con la base de hojas maduras, flores, y puntas de raíces, sin embargo, el mesófilo de la hoja también es una buena fuente de protoplastos (Kuzminsky *et al.*, 2016; George y Sherrington, 1984), por lo que el uso de explantes de láminas foliares que provenían de hojas jóvenes para obtener protoplastos fue una buena alternativa.

Para la presión osmótica se utilizó un osmoregulador, el manitol, ya que regula el potencial osmótico evitando que pase el agua a través de la membrana celular al protoplasto y con ello no permite que las células se plasmolisen (Shoitiro, 1968), este osmolito fue utilizado a una concentración del 9%M para el establecimiento, 13%M para enjuague en el protocolo de obtención de protoplastos y hasta de 0%M en etapas en las que se inició la formación de las paredes celulares. Shoitiro, 1968 sostiene que la presencia del manitol en el momento del aislamiento y división de los protoplastos son necesarios para obtener íntegros los protoplastos. En ambos ensayos se observó la regeneración de las paredes celulares como se muestra en la Fig. 40, además se lograron dividir y formar microcallos, los cuales crecieron para obtener callos.

Con respecto a las concentraciones de las enzimas, éstas se mantuvieron en ambos ensayos de protoplastos como se puede ver en la Tabla 10, sólo se varió el volumen de medio CPW13M utilizado para la preparación de cada enzima. En ambos ensayos la Macerozyme R-10 se utilizó a una concentración de 20 g/l (2%), mientras que la celulasa fue de 5 g/l (0.5%). Al no contar con información previa y, al ver que en el primer ensayo se lograron obtener suficientes protoplastos, se tomó la decisión de variar las concentraciones de las enzimas, pero sólo en cuanto al volumen de medio CPW13M: en el segundo ensayo se utilizó 3g/50 ml para la celulasa y 12g/50ml para la Macerozyme R-10. La obtención de protoplastos, para el segundo ensayo, igualmente fue exitosa. La Macerozyme R-10 es una mezcla de celulasa (0.1U7mg), hemicelulasa (0.25U/mg) y pectinasa (0.5U/mg) que degradan los componentes de las paredes celulares. Algunos autores reportan concentraciones de las diferentes enzimas utilizadas para la obtención de protoplastos, algunos ejemplos son los siguientes: 1.5% celulasa, 0.05% Macerozyme R-10 (*Power et al.*, 1989), 1.2% celulasa, 0.6% Macerozyme (*Ren et al.*, 2021), 1 % celulasa R-10, 0.25% Macerozyme R-10 (*Abel y Theologis*, 1994), 1.5, 2.25 y 3% hemicelulasa, 0.5 y 0.75% pectinasa, 1 y 2% de celulasa (*Mota et al.*, 2018), 1 % celulasa R-10, 0.5% Macerozyme R-10 (*Gandhi y Khurana*, 2001), 2 % celulasa R-10, 1 % Macerozyme R-10 (*Kuzminsky et al.*, 2016). Al observar estas combinaciones y concentraciones se ve que la concentración de la celulasa está dentro de lo

reportado a excepción de la concentración que utilizaron (Mota *et al.*, 2018 y Kuzminsky *et al.*, 2016); mientras que en el caso de la Macerozyme R-10 la concentración está por encima de lo reportado en aquellos estudios que utilizan Macerozyme R-10, ahora, relacionando la concentración de la celulasa (porque la celulasa termina de separar el protoplasto del resto de la pared celular), y la concentración de la Macerozyme R-10 con el diámetro de los protoplastos obtenidos en ambos ensayos que se puede ver en las Fig. 36-37 y en la gráfica 4, que el uso de una concentración alta para la Macerozyme en ambos ensayos fue proporcional al número de protoplastos que se observaron. En las Fig. 46-48 se observa que el diámetro máximo que presentaban los protoplastos fue el de $7\mu\text{m}$ para el ensayo 2, y con un diámetro de $3\mu\text{m}$ en la mayoría de los protoplastos, incluso se observa que algunas células ya estaban formando su pared celular como se muestra en la Fig. 46, mientras que para el ensayo 1 se obtuvieron en su mayoría protoplastos con diámetro de $1\mu\text{m}$ hasta un diámetro máximo de $6\mu\text{m}$, igualmente se observó que cualitativamente el número de protoplastos es mayor en el ensayo 1 en comparación con el ensayo 2, el menor diámetro de los protoplastos se presentó en el ensayo 1. Estas diferencias entre los ensayos pueden deberse a la baja concentración de celulasa utilizada. Igualmente, de acuerdo a Mota *et al.*, 2018 sobre la base de sus resultados experimentales, el mejor tratamiento para obtener el mejor rendimiento fue de 1.5% hemicelulasa, 0.5% de pectinasa [la Macerozyme R-10 es un sistema enzimática constituido de altas actividades de hemicelulasa y pectinasa (PhytoTech Labs, 2024)], y 1% de celulasa, se nota que la concentración de la Macerozyme R-10 fue alta en comparación a la celulasa pero solo con una diferencia del 0.5%, estas concentraciones pueden servir para un posterior ensayo para conseguir una mayor viabilidad de protoplastos. Además, de acuerdo a la gráfica 5 se observa que en el ensayo 2 se obtuvieron mayor cantidad de suspensión de protoplastos ya que se agregaron en cada caja Petri 1.4 ml en comparación de los 0.7 ml agregados a cada caja Petri del ensayo 1 de protoplastos.

Aun cuando en el ensayo 2 también se sembró en cajas Petri conteniendo papel filtro, no se pudo tomar datos y analizar ya que los microcallos no se observaron bien.

Otro paso que es posterior a la preparación de enzimas, es la filtración, para ello se utilizaron dos mallas que se colocaron a los dispersores celulares, la primera utilizada fue una malla de 50 con $280\mu\text{m}$ de apertura de poro y la segunda una malla de 200 con $73.7\mu\text{m}$ de apertura de poro, y una filtración con bolsa de malla de nylon Rosin® Bag de $25\mu\text{m}$, comparando estos valores con lo reportado en la literatura que indican una filtración con malla de nylon de $0.22\mu\text{m}$ (Gandhi y Khurana, 2001), una filtración con malla de nylon de $60\mu\text{m}$ (Mota *et al.*, 2018), una filtración con malla de nylon de $50\mu\text{m}$ (Kuzminsky *et al.*, 2016), una filtración con malla de nylon de $150\mu\text{m}$: (Ren *et al.*, 2021), se observa que la apertura del poro de la malla utilizada con el primer dispersor celular está por encima de lo reportado mientras que la apertura del poro de la malla utilizada con el segundo dispersor celular y la bolsa está dentro de lo reportado, así que esto indica que la obtención de los protoplastos se logró utilizando tres mallas de distinta apertura, de mayor a menor. También se varió el número de filtros, en el ensayo 1 de protoplastos se utilizaron 12 filtros en comparación con los 6 filtros utilizados en el ensayo 2. De acuerdo con lo mostrado en las Fig. 38-39 se observan menos protoplastos obtenidos de LF procedentes de medio líquido, así como su diámetro de estos en el ensayo 1 es menor en comparación del ensayo 2 (gráfica 4), esto debido a que al filtrar se pueden perder a su vez protoplastos.

Otro factor que se varió en la obtención de los protoplastos fueron las centrifugaciones de 3 y 2 veces para los ensayos 1 y 2 respectivamente. En la literatura reportan que se realizan 2 centrifugaciones (Abel y Theologis, 1994; Kuzminsky *et al.*, 2016; Ren *et al.*, 2021), con sus excepciones como (Gandhi y Khurana, 2001; Mota *et al.*, 2018). Gandhi y Khurana, 2001 llevaron a cabo un protocolo similar al probado en esta investigación ya que coincidieron el número de centrifugaciones, sales usadas para el medio líquido (CPW) así como las enzimas utilizadas, lo que varió fue el tiempo de incubación en la solución enzimática y las rpm en las centrifugaciones, en este trabajo fue de 40rpm que a su vez no está lejos de lo reportado con la literatura en la que se utilizan 50 rpm para las centrifugaciones (Kuzminsky *et al.*, 2016; Abel y Theologis, 1994; Mota *et al.*, 2018), y de 30rpm de acuerdo a Ren *et al.*, 2021. La velocidad de agitación rpm utilizada en este protocolo

fue de 1000 rpm, con lo cual se observa que está por encima de lo reportado y por consiguiente es una razón por la que hubo diferencias en el número de protoplastos obtenidos ya que pudieron romperse o plasmolizarse en el proceso. Igualmente, en el ensayo 1 se realizaron 3 centrifugaciones con lo que se observó que afectó en el número de protoplastos obtenidos.

Sobre el tiempo de incubación de los tejidos en la solución enzimática éste fue de 16 h a 27°C en ambos ensayos. Al comparar con los valores reportados con otros trabajos en donde indican que el tiempo de incubación puede ser de 6 h a 28 °C (Ren *et al.*, 2021), 4h a 25°C (Kuzminsky *et al.*, 2016), 4 h (Mota *et al.*, 2018), 2.5 h a 22°C (Abel y Theologis, 1994), 24-26°C por 14 h (Gandhi y Khurana, 2001), se observa que el tiempo de incubación empleado está arriba del rango reportado, pero aun así se lograron obtener protoplastos en ambos ensayos. Ren *et al.*, 2021 encontró que un tiempo de digestión insuficiente provocó una liberación incompleta de los protoplastos, mientras que un exceso de incubación provocó la ruptura de los protoplastos, esta última situación pudo haber ocurrido en ambos ensayos y por lo tanto se pudieron haber obtenido más protoplastos.

No se pudo obtener el rendimiento de protoplastos (ver ecuaciones anexo 4), ya que no se contó con el dato de número de células en suspensión ni con el total del número de células porque no se contaron con el hemocitómetro (Power *et al.*, 1989), solo se contó con el dato de peso fresco utilizado en ambos ensayos de protoplastos el cual fue de 2 g, no se contaron con dichos datos ya que estos ensayos de protoplastos solo fueron una prueba para observar el comportamiento que tenía *Spathiphyllum sensation* al someterse a esta técnica y si funcionaba por consiguiente se reproduciría más veces, no obstante esta técnica sirvió para entender y conocer aún más esta especie y género, dado que no se obtuvieron los resultados esperados se indagó sobre las causas y una causa por la que no se pudieron regenerar plántulas a partir de cultivos de protoplastos es debido a que como se mencionó en la discusión del CAPÍTULO IV, la familia de las aráceas a la cual pertenece *Spathiphyllum* contiene cristales de oxalato de calcio en forma de rafidios, entonces estos cristales se acumulan en los protoplastos y debido a que

algunos se fracturan en el proceso de obtención de protoplastos, pueden perforar a los demás protoplastos (Pindel, 2007; Lin *et al.*, 2018, citados por Ren *et al.*, 2021), lo que representa otro factor limitante para el aislamiento de protoplastos afectando así el rendimiento de los mismos. Ren *et al.*, 2021 en su trabajo, encontró abundantes cristales de oxalato en forma de rafidios en la solución que contenía a los protoplastos, pero en una optimización posterior reveló que la adición de 2-mercaptoetanol contribuía a disminuir los rafidios de oxalato cálcico y aumentar el rendimiento y la viabilidad de los protoplastos, esta optimización también puede aplicarse para posteriores ensayos.

Es sabido que la viabilidad de los protoplastos no solo depende del aislamiento sino también de la posterior manipulación (Power *et al.*, 1989), para la posterior manipulación solo se disminuyó cada dos semanas la concentración de manitol en el medio líquido CPW de 9%M a 0%M, de acuerdo a la Tabla 13 del anexo 4. El manitol puede reducir la capacidad regenerativa. Así mismo, para el ensayo 1 se utilizó como soporte una malla de nylon de 14 μ m de apertura de poro en comparación con el papel filtro de 70 mm de apertura de poro utilizado para el ensayo 2, como se pudo observar en la Fig. 50 para este ensayo no se observaron muy bien los microcallos en comparación de las presentadas en las Fig. 44-45 del ensayo 1, esto se debe a que una apertura menor en el diámetro de poro retiene mejor los protoplastos y microcallos.

Finalmente, con respecto a la procedencia de las láminas foliares ya sea de medio sólido o líquido, los protoplastos provenientes del medio sólido dieron una mejor respuesta en comparación con las provenientes del medio líquido, esto se muestra en las Fig. 38, 41-42, 44-50, esto puede deberse a que el medio sólido contiene por más tiempo los nutrientes y en medios líquidos los componentes del medio están más disponibles y las células crecen más rápido, pero igualmente los oxalatos y otros compuestos oxidativos se dispersan en el medio líquido y por consiguiente se oxidan más rápido causando así que las láminas foliares no tuvieran la misma respuesta que las sembradas en el medio sólido, por ello en el ensayo 2 se eliminó la procedencia de los explantes del medio líquido.

CAPÍTULO VI: UTILIZACIÓN DE INFLORESCENCIAS INMADURAS PARA LA OBTENCIÓN DE EMBRIONES SOMÁTICOS

Spathiphyllum sensation demostró en los ensayos anteriores ser una planta recalcitrante por ello se implementó una nueva técnica: la embriogénesis somática y se puso en práctica con inflorescencias inmaduras; un tejido muy poco usado en el área de CTV. Mediante este tejido y esta técnica se logró obtener embriones, es decir, se regeneró la planta, y se espera que en un futuro se obtengan plántulas debido a que es un proceso tardado.

6.1 MARCO TEORICO

6.1.1. Embriogénesis somática.

Los estudios sobre la ES surgen desde hace más de 60 años, cuando en 1958 Steward (Steward *et al.*, 1958), produjeron embriones somáticos a partir de la proliferación de callo en la zanahoria, sin embargo, aún después de más de 60 años de investigación la transición de las células somáticas a un estado embrionario todavía no se ha esclarecido del todo.

La embriogénesis somática es un proceso por el cual células somáticas generan embriones somáticos, los cuales son parecidos a los embriones cigóticos, pero sin que haya habido fusión de gametos. Estos embriones, al germinar generan plantas genéticamente iguales a la planta madre (Etienne-Barry *et al.*, 2016).

Las células cultivadas *in vitro* se encuentran en un estado indiferenciado, mientras que los embriones somáticos de donde se pueden obtener nuevas plántulas se consideran en un estado diferenciado. Aun así, las células cultivadas tienen el potencial de diferenciarse en embriones somáticos, pero es un proceso más difícil debido a que los embriones cigóticos están cerrados con los óvulos, así que no es fácil estudiar el proceso de embriogénesis. La ES es una alternativa que facilita la

regeneración de plantas cuando la organogénesis no resulta eficiente, como es el caso de café (Fujimura, 2014).

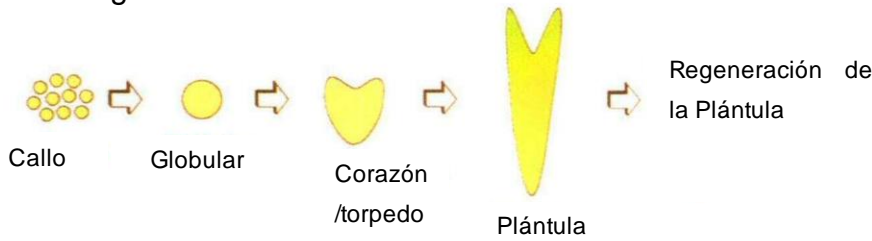
En la ES se originan estructuras pseudoembrionarias a partir de células somáticas (células que no forman parte de la línea germinal) (National Human Genome Research Institute [NHGRI], 2024), estas estructuras se desarrollan en embriones semejantes a los embriones cigóticos. Dichos embriones presentan dos polos: uno que generará el brote y el otro que generará la raíz (Von Arnold *et al.*, 2002), al desarrollarse los embriones somáticos pueden germinar y generar plántulas de manera similar a la germinación que ocurre con los embriones cigóticos.

Del mismo modo que la organogénesis, existen dos formas en las que se manifiesta la ES: indirecta o directa. En la forma directa los embriones somáticos se forman en la superficie del explante rico en zonas meristemáticas sin pasar por la formación de callo, para esta vía se usa comúnmente como explante embriones cigóticos inmaduros, raíces y hojas jóvenes, meristemos, entre otros; estos explantes por lo común son tejidos u órganos inmaduros, mientras que en la ES indirecta los embriones somáticos se desarrollan después de la proliferación de callo. Los embriones generados sobre explantes directamente o sobre el callo se denominan embriones somáticos primarios; y los embriones somáticos inducidos a partir de embriones somáticos primarios se denominan embriones secundarios/adventicios.

Los embriones en la ES y EC en las plantas dicotiledóneas pasan por cuatro estados: globular, corazón, torpedo y cotiledón (Zimmerman, 1993), como se puede observar en la Fig. 51.

Fig. 51. Comparación entre ES y EC. En la ES los embriones no experimentan la desecación ni la dormancia, en su lugar continúan creciendo hasta obtener una plántula completamente diferenciada.

Embriogénesis somática



Embriogénesis cigótica

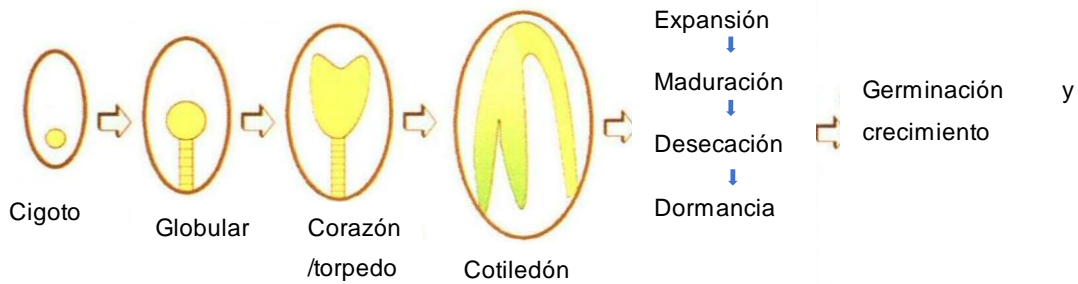


Fig. 51. Comparación de embriogénesis somática y cigótica (Tomado de Zimmerman, 1993 y traducido por Vieyra, 2023).

Spathiphyllum sensation pertenece a las plantas monocotiledóneas en las cuales los embriones pasan por tres estados: globular, escutelar y coleoptilar (Mujib *et al.*, 2016), su aspecto se muestra en la Fig. 52, estos resultados corresponden a Rodríguez *et al.*, 2015. **B.** Embriones somáticos en etapa globular, **C.** Embriones somáticos en etapa escutelar, **D.** Embrión somático en etapa coleoptilar avanzada.

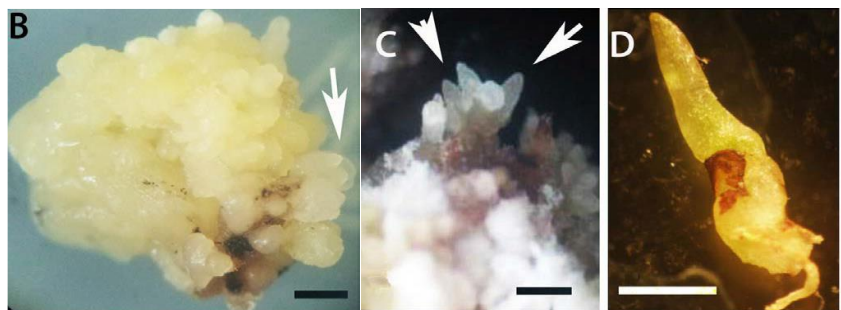


Fig. 52. Estados de los embriones en planta monocotiledónea (Tomado de Rodríguez *et al.*, 2015).

La ES se conforma de cuatro etapas: inducción, proliferación, maduración y germinación:

Inducción: Los embriones se encuentran en estado preglobular (Merkle *et al.*, 1995). En esta etapa al medio de cultivo ya sea MS o N₆ se le agrega una citocinina y una auxina fuerte, tal como el Dicamba o 2,4-D y generalmente la cantidad utilizada para modular la expresión genética es mayor que la citocinina.

Proliferación: Los embriones se encuentran en un estado más desarrollado por lo que se utilizan conjuntamente auxinas como 2,4-D, ANA, Dicamba y citocininas (BA) para la multiplicación de los embriones (Merkle *et al.*, 1995), pero se va reduciendo la concentración de la auxina.

Maduración: Surge la expansión de las células del embrión y acumulación de sustancias de reserva (Gómez, 1998). En esta etapa es necesario un alto contenido de nitrógeno en el medio de cultivo, esto se logra adicionando nitratos, aminoácidos y caseína hidrolizada (Merkle *et al.*, 1995), además se puede adicionar 1 mg/l de AG₃ (Ramírez, 2022).

Germinación/Conversión: Aquí los embriones somáticos maduros están bajo un medio de cultivo con bajas concentraciones de auxinas o con la remoción de estas, favoreciendo así el desarrollo meristemático de los brotes y raíces que ya formaban parte del embrión inmaduro (Merkle *et al.*, 1995).

6.1.2. Factores que influyen en la embriogénesis somática

Diversos elementos y factores clave rigen la embriogénesis somática en las plantas. Biológicos: genotipo y tipo de explante; químicos: sales inorgánicas, la fuente de azúcar/carbohidrato, aminoácidos, vitaminas, reguladores de crecimiento, y ambientales: como la calidad e intensidad de la luz, y la temperatura.

Entre los genotipos frecuentemente usados están los tejidos jóvenes tales como los embriones cigóticos y las partes germinadas de la planta como: hipocótilo, epicótilo y el cotiledón han demostrado ser muy eficaces para establecer cultivos embriogénicos en condiciones *in vitro* (Ramírez, 2022).

6.1.2.1. Medios de cultivo y reguladores de crecimiento

Los medios más usados son MS y N₆ cuyas concentraciones de sales se pueden consultar en el anexo 1. Las sales inorgánicas que forman parte del medio de cultivo tienen un efecto en la embriogénesis somática, en concreto la adición de nitrato en altas concentraciones al medio de cultivo junto con compuestos nitrogenados reducidos tales como sales de amonio; son esenciales para el adecuado crecimiento y diferenciación de embriones inmaduros (Hu y Wang, 1986).

El medio de cultivo necesita además de vitaminas y fuentes de azúcares: las mezclas de vitaminas MS son las más mencionadas en la literatura, y de acuerdo a lo reportado la adición de carbohidratos/azúcares externos en los medios aumenta la proliferación de las células y mejora la morfogénesis *in vitro*, incluida la embriogénesis somática. Los hidratos de carbono más utilizados en diferentes medios son la sacarosa y la glucosa. En varias plantas estudiadas, la sacarosa ha sido el único regulador de la inducción, maduración y germinación del embrión, lo que indica la importancia de la energía en la embriogénesis *in vitro*. En un estudio se observó previamente que el nivel de carbohidratos al 3% era más eficaz que la concentración superior (6%) y esto se aplicó a otros azúcares probados (Junaid *et al.*, 2006).

En cuanto a los reguladores de crecimiento se cuenta con citocininas y auxinas. La auxina mayormente elegida es el 2,4-D y se ha utilizado ampliamente para inducir embriones hasta los estados embriogénicos tempranos. En la mayoría de los informes publicados, el desarrollo embrionario se observó hasta las fases globular y acorazonada, también se sugiere que la remoción gradual del 2,4-D es esencial para la maduración de los embriones (Fehér, 2015; Gulzar *et al.*, 2021). Otras auxinas utilizadas para cumplir el mismo fin son el ANA, AIA, Picloram, Dicamba y TDZ. El mecanismo molecular por el que el 2,4-D desencadena la embriogénesis no es conocido (Ramírez, 2022), pero se sabe que puede inducir estrés en el cultivo (Fatima *et al.*, 2011; Maqsood y Mujib, 2017), y las células vegetales cultivadas producen embriones somáticos en respuesta a condiciones adversas de estrés celular (Fehér, 2015; Mujib *et al.*, 2020).

La Fig. 53 muestra el efecto de la concentración de las auxinas.

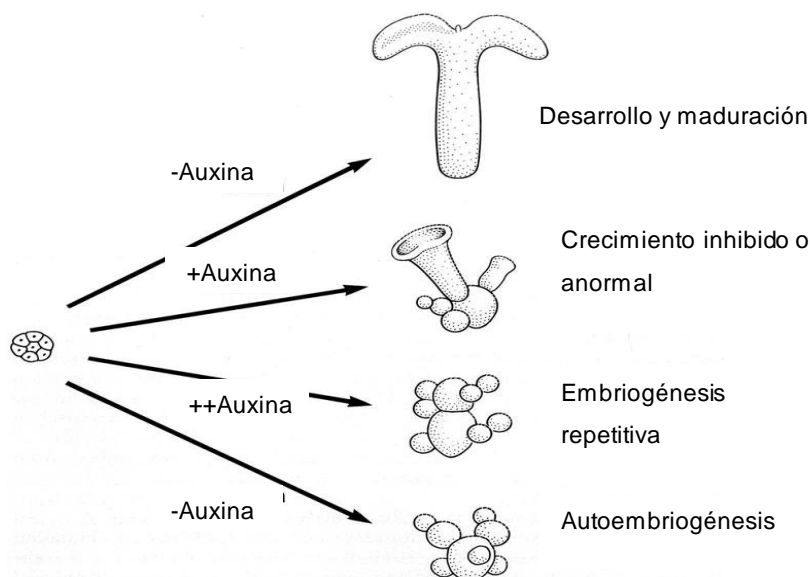


Fig. 53. Rol de la auxina durante la embriogénesis (Tomado de Merkle et al., 1995 y traducido por Vieyra, 2023).

Entre las citocininas utilizadas frecuentemente en los medios de cultivo están BA, Kn, 2-ip y la Zeatina (Ramírez, 2022). En un estudio se demostró que la citocinina es igual de importante que la auxina en el desarrollo del meristemo apical de raíz (Su, 2002).

Los aminoácidos también son fundamentales para el desarrollo de los embriones somáticos, los más comunes son: L-prolina, alanina, glutamina, adenina y caseína hidrolizada. La L-prolina en el CTV tiene la función de almacenamiento de nitrógeno reducido (Britikov *et al.*, 1970, citados por Armstrong y Green, 1985). En un estudio se demostró que al aumentar la concentración de L-prolina se incrementó el porcentaje de producción de embriones somáticos de 0% a 23% a una concentración de 25 mM de L-prolina (Armstrong y Green, 1985). En el caso de la adenina también se demostró en un estudio que a una concentración de 80 mg/l aumentaba la producción de embriones somáticos todo dependiendo de la concentración de la citocinina utilizada (Tomiczak *et al.*, 2019). La caseína hidrolizada ha sido utilizada para aumentar el crecimiento de callos embriogénicos y la embriogénesis somática en varias especies de plantas (Hegazy *et al.*, 2009;

Khayri, 2011 citados por Khierallah y Hussein, 2013), así mismo de acuerdo a Khierallah y Hussein, 2013, la caseína hidrolizada produjo los mayores pesos fresco y seco de callo embriogénico y aumentó el número de embriones globulares a una concentración de 2 g/l.

6.1.2.2. Luz

Los requerimientos de luz dependen de la especie sin embargo se ha observado que la luz roja (660 nm) y verde (540 nm) favorece la inducción de embriones somáticos, mientras que la luz azul (480 nm) la inhibe (Torné *et al.*, 2001). En un estudio se evaluó la duración de varios regímenes de luz en callos embriogénicos de *Catharanthus* y observaron que el rango de luz de 8-16 h era más eficaz para la rápida proliferación de embriones, mientras que un período de luz superior a 16 h impactó la embriogénesis con más anomalías embrionarias (Junaid *et al.*, 2008, citados por Ramírez, 2022).

6.1.2.3. Temperatura

La temperatura no es un factor crítico en la embriogénesis somática, aunque no debe exceder los límites de 20 a 35°C para el cultivo de tejidos en general y se considera una temperatura óptima de 30°C (Leathers y Scragg, 1989).

6.2 MATERIALES Y MÉTODOS

6.2.1. Material Biológico

En la Fig. 54 se muestra el esquema cronológico de las inflorescencias utilizadas.

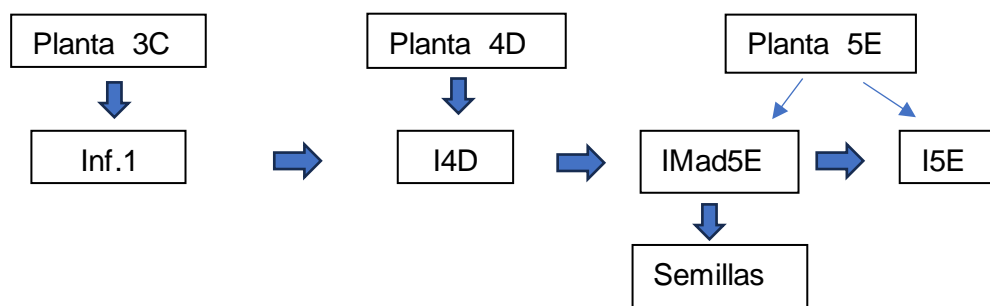


Fig. 54. Esquema del surgimiento de inflorescencias de plantas 3C-5E.

Se utilizaron tres inflorescencias inmaduras de las plantas 3C, 4D y 5E para obtener los embriones somáticos. Como se muestra en la Fig. 67.

En la Fig. 55 se presentan las inflorescencias inmaduras utilizadas para la obtención de embriones somáticos: **A**. Inf.1. Planta 3C, 1 mes de emergencia (a mediados abril de 2023), 2 cm de longitud, **B-C**. Inflorescencia planta 4D, 2 meses de emergencia (Inicios mayo 2023), 9 cm de longitud, **D-E**. Inflorescencia planta 5E, 2 meses de emergencia (Inicios octubre 2023), 11 cm de longitud.

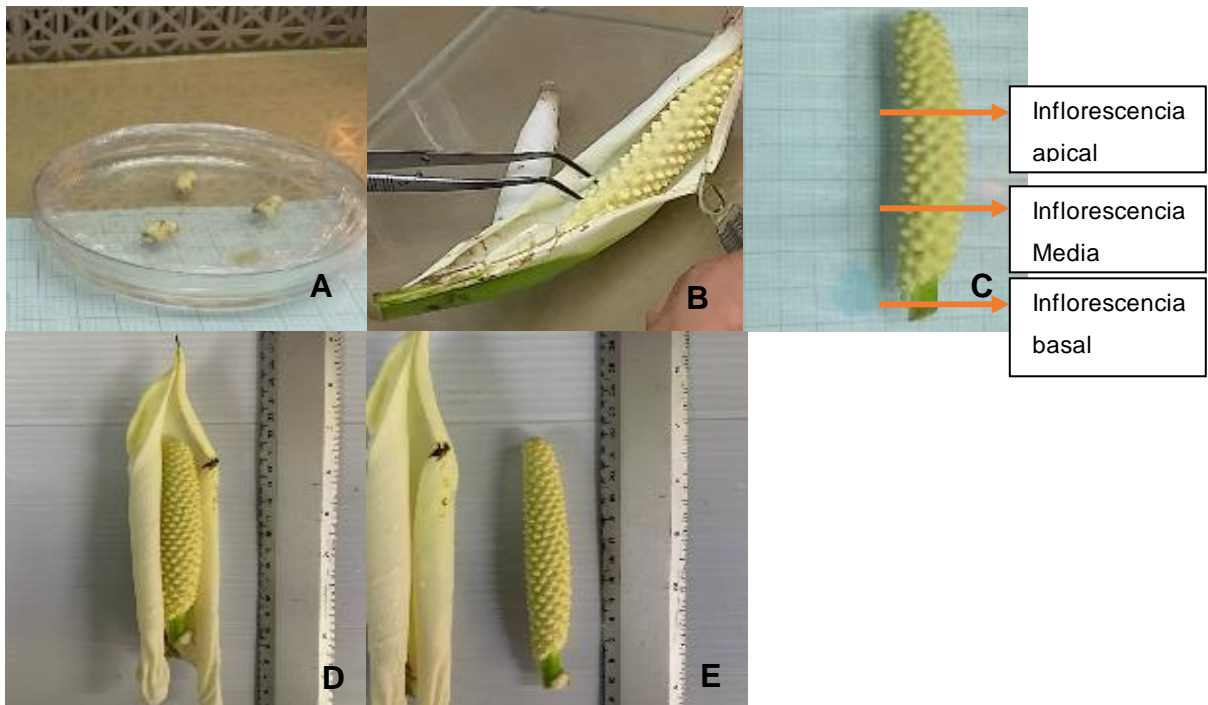


Fig. 55. Inflorescencias inmaduras usadas para embriogénesis somática.

En la Fig. 56 se presenta el proceso de transformación de la inflorescencia utilizada para aislar flores inmaduras: **A**. Inflorescencia a 1 mes de emerger (junio 2023), **B**. Inflorescencia a 2 meses de emerger (julio 2023), **C**. Inflorescencia a 2 meses de emerger 19 días (agosto 2023), **D-E**. Inflorescencia a 2 meses de emerger 24 días (agosto 2023).

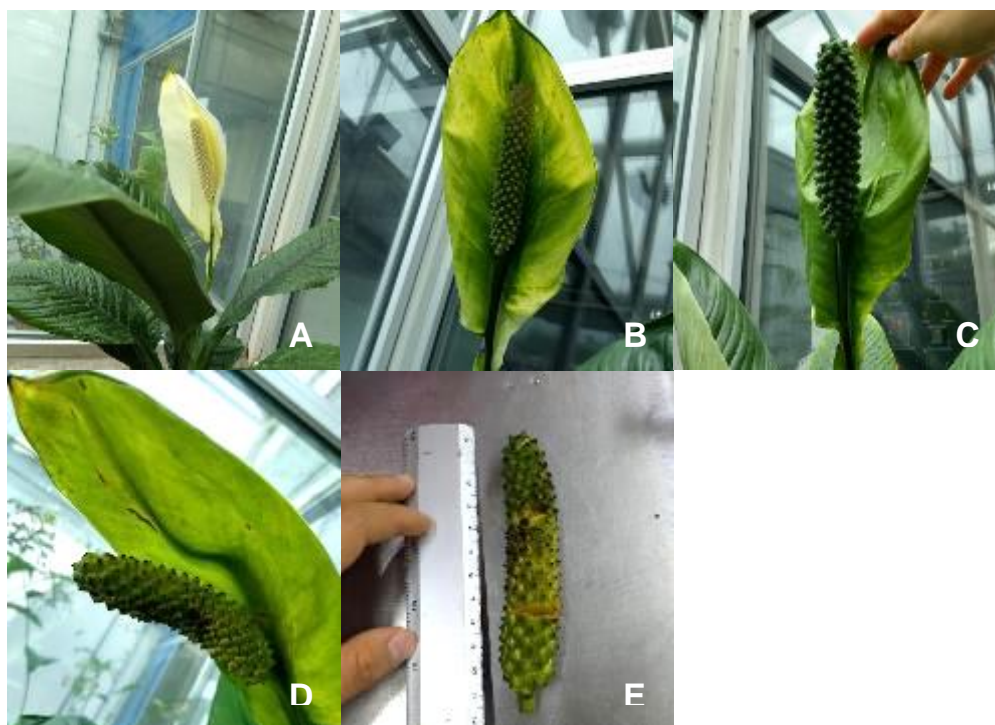


Fig. 56. Inflorescencia madura planta 5E utilizada para aislar semillas inmaduras.

6.2.2. Métodos de desinfección de inflorescencias/frutos/semillas

1. Desinfección flor-inflorescencia

Aunado a que no se obtuvo mucha respuesta de los diferentes explantes provenientes de la planta madre tales como: lámina foliar, rizoma, ápice, lígula, nervadura central, se empezó a añadir 3 mg/L de AG₃ al programa de fertilización previamente ya empleado, dicho riego se realizaba una vez por semana para inducir la diferenciación de la inflorescencia, esta solución de riego se empezó a implementar desde el 30 de enero de 2023. La primera inflorescencia procedente de la planta 3C se obtuvo aproximadamente 10 semanas después que se empezó dicho programa y se caracterizó por ser una inflorescencia inmadura. La segunda inflorescencia procedente de la planta 4D se dejó madurar más y dicho estado se obtuvo aproximadamente 12 semanas después de emplear el programa de riego antes mencionado, finalmente la inflorescencia de la planta 5E se obtuvo aproximadamente 16 semanas después de emplear el programa de riego con AG₃, pero esta inflorescencia se dejó madurar hasta obtener los frutos maduros para

aislar sus semillas. Una última inflorescencia surgió 36 semanas después de esta misma planta.

Para las inflorescencias inmaduras de las plantas 4D y 5E, se siguió el siguiente protocolo de desinfección:

1. Cortar la flor desde el tallo.
2. En campana transferirlo a un frasco de 1L con la solución de jabón, dejarlo 5 minutos en agitación.
3. Sin enjuagar transferirlo a un frasco de 1L con la solución de NaClO comercial al 10% (v/v), dejarlo 10 minutos en agitación.
4. Hacer tres enjuagues con agua deionizada estéril.
5. Separar inflorescencia de tallo y láminas foliares (dejar tallo y láminas foliares en agua estéril).
6. A la inflorescencia transferirla a un frasco de 1 L con solución de NaClO comercial al 3% (v/v), dejarlo en agitación 5 minutos.
7. Decantar y enjuagar 3 veces con agua deionizada estéril.
8. Sembrar explantes de 1 cm en medio N₆P (ST-I) alternando la parte externa e interna de la inflorescencia entre cada frasco.
9. Dejar los explantes en oscuridad.

En la Fig. 57 se muestra el proceso de desinfección de la inflorescencia de la planta 4D: **A.** Planta *ex vitro*, **B.** Planta en laboratorio antes de cortar espata, espádice y pedúnculo, **C.** Corte de la inflorescencia más pedúnculo de aproximadamente 40 cm, **D.** Inflorescencia y espata después de protocolo de desinfección, justo antes de aislarla, **E.** Inflorescencia y espata aisladas, **F.** Espata y pedúnculo en antioxidante después de protocolo de desinfección, **G.** Inflorescencia sembrada, **H.** Láminas foliares de la flor sembradas, **I.** Lígulas de la flor sembradas.

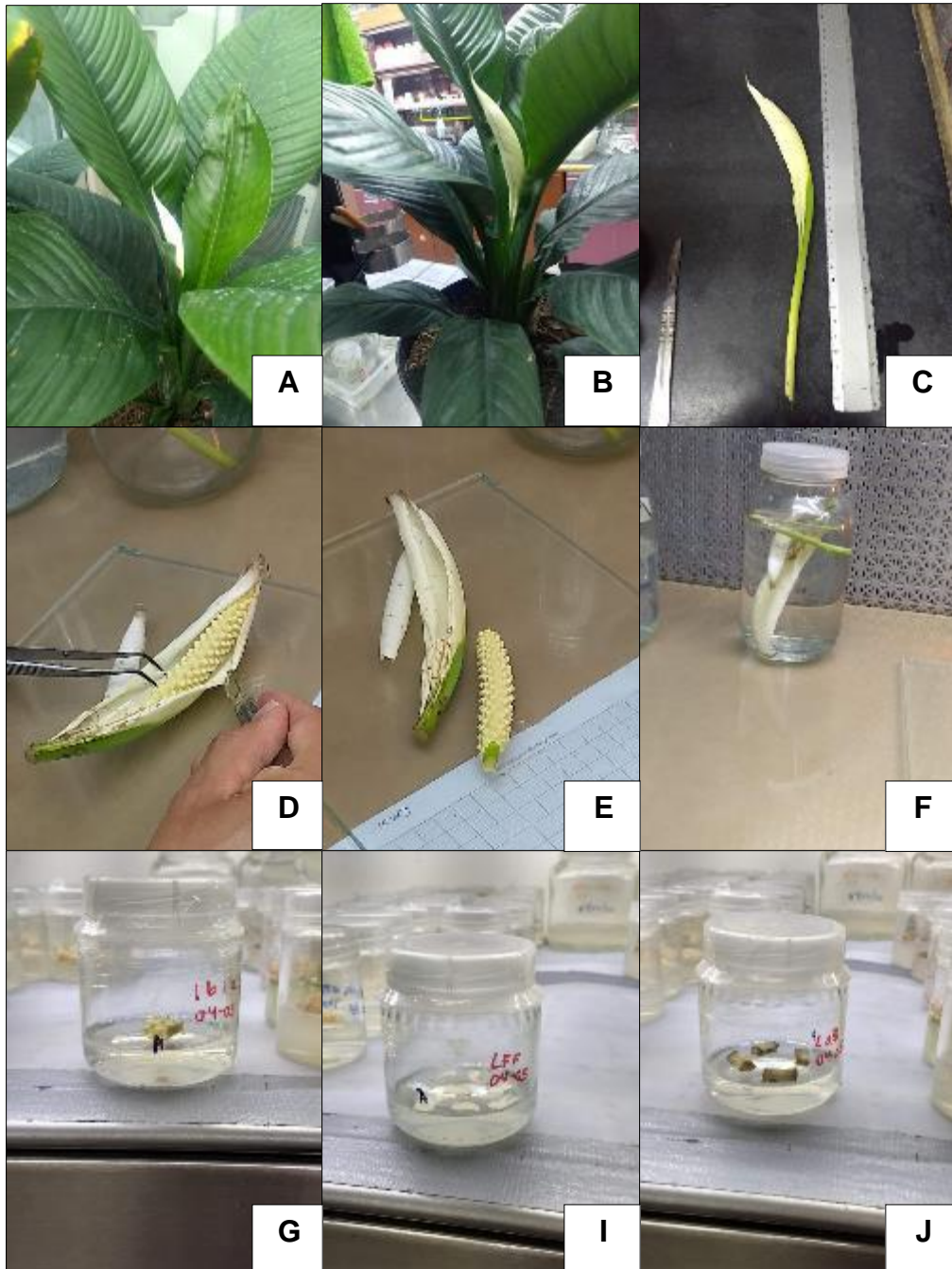


Fig. 57. Proceso de desinfección inflorescencia 4D.

2. Método de desinfección de frutos de *Spathiphyllum sensation*

De la inflorescencia madura de la planta 5E se desinfectaron los frutos de la siguiente forma para aislar las semillas y posteriormente sembrarlas:

1. Se corta la inflorescencia en el invernadero.
2. Se separan los frutos de la inflorescencia y al separar se clasifican en apicales, medios y basales.
3. Se lavan con agua corriente y jabón durante 10 minutos.
4. Se colocan en envase estériles separados los frutos por sección.
5. En la campana de flujo laminar se pasan a un vaso estéril y se les añade alcohol al 70% y se mantienen durante un minuto con agitación suave.
6. Después se decanta el alcohol y se enjuagan 2 veces con agua deionizada estéril.
7. Se les agrega NaClO comercial al 30% (v/v) + 15 g/ 250 ml microdyn® + 1 gota/250 ml Tween®-20 y se dejan en agitación constante y suave durante 10 minutos.
8. Se enjuagan 3 a 4 veces con agua deionizada estéril.
9. Se enjuagan con Captán durante 15 minutos, posteriormente se decanta.
10. Se enjuagan 3 veces con agua deionizada estéril.
11. Se enjuagan con Agri-mycin 500 durante 15 minutos, posteriormente se decanta.
12. Se enjuagan 4 veces con agua deionizada estéril.
13. Cada fruto se abre dentro de una caja Petri estéril todas las semillas de los frutos de cada sección se juntan en una caja Petri con antioxidante más antibióticos (cefotaxima, amoxicilina, vancomicina y Terbinafina) y se siembran en medio N₆P o medio ST-C (inducción de callo).

En la Fig. 58 se muestran algunos pasos del proceso de desinfección de los frutos de la IMad5E.

Fig. 58. Proceso desinfección IMad5E: **A.** IMad5E en el laboratorio antes de lavarla con agua y jabón, **B.** IMad5E seccionada en parte apical, media y basal, **C.** En

campana: secciones de I Mad5E en vasos de precipitados para enjuague con solución de NaClO, D. Semillas aisladas de I Mad5E.

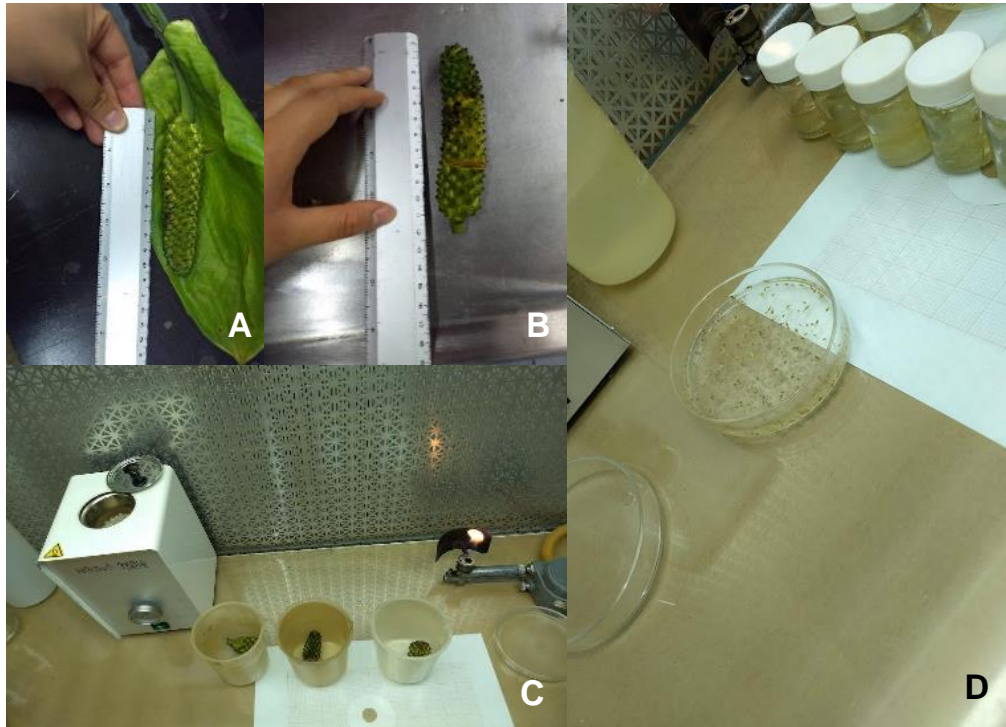


Fig. 58. Proceso de desinfección I Mad5E.

6.2.3. Medios de cultivo para la obtención de embriones somáticos

En la tabla 13 se muestra la composición de los medios de cultivo utilizados para la obtención de embriones somáticos. A partir del quinto subcultivo se redujo la concentración de Dicamba a la mitad.

Tabla. 13. Medio de cultivo para obtención de embriones somáticos (1).		
Medio	ST-I	ST-C
Componentes		
Sales B5 I- V		100%
Sales N₆ I- V	100%	
L-cisteína		1g
Glicina		2mg
Adenina	1mg	
Caseína Hidrolizada	200mg	100 mg en caso de reducir el Dicamba
Vitamina R2		1mg

Cock-20 (ml)	10	
2,4-D	2mg	
ANA		1mg
Dicamba		5mg
BA	0.3mg	0.5mg
Sacarosa		30g
pH		5.7
Gelzan		3.5g
Cefotaxima		250mg

6.3. RESULTADOS

6.3.1. Resultados de la inflorescencia de la planta 3C

En la Fig. 59 se muestra la respuesta de la inf.1: **A.** Siembra de Inf. 1, 0 días, **B.** Inf. 1 8 días después de la siembra, **C.** Inf. 1 28 días después de la siembra, **D.** Inf. 1 2 meses después de la siembra, **E.** Inf. 1 3 meses después de la siembra, **F.** Inf. 1 4 meses después de la siembra (ST-C 50%D), **G-I.** Inf.1 7 meses y 18 días (ST-C 25%D), **J-Ñ.** Inf.1 7 meses y 25 días (ST-C 0%D).

Los embriones somáticos se indican con una flecha roja, los frutos se indican con una flecha negra, el callo se indica con una flecha blanca, las estructuras pseudoembrionarias se indican con una flecha naranja y las hojas se indican con una flecha azul.

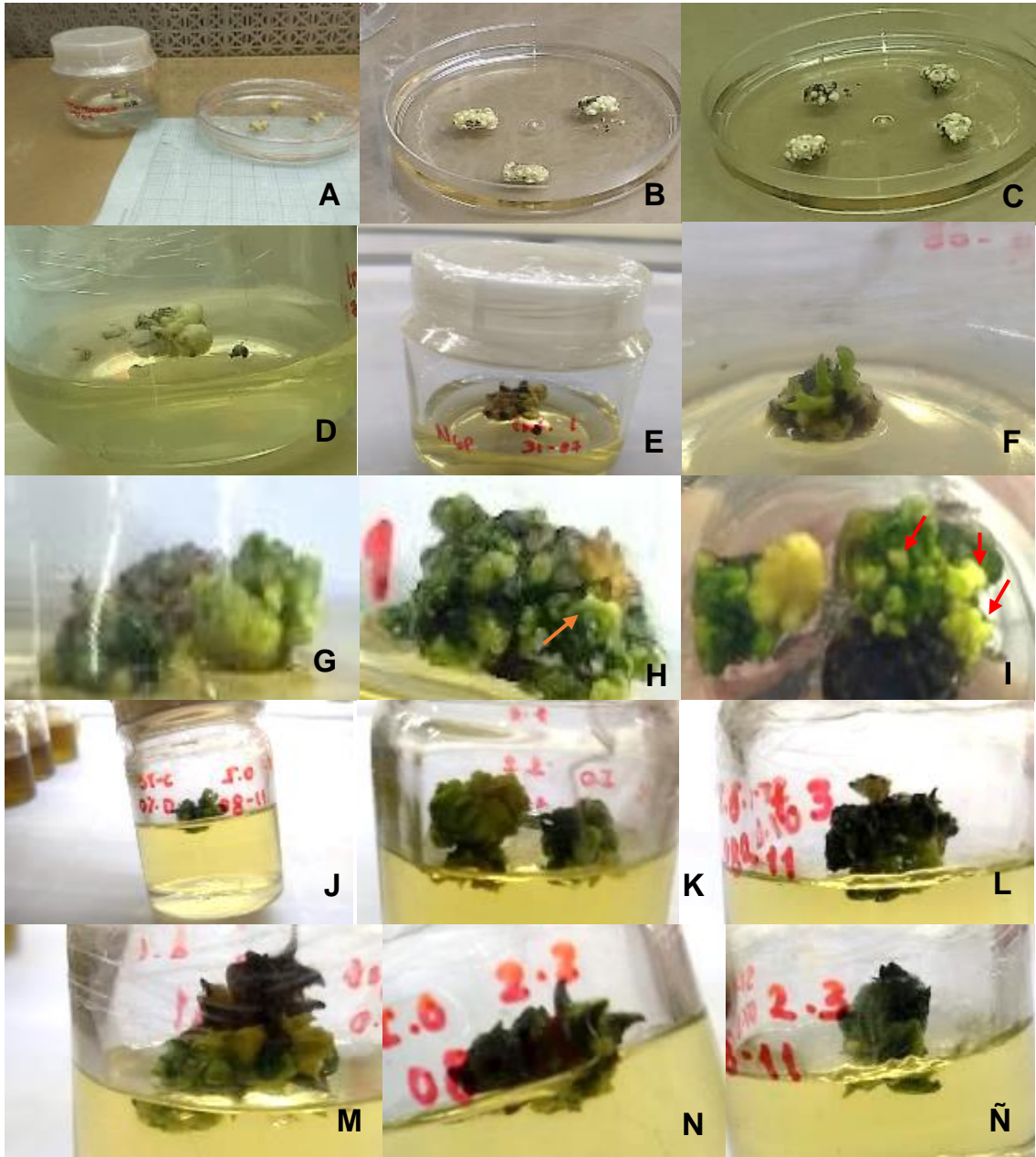


Fig. 59. Respuesta de la Inf.1.

En la Fig. 60 se muestran las fotografías tomadas con microscopio estereoscópico de la Inf.1. 2 meses después de la siembra. Se percibe callo y algunos embriones.



Fig. 60. Respuesta de la Inf.1 después de dos meses de siembra en medio ST-I.

En la Fig. 61. Se muestra la respuesta de la Inf.1 dos meses después de la siembra: **A.** Hoja, **B-D.** Fruto

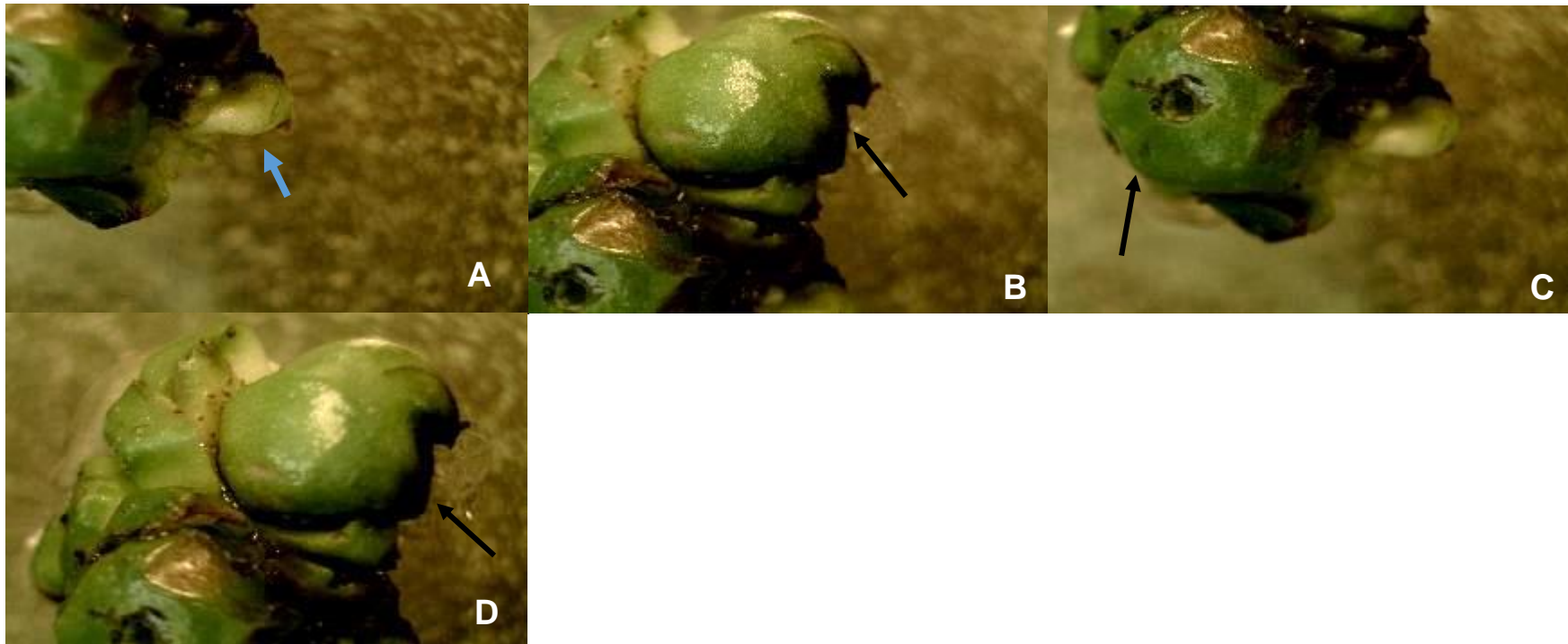


Fig. 61. Respuesta de la Inf.1 después de dos meses de siembra en medio ST-I.

6.3.2. Resultados de la inflorescencia de la planta 4D

En la Fig. 62 se muestra la respuesta de la I4D: **A.** I4D después de 13 días de la siembra, **B-D.** I4D después de 1 mes de siembra, **E.** I4D después de 1 mes de siembra y 9 días, **F.** I4D después de 1 mes de siembra y 16 días, **G-I.** I4D después de 2 meses y 20 días de siembra.

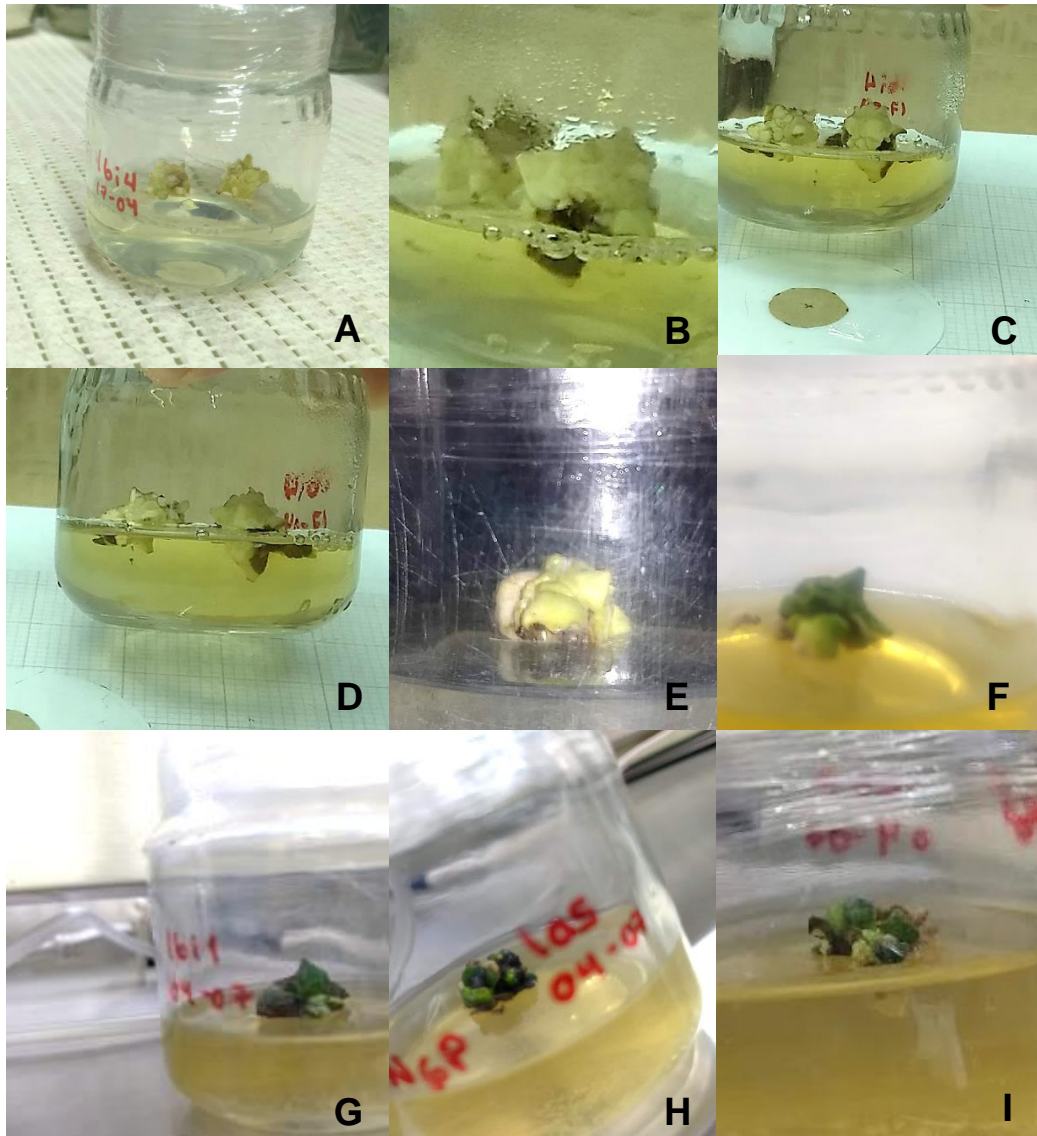


Fig. 62. Respuesta de la I4D en medio ST-I.

Algunos explantes sobre todo de la planta 4D respondieron más ya que se formaron muchas estructuras pseudoembrionarias como se puede observar en la Fig. 63: **A.** IA4D después de 2 meses y 26 días después de la siembra, **B.** IA4D después de 3 meses después de la siembra, **C-D.** IA4D después de 4 meses después de la siembra (ST-C 100%D), **E.** IA4D después de 7 meses después de la siembra (ST-C 25%D).

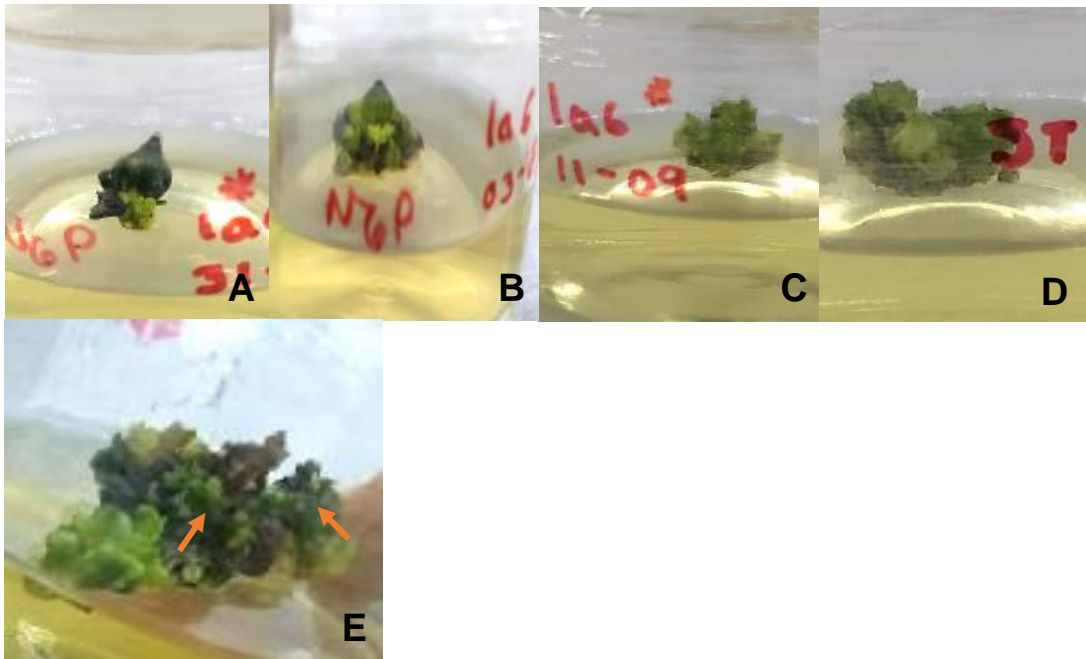


Fig. 63. Respuesta de la I4D en medio ST-C.

Se observó que los explantes también presentaron cúmulos de embriones somáticos por debajo del explante como se puede observar en la IA4D de la Fig. 64: **A.** IA4D después de 3 meses (ST-C 100%D), **B-D.** IA4D después de 4 meses (100%D), **E-H.** IA4D después de 5 meses (ST-C 0%D).

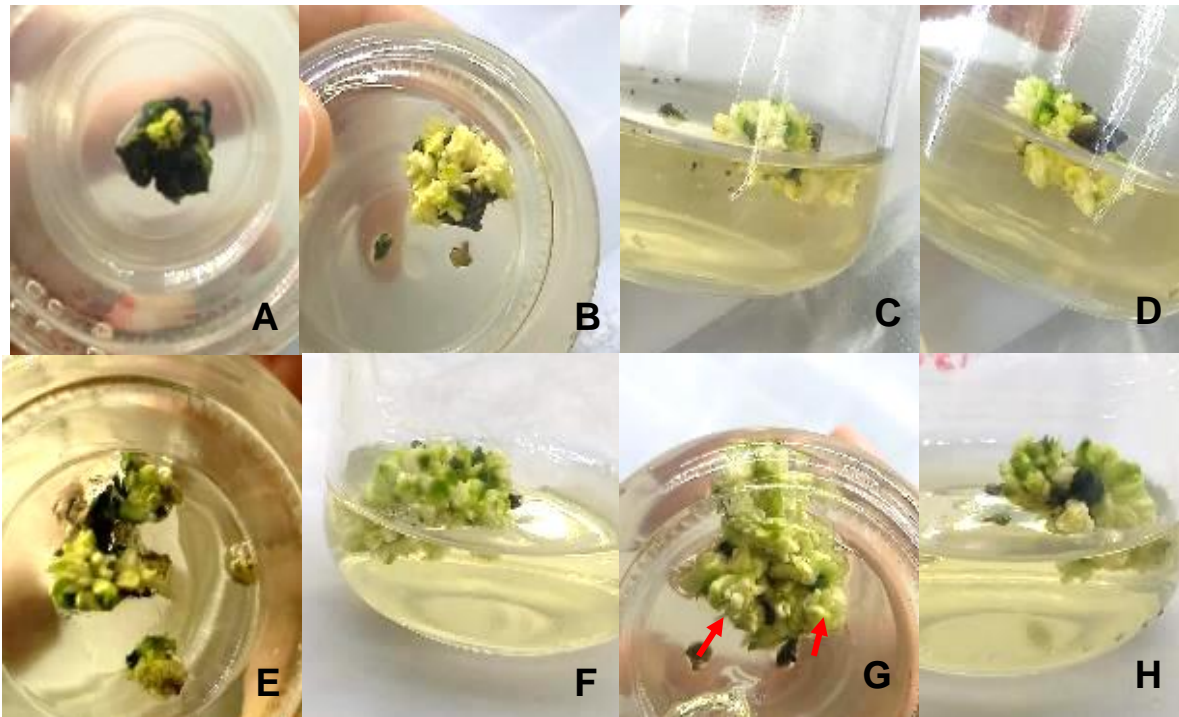


Fig. 64. *Respuesta de la IA4D después de 3, 4 y 5 meses en medio ST-C.*

Se notó que algunos explantes de la IA4D se desarrollaron más rápido en comparación con los otros explantes presentados como se puede observar en la Fig. 65. **A:** Inflorescencia con brote después de 5 meses y 7 días (ST- C 50%D), **B- C.** Brote aislado de la inflorescencia después de 5 meses y 8 días (ST-C 50%D), **D.** Brote aislado de la inflorescencia después de 5 meses y 26 días (ST-C 25%D), **E.** Brote aislado de la inflorescencia después de 6 meses y 3 días (ST-C 25%D), **F.** Brote aislado de la inflorescencia después de 6 meses y 11 días (ST-C 0%D), **G.** Brote aislado de la inflorescencia después de 7 meses (ST-C 0%D).

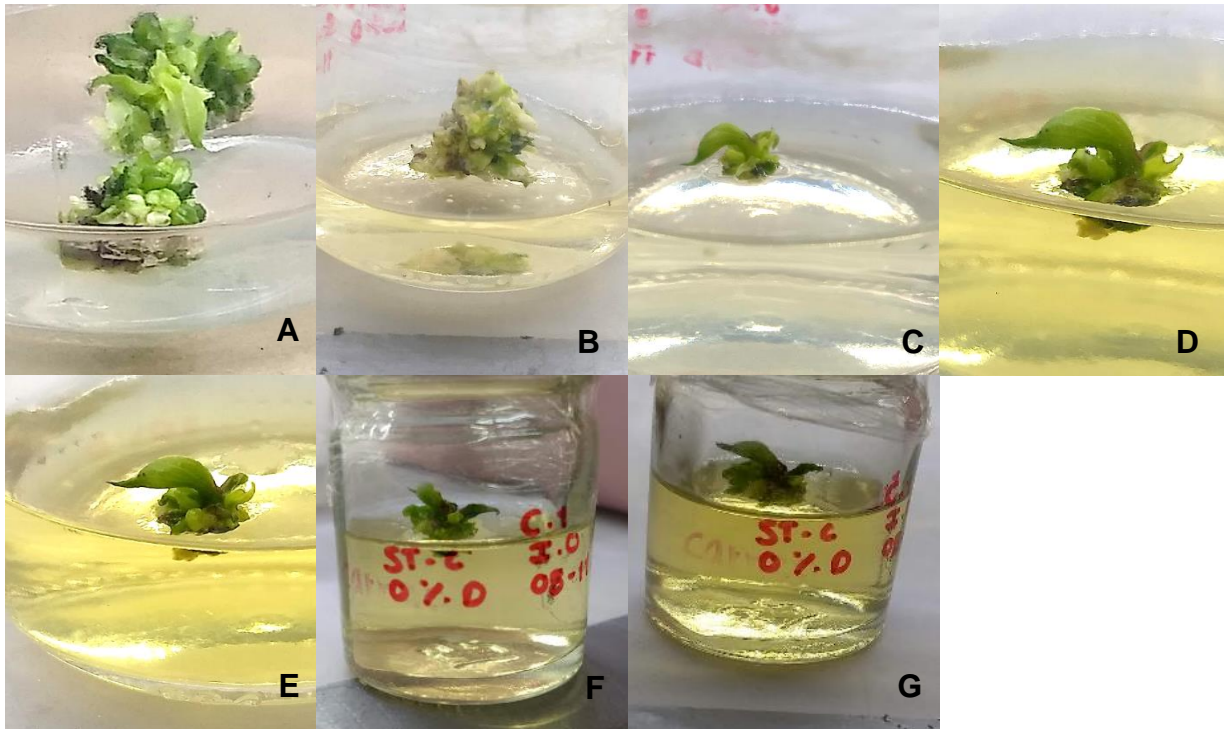


Fig. 65. Respuesta de brote de IA4D después de 5-7 meses en medio ST-C 50%D.

En la Fig. 66. Se muestra la IA4D después de 6 y 7 meses, bajo 50% Dicamba. en medio ST-C 50%D después de 6 y 7 meses: **A-D**. IA4D después de 6 meses, **E-M**. IA4D después de 7 meses.

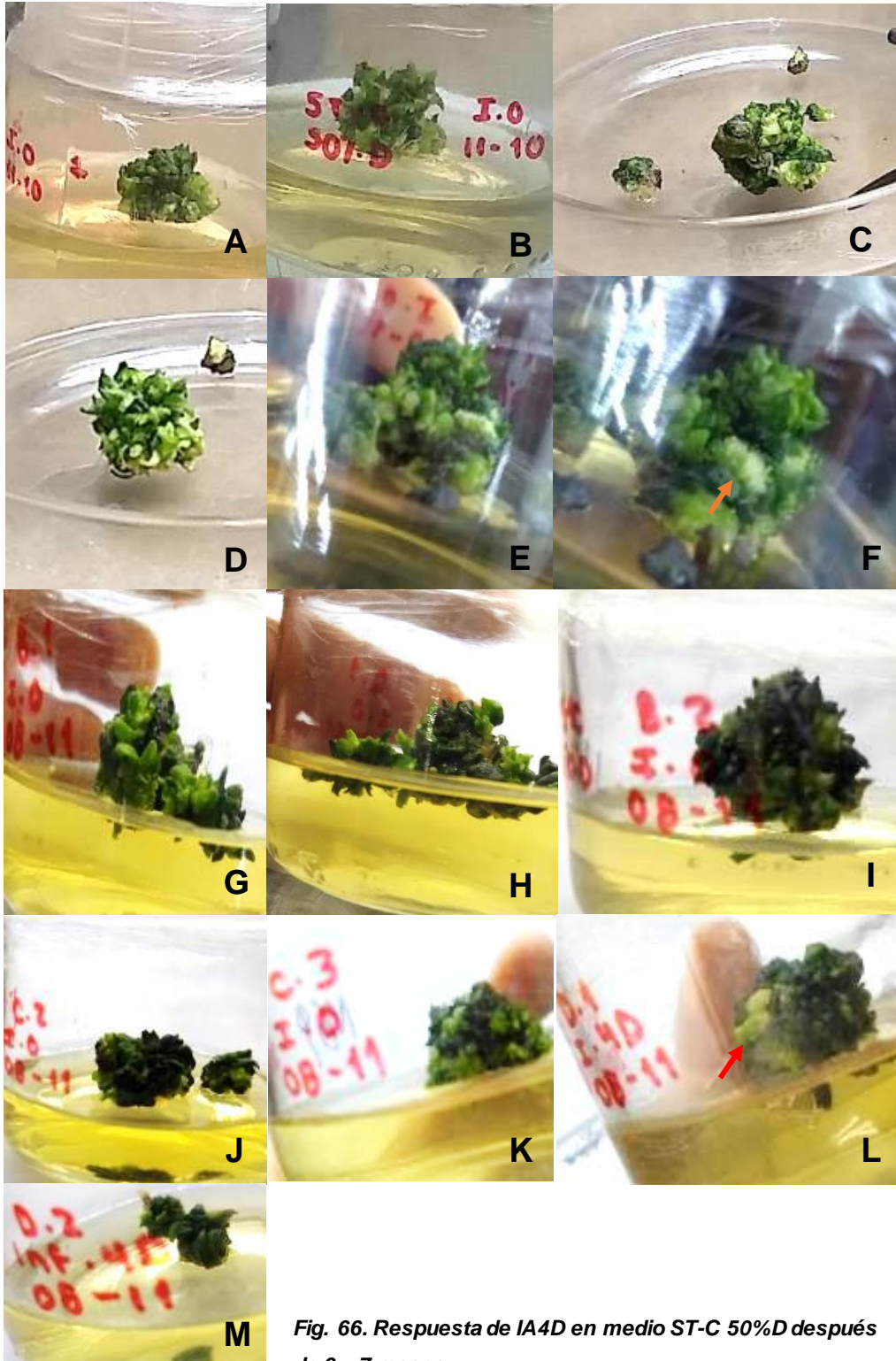


Fig. 66. Respuesta de IA4D en medio ST-C 50%D después de 6 y 7 meses.

En las Fig. 67-71 se muestran fotos tomadas con el microscopio estereoscópico.

Fig. 67. Respuesta de IA, IBM, IBI de la planta 4D después de 1 mes y 26 días: **A-E-G-H.** Callo IA, **B.** Fruto IA, **C-D.** Embriones somáticos IA, **F.** Hojas, **I-J.** Frutos IBM, **K-L.** Frutos IBI.

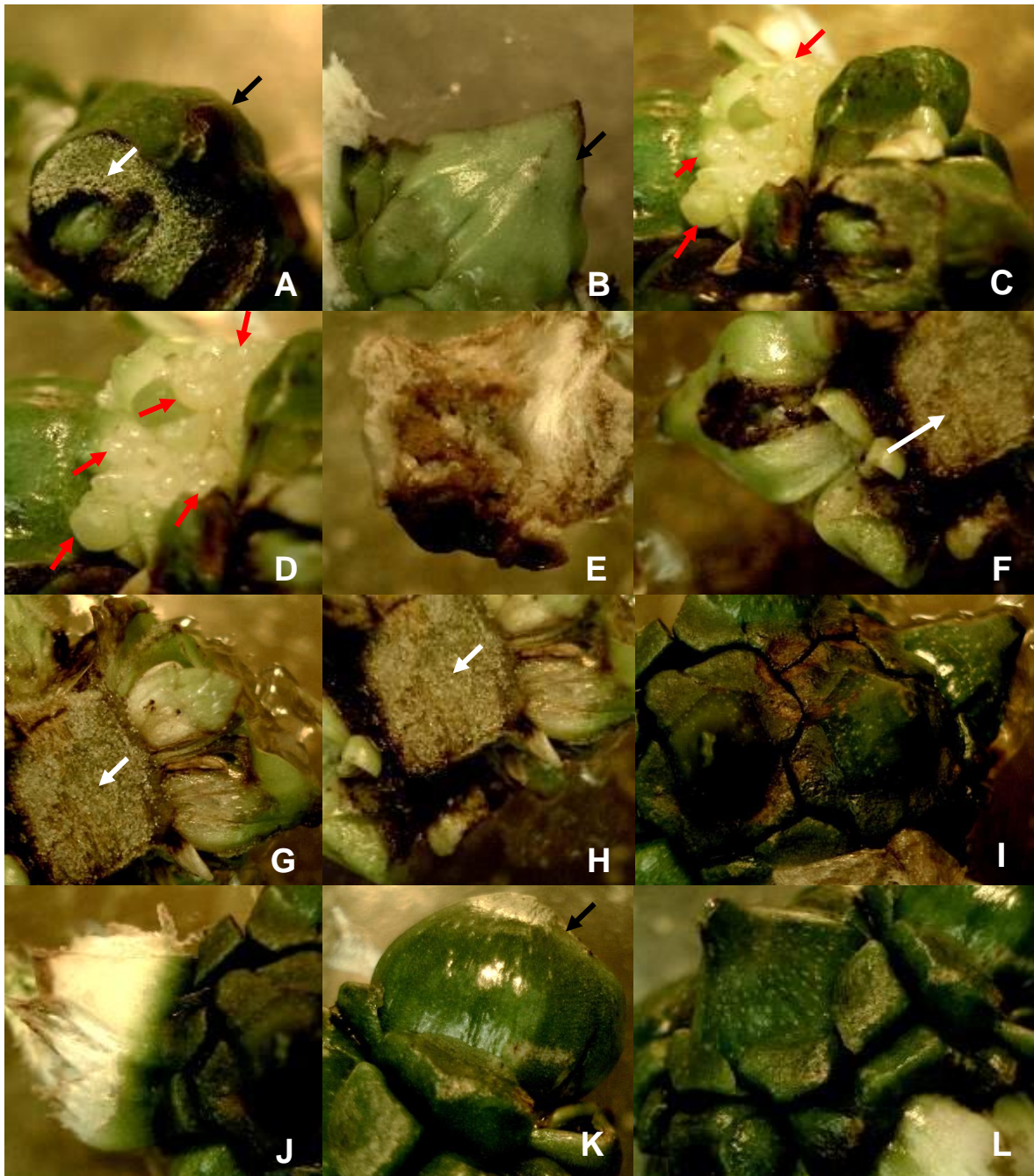


Fig. 67. Respuesta de IA, IBM, IBI de la planta 4D después de 1 mes y 26 días en medio ST-I.

Fig. 68. Respuesta de IA, IBM de la planta 4D después de 3 meses y 27 días: **A.** Brotes IA, medio ST-I, **B-F.** Embriones somáticos de IA, ST-C, **G.** Brotes IBM, medio ST-I, **H.** Embriones IBM, medio ST-C.

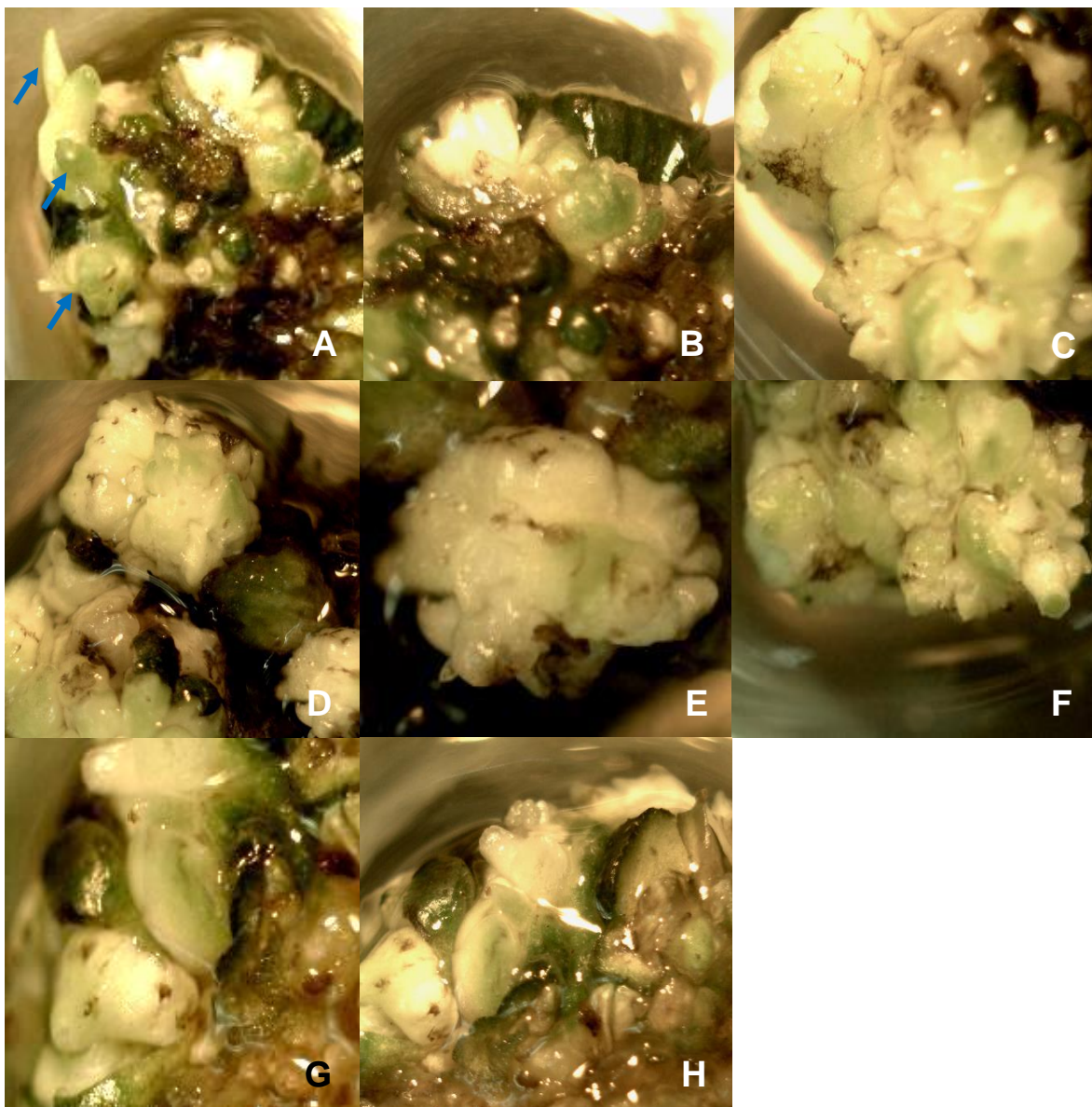


Fig. 68. Respuesta de IA, IBM de la planta 4D después de 3 meses y 27 días en medio ST-C (50%D) y ST-I.

Fig. 69. Respuesta de IA (D) de la planta 4D después de 5 meses y 21 días: Se observa formación de hojas y embriones.



Fig. 69. Respuesta de la IA de la planta 4D después de 5 meses y 21 días en medio ST-C (50%D) y ST-I.

Fig. 70. Respuesta de IA (B y C) de la planta 4D después de 5 meses y 21 días: **A-I.** IAB (Inflorescencia apical B), medio ST-I, **J-O.** IAC (Inflorescencia apical C), medio ST-C.

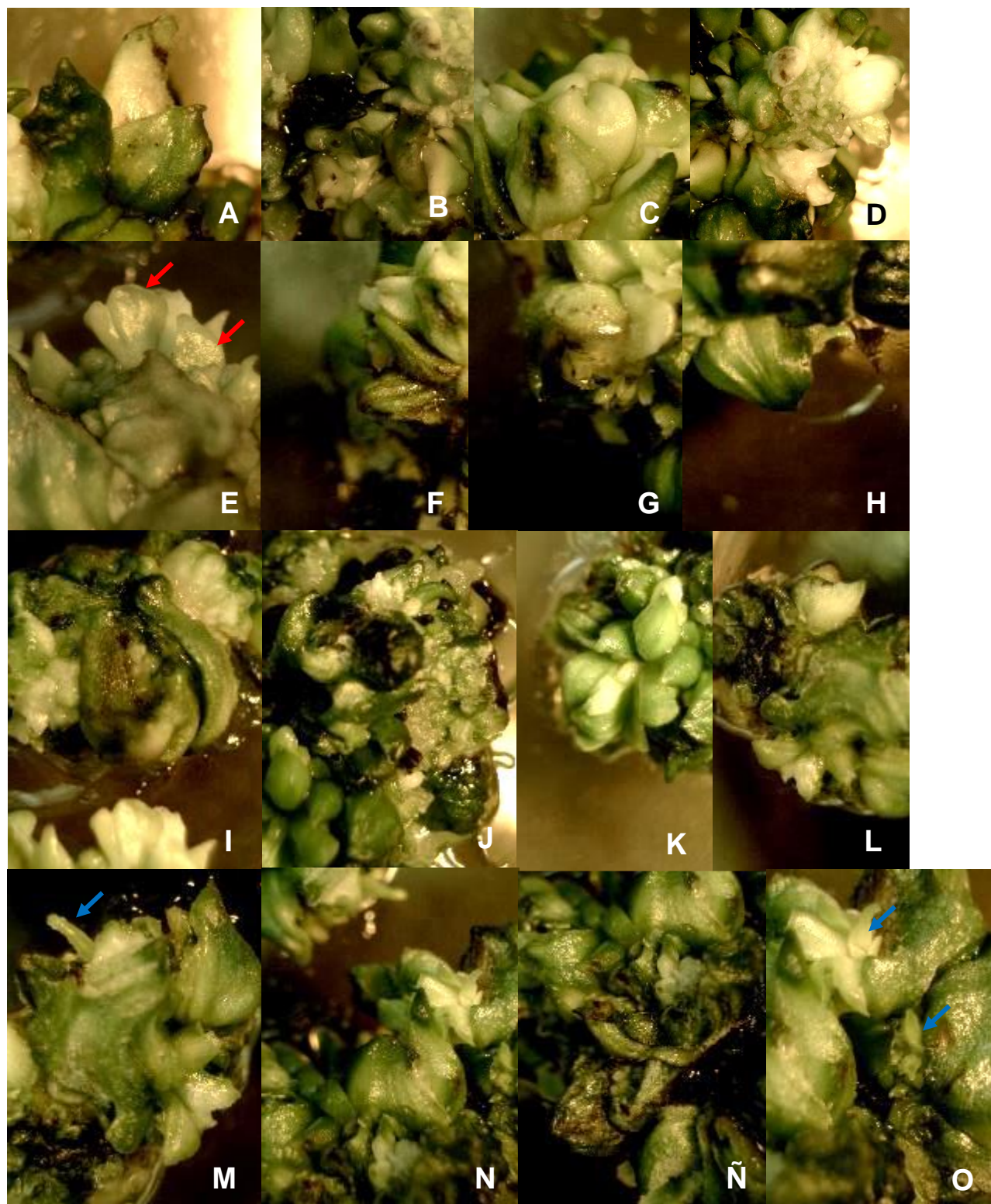


Fig. 70. Respuesta de la IA de la planta 4D después de 5 meses y 21 días en medio ST-C (50%D) y ST-I.

Como se mostró en la Fig. 65 se desarrolló un brote de la, en la Fig. 71 se observa el brote en fotografías del microscopio estereoscópico.

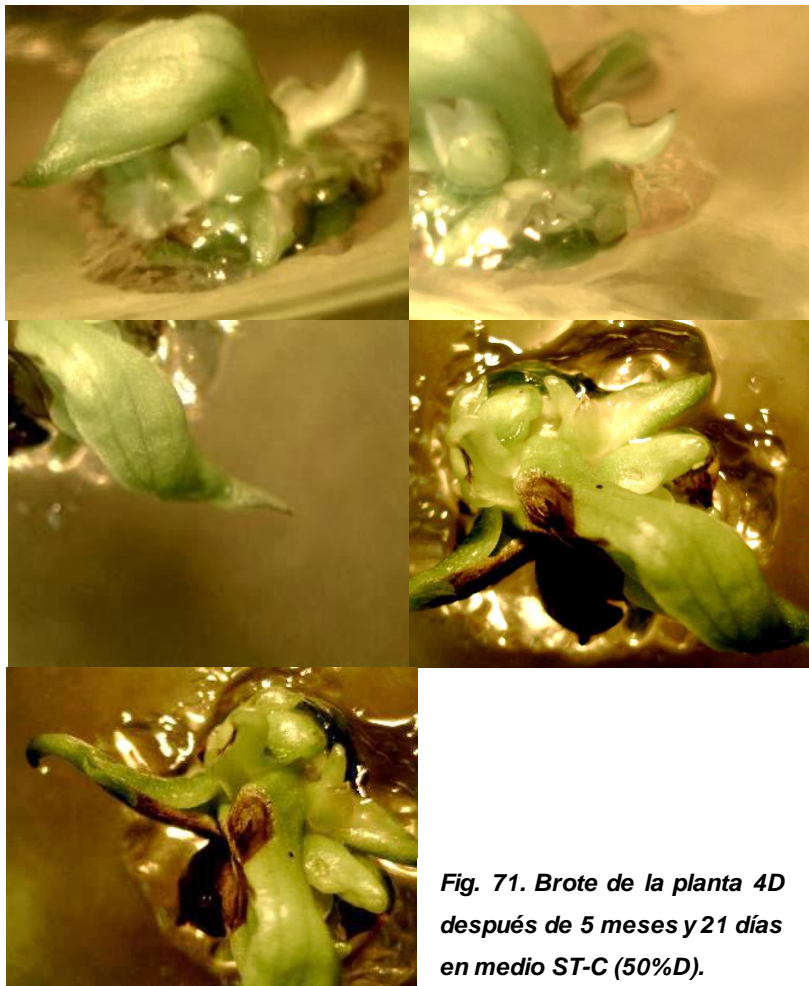


Fig. 71. Brote de la planta 4D después de 5 meses y 21 días en medio ST-C (50%D).

6.3.3. Resultados de la inflorescencia de la planta 5E

De esta planta se obtuvieron dos inflorescencias la primera: I Mad5E se utilizó para sembrar semillas (Fig. 72), mientras que la segunda se utilizó para obtener embriones somáticos (Fig. 73).

6.3.3.1. Siembra de semillas de la inflorescencia madura



Fig. 72. Semillas I Mad5E.

Las semillas fueron no viables ya que no dieron más respuesta de lo que se presenta en las fotos.

En la Fig. 73 por su parte se muestran respuestas favorables.

Fig. 73. Respuesta I5E después de sembrar. **A- B.** IA5E 8 días después medio N6P, **C- D.** IM5E 8 días, **E-F.** IB5E 8 días después, **G.** IM5E después de 26 días, **H-I.** IB5E 1 mes y 3 días después, **J-K.** IA5E 1 mes y 13 días después, **L-R.** IB5E 1 mes y 27 días después, **S-U.** IM5E 1 mes y 27 días después, **V- A.1.** IA5E 1 mes y 27 días después.

6.3.3.2. Resultados inflorescencia inmadura

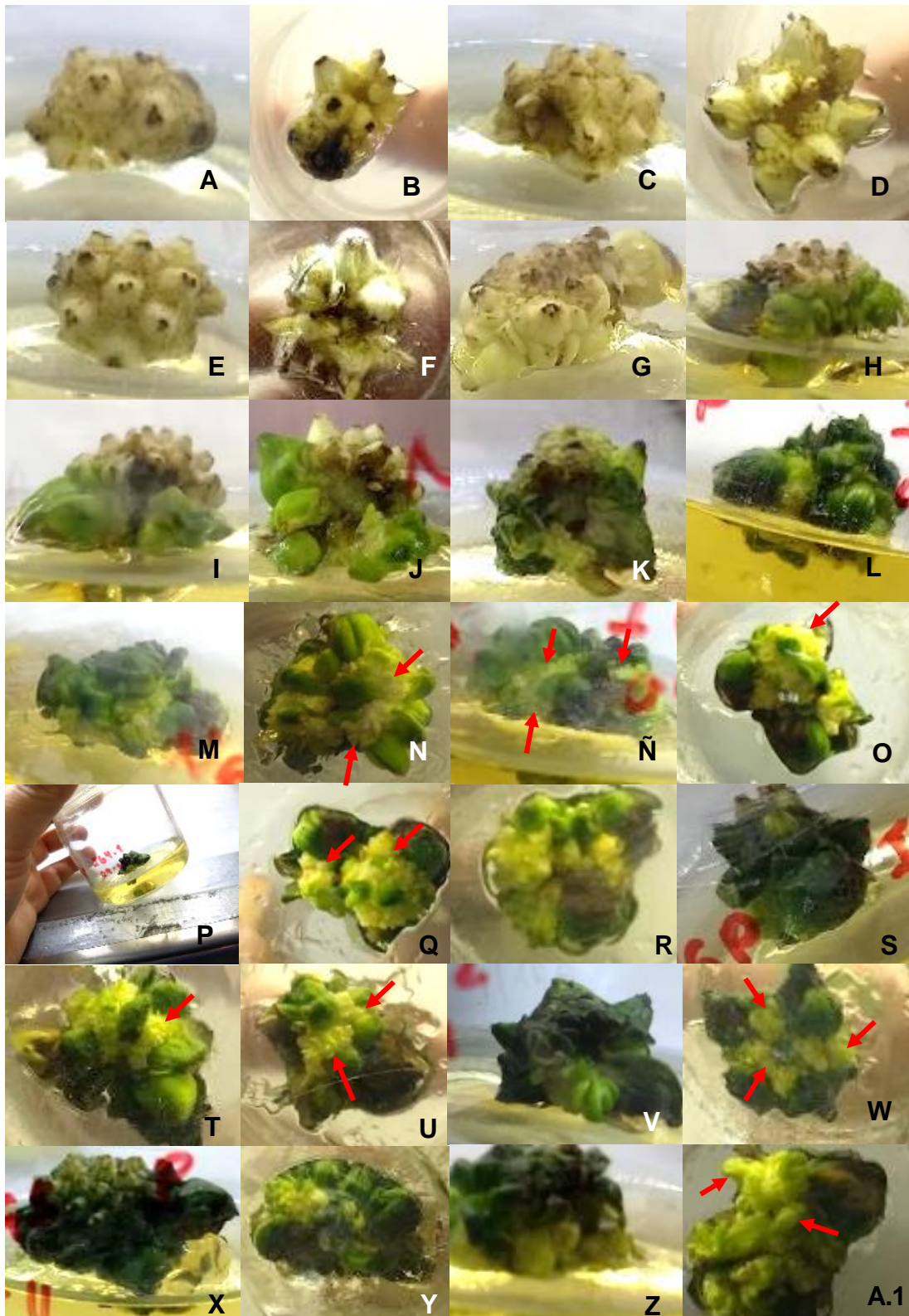


Fig. 73. Respuesta de I5E en medio ST-I.

En la Fig. 74 se muestran fotos de hojas de los explantes de I5E después de 4 meses, los explantes están bajo medio MS porque se está probando la respuesta de este medio de cultivo para el desarrollo de los embriones en una tesis en proceso que abarcará la etapa final de la embriogénesis somática (desarrollo hasta plántula) y la micropropagación de *Spathiphyllum sensation*. **A-C**. Inflorescencia apical procedente de medio ST-I en medio MS, **D-I**. Inflorescencia apical en medio ST-C 0%D, **J**. Inflorescencia media procedente de medio ST-C 100%D en medio MS.

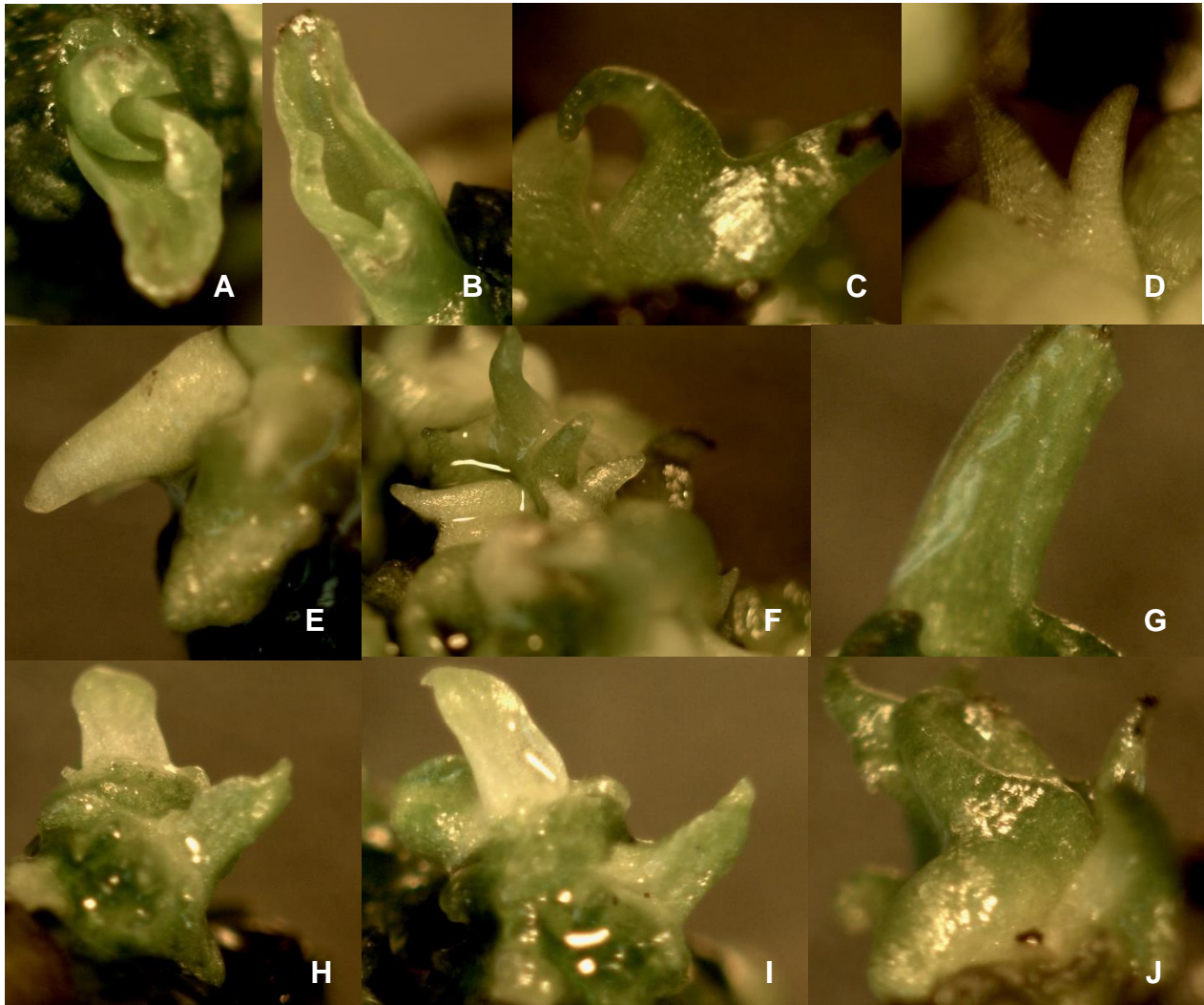


Fig. 74. Respuesta de IA e IM en medio MS después de 4 meses.

En la Fig. 75 se muestran embriones germinados con hojas verdaderas después de 5 subcultivos. **A-G**. Inflorescencia basal en medio sólido MS, **H-J**. Inflorescencia media en medio líquido MS.

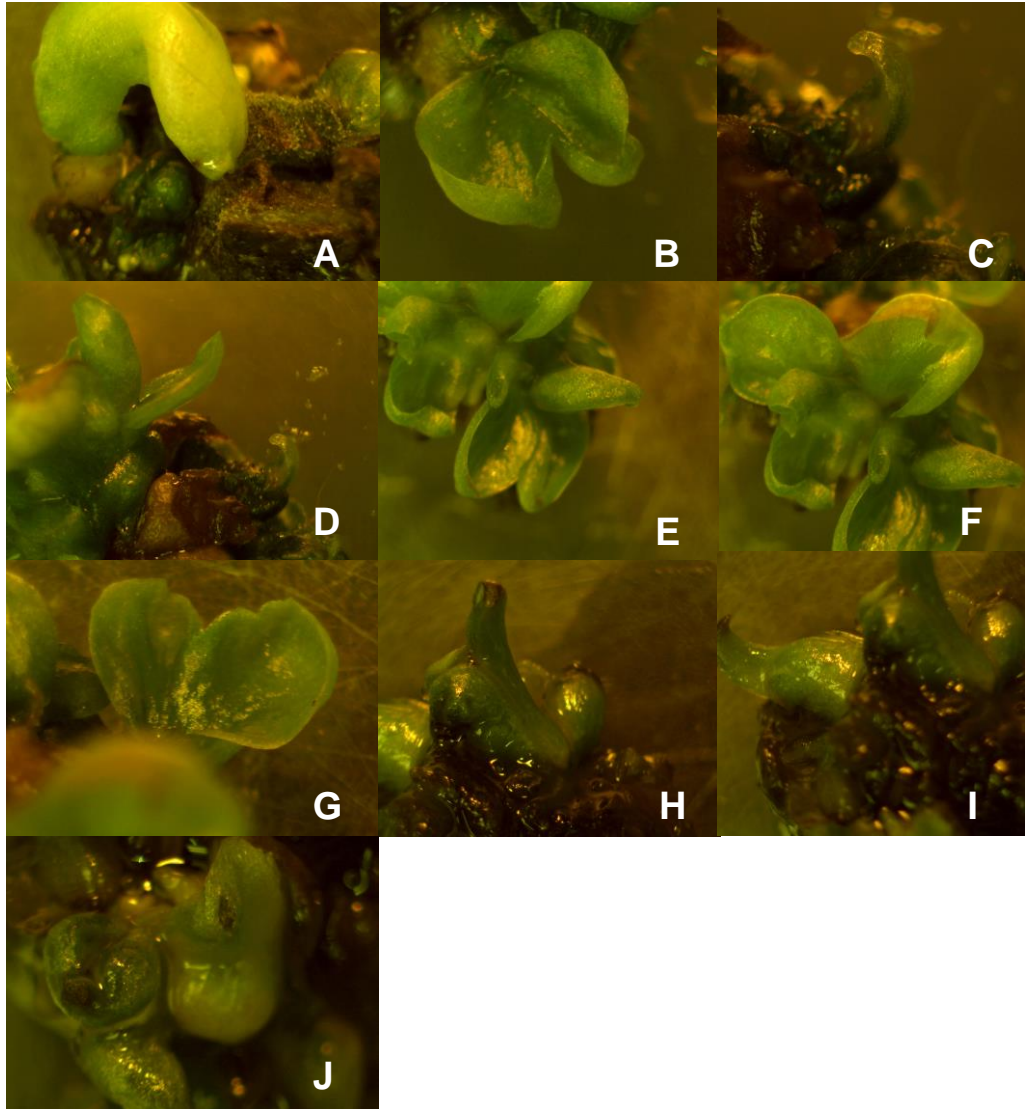
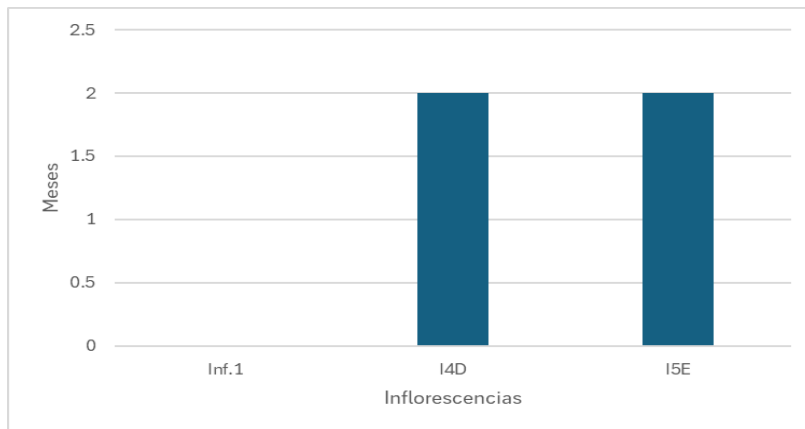


Fig. 75. Embriones germinados con hojas verdaderas.

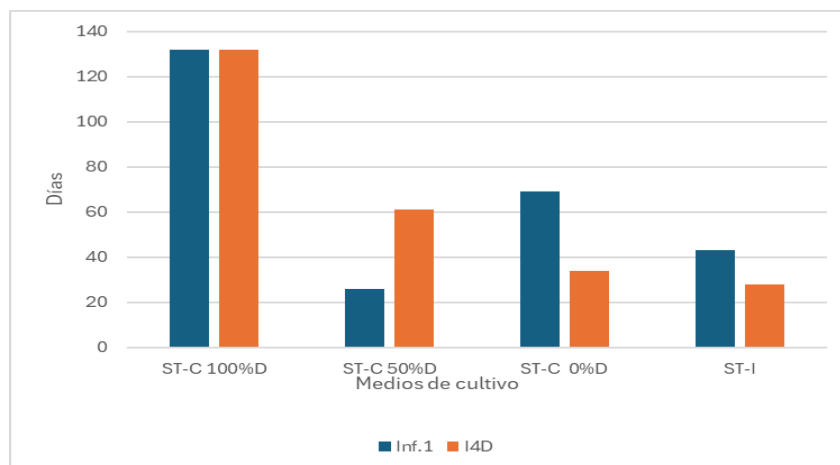
A continuación, se presentan las gráficas de los parámetros que se consideraron para evaluar la respuesta morfogénica de *Spathiphyllum sensation* con la técnica de embriogénesis somática: tiempo de emergencia de la inflorescencia y medios de cultivo ST-C y ST-I.

En la gráfica 6 se muestran los tiempos de emergencia de las inflorescencias utilizadas, para la Inf.1 el tiempo de emergencia fue de 0 meses mientras que para las otras de 2 meses de emergencia.



Gráfica 6. Tiempos de emergencia de las inflorescencias.

En la gráfica 7 se muestran los días en que las inflorescencias Inf.1 e I4D permanecieron en los medios de cultivo utilizados.



Gráfica 7. Días totales en los que las inflorescencias han estado en los distintos medios de cultivo (enero, 2024).

6.4. DISCUSIÓN

Se evaluaron los resultados obtenidos de las tres inflorescencias utilizadas. La primera inflorescencia Inf.1 tuvo un tiempo de emergencia de 0 meses, mientras que las inflorescencias de las plantas 4D y 5E se tomaron de 2 meses de emergencia, aunque en general las inflorescencias se obtuvieron en un estado inmaduro para poder obtener los embriones somáticos ya que un explante comúnmente utilizado son los embriones cigóticos inmaduros así como tejidos jóvenes (Von Arnold *et al.*, 2002; Ramírez, 2022), porque este tipo de tejidos contienen una mayor concentración de auxinas y citocininas (hormonas que genera la planta naturalmente), por ello se aprovecha dicho potencial para lograr obtener los embriones somáticos.

Además, se observó que el fenómeno de oxidación se presentó muy poco en las inflorescencias en comparación con los otros explantes utilizados y discutidos en capítulos anteriores, por ello se utilizó este explante para obtener los embriones somáticos. Esta reducción puede deberse a que el tejido no estaba maduro y es poco diferenciado.

Un embrión somático nace de las células somáticas que se encuentran presentes en el tejido vegetal pero no son parte de la línea germinal, a partir de estas células se forman estructuras embrionarias que se desarrollarán y darán origen a los embriones somáticos que germinarán y formarán plantas, análogamente a lo que pasa con los embriones cigóticos, este fenómeno se conoce como ES.

Como se mencionó en la revisión de literatura, la ES depende de factores biológicos (especie, variedad y estado fisiológico de la planta), químicos (medios de cultivo y principalmente reguladores de crecimiento) y ambientales (luz, temperatura, pH). Para este trabajo la especie utilizada fue *Spathiphyllum sensation* especie perteneciente a la familia de las *Araceae* una familia de plantas con flores e inflorescencia expuesta (Díaz, 2016), en esta familia la polinización de los frutos ocurre gracias a polinizadores (Robacker *et al.*, 1988; Knudsen *et al.*, 2006; Dötterl y Vereecken, 2010, citados por Díaz, 2016), los polinizadores son frecuentemente escarabajos de la subfamilia *Dynastinae* que son atraídos por el aroma floral que se emite de forma simultánea con la producción

de calor (termogénesis) con una temperatura de alrededor 32.4°C (Wagner *et al.*, 2008), por la inflorescencia durante la noche (Díaz *et al.*, 2021), para el género *Spathiphyllum* la polinización ocurre por la emisión de COVs (Hentrich *et al.*, 2010). Los principales COV identificados son terpenoides (mirceno, ipsdienol) y bencenoides aromáticos (acetato de bencilo, eugenol, benzoato de metilo y salicilato de metilo), todos ellos conocidos como potentes atrayentes de las abejas euglosinas macho (Gerlach y Schill, 1991; Hentrich *et al.*, 2010), estas abejas recogen los COVs y dan a cambio una esencia floral, aparte de las abejas macho euglosinas las abejas sin agujón (Meliponini) también son polinizadores de las especies de *Spathiphyllum* aunque hay más reportes de polinización por abejas euglosinas (Díaz *et al.*, 2021), dicho esto durante los riegos semanales a *Spathiphyllum sensation* no se percibió perfume floral alguno así que se considera que no hubo polinización porque además las semillas que fueron aisladas de los frutos maduros (Fig. 5) de la IMad5E no germinaron, esto conduce a que en realidad no eran semillas porque para que surjan las semillas debió haber polinización (Díaz, 2016). Solo se considera el hecho de la polinización mediante polinizadores para esta especie y no mediante autopolinización porque en este género la única especie que es autógena es *Spathiphyllum grandifolium* ya que sus fases sexuales se solapan y no se observan visitantes florales (Díaz *et al.*, 2019).

Con respecto a los reguladores de crecimiento (hormonas sintéticas), se utilizaron dos tipos de auxinas: 2,4-D y Dicamba, este último utilizado en concentraciones de (5 mg/l) hasta (0 mg/l), siendo más favorables los resultados para la concentración de 0 mg/l porque los embriones se desarrollaron hasta formar pequeños brotes como se muestra en las Fig., 59 fotos E y F, Fig. 65 en las fotos E y F para la planta 3C a los 7 meses del primer cultivo y en la Fig. 71. Los resultados mostrados en la Fig. 59 corresponden a los de la Inf.1 y los de la Fig. 65 y Fig. 71 corresponden a la inflorescencia I4D correspondiente a la IA4D de la planta.

El 2,4-D promueve la proliferación y diferenciación de células somáticas (Morais *et al.*, 2023), sin embargo también puede impedir la regeneración y/o producir embriones somáticos anormales (Morais *et al.*, 2023), aun así, este es aplicado comúnmente a los medios de cultivo para desencadenar el proceso de ES a partir de varios tipos de

explantos en muchas especies de plantas, incluyendo las coníferas (Fehér *et al.*, 2003). Se observó que en las inflorescencias I4D, Inf.1 los embriones quedaron inhibidos después de 7 meses, esto pudo ser debido a la embriogénesis secundaria basándose en la Fig. 53. Con respecto al Dicamba vs 2,4-D, Alvez y Oropeza, 2015 reportaron el efecto de estas dos auxinas en caña de azúcar y obtuvieron un promedio de 70.83% de callo embriogénico y por consiguiente de embriones somáticos en comparación del 2,4-D con el cual se obtuvo 62.08% de callo embriogénico, es por estas razones que el 2,4-D fue cambiado por Dicamba para inducir la ES en la I5E que demostró de acuerdo a la Fig. 73 tener una respuesta más rápida en la inducción de embriones en comparación con las inflorescencias anteriores.

La luz también fue un factor importante ya que los cultivos de las inflorescencias primero se colocaron en oscuridad porque *Spathiphyllum sensation* como se discutió en los capítulos anteriores es una especie muy propensa al fenómeno de la oxidación, entonces la oscuridad reduce dicho fenómeno, porque de acuerdo con Von Anderkas *et al.*, 2015, en la etapa de maduración los embriones somáticos en el tratamiento con luz tienen una concentración de fenoles significativamente mayor que los embriones en el tratamiento de oscuridad. Igualmente, Mouaad *et al.*, 2020 reportan que el cultivo de embriones somáticos maduros en la oscuridad dio lugar a una tasa de germinación inferior (35%) a la observada con un fotoperiodo de 16 horas.

Entonces, después de aproximadamente 1 mes las inflorescencias Inf.1, I4D e I5E se pasaron a luz para lograr la diferenciación celular en las inflorescencias, (en concordancia con Von Anderkas *et al.*, 2015), quienes encontraron que con un híbrido de alerce (*Larix X Marschlinii*) expuesto a luz, había un promedio de 384 ± 40 embriones somáticos en comparación con los 316 ± 53 embriones obtenidos en los tratamientos con oscuridad. No obstante, en este mismo estudio menciona que no hubo un efecto significativo de la luz sobre el número de cotiledones iniciados al nivel $P=0.05$. En los tratamientos con luz hubo un promedio de 6.21 ± 1.06 cotiledones/embriones en comparación con 6.31 ± 0.86 con la oscuridad. Se observó una diferencia de lotes ligeramente significativa ($P=0.0466$), así que considerando este resultado es posible que

etapas posteriores de la maduración de los embriones estos se cambian a oscuridad nuevamente.

Como se observó en las figuras presentadas, la IA de las inflorescencias I4D e I5E fue la zona de la inflorescencia que más dio respuesta, sin embargo, no es debido a la zona la mayor respuesta, sino que es debido a las hormonas que se encuentran en la planta: citocininas y auxinas. Es sabido que las citocininas y auxinas se encuentran en toda la planta y Schaller *et al.*, 2015 mencionan que las interacciones de estas hormonas en el desarrollo de la planta son como “el yin y el yang” cuya respuesta a menudo se expresa en patrones complementarios para dar destinos distintos a las células vecinas. La mayor concentración de auxinas se encuentra en la parte superior de la planta y disminuye hacia las raíces (PDBe, 2019), las auxinas son hormonas de crecimiento y estimulan la diferenciación de embriones somáticos, las auxinas son los reguladores clave del crecimiento vegetal que controlan la ES, tanto cuando se utilizan de forma exógena en los medios de cultivo como cuando son activas a nivel celular (Sharma *et al.*, 2007; Cook *et al.*, 1993). Según Kawahara y Komamine, 1995, citados por Hazubska *et al.*, 2020 las auxinas agregadas al medio de cultivo están implicadas en la expresión genética en las primeras etapas de la ES, por ello se utilizó 2,4-D, así como Dicamba en el medio de cultivo.

La explicación de las figuras presentadas en resultados se enlista a continuación:

Se puede notar en la Fig. 59 que los explantes de la Inf.1 después de 7 meses de subcultivos y bajo el medio B5 (ST-C) comienzan a oxidarse como se muestran en las fotos L-Ñ, sin embargo, se obtuvieron embriones en estado globular como se muestra en la foto I. De igual modo, el medio ST-C fue mejor que el ST-I ya que se observó que el medio ST-I sólo dio estructuras parecidas a frutos que se pueden observar en las Fig. 60 y 61, aunque también se observa la formación de callo.

Para la I4D se observa en la Fig. 62 que el medio ST-I desarrolla la inflorescencia hasta fruto, mientras que el uso del medio ST-C desarrolla estructuras embrionarias como se muestra en las Fig. 63, en la Fig. 64 se muestra cómo se fueron formando los embriones hasta estado escutelar, en la Fig. 65 se muestra el progreso de un pequeño brote a partir de los 5 meses desde el primer cultivo en el medio ST-C 50%D, se nota que el desarrollo

quedó inhibido hasta los 7 meses aun reduciendo la concentración de Dicamba a 0%, este mismo brote se observa en la Fig. 71. En la Fig. 66 se observan estructuras pseudoembrionarias, así como embriones a los 7 meses a partir del primer cultivo al reducir la concentración de Dicamba al 50% en el medio ST-C, las Fig. 63-66 representan los resultados de la IA4D.

En la Fig. 67 se muestra la respuesta de la I4D después de 1 mes de cultivo en medio ST-I, se observa callo, embriones somáticos en estado globular y formación de frutos, siendo la formación de callo y embriones somáticos provenientes de la inflorescencia apical y los frutos de la inflorescencia basal.

En la Fig. 68 se muestra la formación de hojas (Foto A) y de embriones somáticos en estado coleoptilar (Foto D) en medio ST-C 50%D provenientes de la inflorescencia apical (IA4D) después de 3 meses del primer cultivo, mientras que para la IBM se formaron embriones en estado globular en el medio ST-I.

En la Fig. 69 se muestra la formación de hojas a partir de la IA4D después de 5 meses del primer cultivo, así mismo esto se muestra en la Fig. 69 con la formación de hojas y embriones somáticos en estado coleoptilar, estos resultados se observan en el medio ST-C 50%.

En la Fig. 73 se muestra cómo se empiezan a formar los embriones en el medio ST-I a partir de 1 mes y 27 días del primer cultivo, lo cual se considera una respuesta rápida para la I5E ya que aún no está en el medio ST-C y ya se cuenta con esta respuesta, se observa que todas las partes de la inflorescencia dieron embriones somáticos.

En la Fig. 74 se muestran hojas como respuesta de la I5E en medio MS después de 4 meses de la primera siembra.

En la Fig. 75 se muestran embriones germinados con hojas verdaderas, se observa una mejor respuesta en los sembrados en medio sólido que del medio líquido, ya que no hay presencia de oxidación y las hojas están más desarrolladas, esto puede deberse a que en el medio líquido se dispersan con mayor rapidez los compuestos oxidativos.

Como se puede observar en la gráfica 7 las inflorescencias (Inf. 1 e I4D) estuvieron sometidas durante el mismo tiempo en el medio ST-C 100%D (132 días), siendo este el tipo de medio con mayor número de días en el que estuvieron subcultivadas las inflorescencias, esto debido a que se esperaba el desarrollo de embriones y callo, lo cual se obtuvo, pero como se describió en las figuras, la I4D obtuvo resultados más favorables a comparación de la Inf.1. En cuanto al medio ST-C 50%D la I4D pasó un mayor tiempo sometida (61 días) a comparación de la Inf.1 (26 días) porque las inflorescencias provenientes del medio ST-I aún no estaban tan desarrolladas como las de la Inf.1, por ello se mantuvieron más tiempo y se redujo el Dicamba ya que se esperaba que se desarrollaran las estructuras pseudoembrionarias y por consiguiente las embrionarias, mientras que en el medio ST-C 0%D la Inf.1 ha pasado un mayor tiempo (69 días) cultivada en este medio a comparación de la I4D (34 días), esto debido a que como se muestra en las Fig. 65 y 71 ya se estaban formando pequeños brotes y hojas y se quería que proliferaran y se desarrollaran aún más al reducir la concentración de Dicamba al 0%. En cuanto al medio ST-I la Inf. 1 pasó un mayor tiempo (43 días) bajo este medio a comparación de la I4D (28 días) ya que su tiempo de emergencia de acuerdo a la gráfica 6 fue menor que el de la I4D, entonces al momento en el que se dividió el lote de inflorescencias en los medios ST-I y ST-C esta ya llevaba más tiempo sembrada.

Entonces de acuerdo a las observaciones en las figuras y de acuerdo a las inflorescencias empleadas podemos notar que la mejor respuesta se dio con la I4D y la parte apical (IA4D) con la formación de embriones, callo y hojas, la Inf.1 también dio un pequeño brote, pero no proliferaron más. Esto se debe a que la parte apical es la más inmadura, con un mayor número de células que pueden regenerar la planta.

Con respecto a la I5E se observa que ha tenido una respuesta más rápida a comparación de las inflorescencias I4D e Inf.1 porque se cambió el 2,4-D en el medio ST-I por Dicamba, que coincide de acuerdo a lo que reportan Alvez y Oropeza, 2015 en su estudio con caña de azúcar, ya que el Dicamba generó un mayor número de embriones que el 2,4-D.

En otras especies de este mismo género como por ejemplo en *Spathiphyllum wallisii Regel* se obtuvieron embriones somáticos secundarios (Eeckhaut *et al.*, 2004), usaron la

inflorescencia y la desinfectaron con etanol al 70% y la desinfectaron con una solución de NaClO al 10%, en el medio usaron 2, 4-D y TDZ, dichos aspectos no están alejados a lo que se usó en este trabajo exceptuando al TDZ ya que en este trabajo se utilizó BA. Como coincidencia también se obtuvo embriogénesis secundaria. En otras especies como *Spathiphyllum* 'Supreme' se utilizaron mayormente hojas y pecíolos (Zhao *et al.*, 2012; Lakshmanan *et al.*, 2011; Lekshmi *et al.*, 2022) y en la especie *Spathiphyllum* 'Mojo' el rizoma (Zhou *et al.*, 2018) lo que resalta aún más que las inflorescencias son poco usadas para obtener embriones somáticos.

CONCLUSIONES

1. Para poder establecer los cultivos *in vitro* *Spathiphyllum sensation* se requiere tener plantas bajo condiciones de invernadero y, se deberán someter a un programa de fertilización y fitosanitario. Las plantas donadoras de explantes se vieron estimuladas con los reguladores de crecimiento utilizados, así como la incorporación del AG₃ logró estimular la emergencia de las inflorescencias.
2. Se logró diseñar un método de desinfección para diferentes explantes de *Spathiphyllum sensation*. El protocolo de desinfección da inicio desde que las plantas son traídas del invernadero, ya que se al separar los diferentes órganos deben ser tratados con una solución antioxidante y agroquímicos. Posteriormente el protocolo se desarrolla en condiciones asépticas y, finalmente se mantiene los explantes en medio líquido conteniendo antioxidantes y antibióticos y antifúngicos.
3. Después de utilizar varias técnicas, se pudo demostrar que no todos los explantes son eficientes para iniciar los cultivos celulares *in vitro* de *Spathiphyllum sensation*. Se demostró que los mejores explantes para la obtención de protoplastos fueron segmentos de láminas foliares, los cuales deben permanecer en medios de cultivo sólidos (ST-C) conteniendo sales inorgánicas del medio B5 y suplementado con los reguladores de crecimiento Dicamba, para inducir embriogénesis somática directa e indirecta y BA para estimular las divisiones celulares. Para la obtención de la embriogénesis somática, el mejor explante fue la inflorescencia inmadura y, se logró primeramente cultivando segmentos de la inflorescencia primero en el

medio ST-I y, posteriormente para la proliferación de los embriones se pasaron al medio ST-C.

4. Durante el desarrollo del presente trabajo y, realizando una revisión bibliográfica, se concluye que la planta *Spathiphyllum sensation* presenta oxalatos de calcio por lo que su oxidación siempre fue una de las limitantes para el establecimiento de los cultivos *in vitro*. Para resolver esta limitante, se utilizaron diferentes antioxidantes, combinaciones y concentraciones, la mezcla fue ácido cítrico y ascórbico a razón de 100 mg/l, más L-cisteína (1 g/l) y PVP – 40 000 a una concentración de 0.25 g/l. Esta combinación resultó favorable adicionándola al medio de cultivo como en los enjuagues durante la desinfección.
5. Se concluye que la mejor técnica para lograr la regeneración de plantas de *Spathiphyllum sensation* es la embriogénesis somática y utilizando como explantes inflorescencias inmaduras siendo la de mayor capacidad los segmentos apicales. Cabe mencionar que no se pudo demostrar su capacidad organogénica debido a que los explantes para organogénesis como fue el rizoma se oxidaron al punto de no poder evaluar la respuesta morfogenética.
6. Se logró diseñar un medio de cultivo para inducir, multiplicar y germinar embriones somáticos. En el caso de la inducción se logró en el medio ST-I, mientras que la multiplicación de los embriones se llevó a cabo en el medio ST-C. Para la germinación de los embriones, se redujo el Dicamba al 50% y, posteriormente se eliminó.
7. Se determinó que *Spathiphyllum sensation* es una especie recalcitrante bajo condiciones *in vitro*.
8. Aun cuando no hay mucha información sobre el uso de inflorescencias inmaduras, para esta especie, resultó una buena alternativa para inducir embriones somáticos y regenerar plantas. Cabe mencionar que, si bien la literatura recomienda tejidos inmaduros, pero no se cuenta con información sobre inflorescencias inmaduras, se demostró que tienen totipotencia, y que la zona apical (la más inmadura) demuestra mayor capacidad embriogénica en comparación con los segmentos medios e inferiores.

PERSPECTIVAS

Se recomienda:

1. Probar diferentes explantes como los meristemos o ápices para inducir la organogénesis y, si es necesario utilizar medios líquidos con puentes de papel para evitar la concentración de los fenoles.
2. Ya que se logró aislar protoplastos, así como la obtención de microcallos y callos, se recomienda optimizar el protocolo en cuanto a: cantidad de explante (peso fresco de las láminas foliares), tiempo de incubación con las enzimas, siembra y mantenimiento de protoplastos y microcallos en malla de nylon y no utilizar papel filtro. También se recomienda sólo hacer dos centrifugaciones y no tres ya que se pierden una cantidad considerable de protoplastos, lo que puede provocar que no crezcan rápido los microcallos por tener una densidad baja de protoplastos.
3. En cuanto a los cultivos de protoplastos, es importante hacer conteo de estos utilizando una cámara de Neubauer o hemocitómetro, así mismo determinar la viabilidad de los protoplastos con una técnica de tinsión.
4. Para la maduración de los embriones somáticos es importante probar ya sea AG₃ o ABA y medios líquidos alternando con medios sólidos, que puedan estimular la germinación de los embriones. Además, en esta etapa se recomienda pasar los cultivos a oscuridad para evitar la alta oxidación.

REFERENCIAS

- Abel, S., y Theologis, A. (1994). Transient transformation of Arabidopsis leaf protoplasts: a versatile experimental system to study gene expression. *The plant journal*, 5(3),421-427. Doi: <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.1994.00421.x>
- Achicanoy, H. (2001). Estrategias integradas para el control de enfermedades de las plantas. Universidad Nacional de Colombia. Medellín - Colombia. Recuperado de: <https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/36632>
- ADAMA. (2021). *Ficha técnica CAPTAN 50 PLUS*. Recuperado de: https://www.adama.com/mexico/sites/adama_mexico/files/downloads/ficha_tecnica_cap_tan50_plus_adama_tcm43-9628.pdf
- Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios [AEMPS]. (2013). *Ficha técnica Ketoconazol*. Recuperado de: https://cima.aemps.es/cima/pdfs/es/ft/58437/58437_ft.pdf
- Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios [AEMPS]. (2008). *Ficha técnica Terbinafina pensa 250 mg comprimidos efg*. Recuperado de: https://cima.aemps.es/cima/dochtml/ft/69684/FichaTecnica_69684.html
- Agrolink. (2021). *Récord de ventas de flores y plantas durante el 2020*. Recuperado de: <https://agrolink.com.ar/record-de-ventas-de-flores-y-plantas-durante-el-2020/actualidad/>
- Aliyu, O.M. (2005). Application of tissue culture to cashew (*Anacardium occidentale*. p. L.) breeding: An appraisal. *African Journal of Biotechnoly*, 4(13),1485–1489. Recuperado de: https://academicjournals.org/article/article1382013749_Aliyu.pdf
- Alvez, B., y Oropeza, M. (2015). Effect of Dicamba and 2,4 dichlorophenoxyacetic acid on sugarcane somatic embryogenesis. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 17(2), 85-94. Doi: <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v17n2.54280>
- Armstrong, C. L., y Green, C. E. (1985). Establishment and maintenance of friable, embryogenic maize callus and the involvement of L-proline. *Planta*, 164(2), 207–214. Doi: <https://doi.org/10.1007/BF00396083>
- Asociación Española de Pediatría [AEP]. (2020). *Manitol*. Recuperado de: <https://www.aeped.es/comite-medicamentos/pediamecum/manitol>
- Atlas de histología vegetal y animal. (2023). Tejidos Vegetales. *Protección*. Recuperado de: https://mmegias.webs.uvigo.es/1-vegetal/guiada_v_proteccion.php

- Azofeifa, A. (2009). Problemas de oxidación y oscurecimiento de explantes cultivados in vitro. *Agronomía Mesoamericana*, 20(1), 153–175. Doi: <https://doi.org/10.15517/am.v20i1.4990>
- Bandyopadhyay, T., Bandyopadhyay, M., Teixeira da Silva, J., Paul, S., Dam, A., y Ghosh, P. (2011). An Efficient Micropropagation Protocol to Control Abnormality in Long-Term Shoot Cultures of *Spathiphyllum floribundum* (L.) 'Petite'. *Floriculture and Ornamental Biotechnology*, 5(1), 57-63. Recuperado de: [http://www.globalsciencebooks.info/Online/GSBOnline/images/2011/FOB_5\(1\)/FOB_5\(1\)57-63o.pdf](http://www.globalsciencebooks.info/Online/GSBOnline/images/2011/FOB_5(1)/FOB_5(1)57-63o.pdf)
- Beckman, C.H. (2000). Phenolic-storing cells: keys to programmed cell death and periderm formation in wilt disease resistance and in general defence responses in plants. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 57(3), 101–110. Doi: <https://doi.org/10.1006/pmpp.2000.0287>
- Bonga, J. M., y Von Anderkas, P. (1992). In vitro cultures of trees. *Forestry Sciences*, 38. Kluwer Academic Publishers. Netherlands. 236 pp. ISBN-10: 0792315405.
- Boyce, P. C., y Croat, T. B. (2018). *The Überlist of Araceae, totals for published and estimated number of species in aroid genera*. Recuperado de: <http://www.aroid.org/genera/180211uberlist.pdf>
- Brandy, W. (2023, Febrero 1). *12 amazing uses and benefits of Peace Lily Plants*. Petal Republic. Recuperado de: <https://www.petalrepublic.com/benefits-of-peace-lily-plants/>
- Brown, A. (2023, Febrero 1). *How to care for peace lily (spathiphyllum)*. Back Garden - Gardening Blog, Plants, Landscaping, Mushrooms. Recuperado de: <https://backgarden.org/peace-lily-care/>
- Bunting, G. S. (1960). A revision of *Spathiphyllum* (Araceae). *Memoirs of the New York Botanical Garden*, 10(3), 1-53.
- Calvo, J., y Martínez, L. (2009). Mecanismos de acción de los antimicrobianos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 27(1), 44–52. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2008.11.001>
- Carmona, O. (2017). *Microtuberización en la especie Dioscorea rotundata cultivar botón*. Tesis de Maestría (Biotecnología). Universidad de Córdoba. 70pp.
- Casalena, E. (2022, diciembre 28). *14 peace Lily benefits and other facts*. AZ Animals. Recuperado de: <https://a-z-animals.com/blog/peace-lily-benefits-and-other-facts/>
- Concepción, O., Nápoles, L., Pérez, A. T., Peralta, N., Hernández, M., y Trujillo, R. (2005). Efecto de tres antioxidantes en el cultivo in vitro de ápices de guayaba (*Psidium guajava* L.). Relación entre el origen del explante y el contenido de compuestos fenólicos. *Cultivos*

Tropicales, 26(1), 33-39. Recuperado de:
<https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=193215916005>

- Cook T.J., Racusen R.H., Cohen J.D. (1993). The role of auxin in plant embryogenesis. *The Plant Cell*, 5(11), 1494–1495. Doi: <https://doi.org/10.1105/tpc.5.11.1494>
- Coté, G. G., y Gibernau, M. (2012). Distribution of calcium oxalate crystals in floral organs of Araceae in relation to pollination strategy. *American Journal of Botany*, 99(7), 1231–1242. Doi: <https://doi.org/10.3732/ajb.1100499>
- Croat, T. B., y Acebey, A. R. (2015). *Araceae*. Flora de Veracruz. Instituto de Ecología A. C. Xalapa, Veracruz, México. Centro de Investigaciones Tropicales (CITRO). Universidad Veracruzana. ISSN 0187-425X.
- Croat, T., y Weessies, N. (2020). A new Species of *Spathiphyllum* (Araceae) from the Ecuadorian Oriente. *Journal of the International Aroid Society*, 43(3y4), 22-34.
- Davies, P.J. (2004). *Plant Hormones: Biosynthesis, Signal Transduction, Action!* Kluwer Academic Publishers. 3ª edición. ISBN-10 : 1402026854. 776pp.
- Desk, W. (2020, Junio 3). *7 reasons you need a peace Lily Plant In Your Home*. The Week. Recuperado de: <https://www.theweek.in/leisure/lifestyle/2020/06/01/7-reasons-you-need-a-peace-lily-plant-in-your-home.html>
- Díaz, M. D. (2017). Las Hormonas Vegetales en las Plantas. *Serie Nutrición Vegetal*, (88). Artículos Técnicos de INTAGRI. Recuperado de: <https://www.intagri.com/articulos/nutricion-vegetal/las-hormonas-vegetales-en-las-plantas>
- Díaz, P. (2016). *Biología floral y reproductiva de Spathiphyllum cochlearispathum (liebm.) engl. y Spathiphyllum ortgiesii Regel (ARACEAE) en la región de los Tuxtlas, Veracruz, México*. Tesis de Maestría (Ecología Tropical). Centro de Investigaciones Tropicales. México. 115 pp.
- Díaz, P., Hentrich, H., Aguilar, P.A., Krömer, T., Chartier, M., MacSwiney, M.C., y Gibernau, M. (2019). A review on the pollination of aroids with bisexual flowers. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 104, 83–104. Doi: <https://doi.org/10.3417/2018219>
- Díaz, P., Hentrich, H., Dötterl, S., Krömer, T., MacSwiney, M.C., y Aguilar, P. A. (2021). Reproductive biology of two *Spathiphyllum* (Araceae) species in Los Tuxtlas, Veracruz, México. *Flora*, 285. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.flora.2021.151958>
- Dietz, K. J., Schramm, M., Betz, M., Busch, H., Dürr, C., y Martinoia, E. (1992). Characterization of the epidermis from barley primary leaves : I. Isolation of epidermal protoplasts. *Planta*, 187(4), 425- 430. Doi: <https://doi.org/10.1007/BF00199959>

- Dixon, R.A., y Paiva, N.L. (1995). *Stress-induced phenylpropanoid metabolism*. *The Plant Cell*, 7(7), 1085–1097. Doi: <https://doi.org/10.2307/3870059>
- Donovan, J. (2023, marzo 9). *A complete guide to peace lily varieties*. Lawn.com.au. Recuperado de: <https://lawn.com.au/peace-lily-varieties/>
- Echenique, M., y Huanca, W. (2022). Evaluación de antibióticos y fungicidas, en la introducción in vitro de banano (*Musa acuminata*) en la Estación Experimental Sapecho. *Apthapi*, 8(3), 2410-2417. Doi: <https://doi.org/10.53287/pukn2928cx61e>
- Eeckhaut, T. G., Werbrouck, S. P., Leus, L. W., Van Bockstaele, E. J., y Debergh, P. C. (2004). Chemically induced polyploidization in *Spathiphyllum wallisii* Regel through somatic embryogenesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 78, 241-246. Doi: <https://doi.org/10.1023/B:TICU.0000025659.19232.04>
- Elicriso. (2018). *Spathiphyllum (espatifilo)*. *Información sobre la planta - propiedades y cultivo*. Recuperado de: https://www.elicriso.it/es/como_cultivar/spathiphyllum/
- Equipartes agrícolas. (2019). *La industria de la Flor en México*. Recuperado de: <https://www.equipartes.com.mx/node/1505>
- Estrela, C., Estrela, C. R. A., Barbin, E. L., Spanó, J. C. E., Marchesan, M. A., y Pécora, J. D. (2002). Mechanism of action of sodium hypochlorite. *Brazilian Dental Journal*, 13(2), 113–117. Doi: <https://doi.org/10.1590/S0103-64402002000200007>
- Etienne, H., Bertrand, B., Dechamp, E., Maurel, P., Georget, F., Guyot, R., y Breitler, J.C. (2016). Are genetics and epigenetic instabilities of plant embryogenic cells a fatality? The experience of coffee somatic embryogenesis. *Human Genetics and Embryology*, 6(1), 136-140. Doi : 10.4172/2161-0436.1000136.
- Farmalisto México. (2023). *Microdyn®*. Recuperado de: [https://www.farmalisto.com.mx/antisepticos-y-desinfectantes/4209-microdyn-frasco-con-500-ml.html#:~:text=Contiene%20\(F%20C%20B3rmula\)%3A%20Agua%20bidestilada,de%20origen%20animal%20FPlata%20ionizada](https://www.farmalisto.com.mx/antisepticos-y-desinfectantes/4209-microdyn-frasco-con-500-ml.html#:~:text=Contiene%20(F%20C%20B3rmula)%3A%20Agua%20bidestilada,de%20origen%20animal%20FPlata%20ionizada).
- Fatima, S., Mujib, A., y Samaj, J. (2011). Antioxidant enzyme responses during in vitro embryogenesis in *Catharanthus roseus*. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 86(6), 569–574. Doi: <https://doi.org/10.1080/14620316.2011.11512805>
- Fehér, A. (2015). Somatic embryogenesis—stress-induced remodeling of plant cell fate. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms*, 1849(4), 385–402. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2014.07.005>

- Fehér, A., Pasternak, T.P., y Dudits, D. (2003). Transition of somatic plant cells to an embryogenic state. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 74, 201–228. Doi: <https://doi.org/10.1023/A:1024033216561>
- Francllet, A., Boulay, M., Bekkaoui, F., Fouret, Y., Verschoore-Martouzet, B., y Walker, N. (1987). Rejuvenation. En Bonga, J. M. y Durzan, D. J. (Eds.), *Cell and Tissue Culture in Forestry*, Vol. 1, 232-248. M. Nijhoff, Dordrecht.
- Fujimura, T. (2014). Carrot somatic embryogenesis. A dream come true? *Plant Biotechnology Reports*, 8(1), 23–28. Doi: <https://doi.org/10.1007/s11816-013-0295-y>
- Fukuzaki, S. (2006). Mechanisms of Actions of Sodium Hypochlorite in Cleaning and Disinfection Processes. *Biocontrol Science*, 11(4), 147–157. Doi: <https://doi.org/10.4265/bio.11.147>
- Galicia, S., Velázquez, O., Luna, V., y Andrew, P. (2023). Cristales de oxalato de calcio en plantas: morfología y función. *Red de Biología Evolutiva*, Instituto de Ecología. Recuperado de: <https://www.inecol.mx/inecol/index.php/es/component/content/article/17-ciencia-hoy/2092-cristales-de-oxalato-de-calcio-en-plantas-morfologia-y-funcion>
- Gandhi, R., y Khurana, P. (2001). Regeneration from leaf protoplasts of *Arabidopsis thaliana* ecotype estland. *Indian Journal of experimental Biology*, 39(7), 705-709. PMID: 12019766. Recuperado de: [https://nopr.niscpr.res.in/bitstream/123456789/23844/1/IJEB%2039\(7\)%20705-709.pdf](https://nopr.niscpr.res.in/bitstream/123456789/23844/1/IJEB%2039(7)%20705-709.pdf)
- García, A. (1999). *Nuevos variantes somaclonales en Ficus lyrata, Ficus elastica, Ficus benjamina, Spathiphyllum y Syngonium*. Tesis de Doctorado (Ciencias Químicas). Departamento de Biotecnología. Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos. Universidad Politécnica de Valencia. 308 pp.
- García, L., Pérez, M., y Torres, D. (2015). Efecto de 6-BAP en la multiplicación in vitro de *Spathiphyllum wallisii* Regel. *Biotecnología Vegetal*, 15(1), 59-62. Recuperado de: <https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/article/view/10/491>
- Gerlach, G., y Schill, R. (1991). Composition of Orchid Scents Attracting Euglossine Bees. *Botanica Acta*, 104(5), 379–384. Doi: <https://doi.org/10.1111/j.1438-8677.1991.tb00245.x>
- Gómez, R. (1998). *Generalidades sobre la embriogénesis somática*. Resúmenes del curso internacional de Propagación Masiva in Vitro de Especies vegetales. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Santa Clara, Cuba. 134pp.
- Gosch, G., Bajaj, Y. P. S., y Reinert, J. (1975). Isolation, culture, and induction of embryogenesis in protoplasts from cell-suspensions of *Atropa belladonna*. *Protoplasma*, 86, 405-410. Doi: <https://doi.org/10.1007/BF01287489>

- Gulzar, B., Mujib, A., Rajam, M.V., Zafar, N., Mamgain, J., Malik, M., Syeed, S., y Ejaj, B. (2021). Shotgun label-free proteomic and biochemical study of somatic embryos (cotyledonary and maturation stage) in *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. *3 Biotech*, 11(86). Doi: <https://doi.org/10.1007/s13205-021-02649-3>
- Hansen, E. E., Hubstenberger, J. F., y Phillips, G. C. (1995). Regeneration of shoots from cell suspension-derived protoplasts of *Allium cepa*. *Plant Cell Reports*, 15, 8-11. Doi: <https://doi.org/10.1007/BF01690243>
- Hazubska, T., Ratajczak, E., Obarska, A., y Pers-Kamczyc, E. (2020). Different Roles of Auxins in Somatic Embryogenesis Efficiency in Two *Picea* Species. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(9), 3394. Doi: <https://doi.org/10.3390/ijms21093394>
- Hentrich, H., Kaiser, R., y Gottsberger, G. (2010). Floral biology and reproductive isolation by floral scent in three sympatric aroid species in French Guiana. *Plant Biology*, 12(4), 587-96. Doi: <https://doi.org/10.1111/j.1438-8677.2009.00256.x>
- Hu, C.Y., y Wang, P.J. (1986). *Embryo culture: technique and application*. En: Evans DA, Sharp WR, Ammirato PB (eds) Handbook of plant cell culture, 4. Macmillan, Nueva York, 43-96pp.
- Hurwitz, C. D., y Agrios, G. N. (1984). Isolation and culture of protoplasts from apple callus and cell suspension cultures. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 109(3), 348-350. Doi: <https://doi.org/10.21273/JASHS.109.3.348>
- IAUSA. (2016). *Fitohormonas: reguladores de crecimiento y bioestimuladores*. Recuperado de: <https://iausa.com.mx/fitohormonas-reguladores-de-crecimiento-y-bioestimulantes/>
- Ingle, S., y Kumbharkhane, A. (2020). Temperature dependent Broadband dielectric relaxation study of Aqueous Polyvinylpyrrolidone (PVP K-15, K-30 and K-90) using a TDR. *Physics and Chemistry of Liquids*, 59(5), 806-816. Doi: <https://doi.org/10.1080/00319104.2020.1836641>
- Jianjun, C., et.al. (2003). Cultural Guidelines for Commercial Production of Interiorscape *Spathiphyllum*. *Environmental Horticulture Department, UF/IFAS Extension*. Recuperado de: <https://edis.ifas.ufl.edu/publication/EP161>
- Jones, A. M., y Saxena, P. K. (2013). Inhibition of Phenylpropanoid Biosynthesis in *Artemisia annua* L.: A Novel Approach to Reduce Oxidative Browning in Plant Tissue Culture. *PLOS ONE*, 8(10). Doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0076802>

- Lekshmi, S., y Swapna, T. S. (2022). In vitro plant regeneration through somatic embryogenesis in *Anaphyllum wightii* Schott. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 58(6), 1099-1106. Doi: <https://doi.org/10.1007/s11627-022-10308-2>
- Liao, F. X., Wang, B. Q., Xu, F. N., Yang, Z. Y., y Wang, G. P. (2006). Growth and Physiological Characteristics of plantlets of *Spathiphyllum 'sensation'* in rooting phase as affected by sucrose-free medium and diffusive ventilation. *Acta Horticulturae*, 725, 325–332. Doi: <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2006.725.40>
- Lifeasible. (2023). *Adenine sulphate*. Recuperado de: <https://www.lifeasible.com/p/2069/adenine-sulphate/#:~:text=Adenine%20may%20be%20used%20as,chlorotic%20symptoms%20of%20the%20leaves>.
- López, C. (2017). *Micropropagación de tres variedades caña flecha (Gynerium sagittatum Aubl.)*. Tesis de Maestría (Biotecnología). Universidad de Córdoba, Departamento de Química, Montería.
- López, C. (2023). *Protoplastos*. Universidad de Málaga. Recuperado de: <https://www.uma.es/estudios/centros/Ciencias/publicaciones/encuentros/ENCUENTROS34/protop34.html#:~:text=%C2%BFQu%C3%A9%20es%20un%20protoplasto%3F%3A,enzim%C3%A1tica%20de%20la%20pared%20celular>.
- Maqsood, M., y Mujib, A. (2017). Yeast extract elicitation increases vinblastine and vincristine yield in protoplast derived tissues and plantlets in *Catharanthus roseus*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 27(5), 549–556. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2017.05.008>
- Martínez, A. (2004). *Enfermedades Más Comunes De Plantas Ornamentales En Georgia*. Extensión Cooperativa. La Universidad de Georgia. Colegio de Ciencias Agrícolas y Ambientales. Recuperado de: <https://extension.uga.edu/publications/detail.html?number=B1238-SP&title=enfermedades-mas-comunes-de-plantas-ornamentales-en-georgia#:~:text=Putridiones%20Radiculares%2C%20Putridiones%20Del%20Tallo%20y%20Ahogamiento&text=Las%20putridiones%20radiculares%20son%20las,en%20los%20jardines%20de%20Georgia>.
- Mayo, S J., Bogner, J., y Boyce, P. C. (1997). *The genera of Araceae*. Royal Botanic Gardens, Kew. ISBN 1900347229, 9781900347228.
- Melgarejo, J. (2011). Manejo integrado de enfermedades. Capítulo 11: Fungicidas. Mecanismo de acción de los fungicidas. *Ventana al Campo Andino*, 15, 193-202. Recuperado de: <http://hdl.handle.net/20.500.12324/19031>

- MembraPure. (2020). *Amino Acids in plants, as essential nutrients for plant growth. A possible field of application for amino acid análisis*. Recuperado de: <https://membrapure.de/wp-content/uploads/2020/11/Amino-Acids-in-plants-as-essential-nutrients-for-plant-growth-A-possible-field-of-application-for-amino-acid-analysis.pdf>
- Merkle, S.A., Parrott, W.A., y Flinn, B.S. (1995). Morphogenic Aspects of Somatic Embryogenesis. *In Vitro Embryogenesis in Plants*, 20, 155-203. Doi: https://doi.org/10.1007/978-94-011-0485-2_5
- Morais, J.P., Silva, A.J.d., Catrinck, M.N. *et al.* (2023). Embryonic abnormalities and genotoxicity induced by 2,4-dichlorophenoxyacetic acid during indirect somatic embryogenesis in Coffea. *Science Reports*, 13(9689). Doi: <https://doi.org/10.1038/s41598-023-36879-7>
- Moreno, A. (2022). *Caracterización de plantas amazónicas con actividad antiofídica por análisis químico*. Tesis de Maestría (Química). Facultad de ingeniería en sistemas, electrónica e industrial. Universidad Técnica de Ambato. Ecuador. 108 pp.
- Mota, L., Herrera, G., Ayora, T., Santana, N., y López, G. (2018). Isolation and regeneration of protoplasts from leaf explants of *Rhyncholaelia digbyana*. *African Journal of Biotechnology*, 17(35), 1082-1089. Doi: <https://doi.org/10.5897/AJB2018.16540>
- Mouaad, M., Naciri, R., Belkoura, I. (2020). Maturation and Conversion of Somatic Embryos Derived from Seeds of Olive (*Olea europaea* L.) cv. Dahbia: Occurrence of Secondary Embryogenesis and Adventitious Bud Formation. *Plants*, 9(11). Doi: <https://doi.org/10.3390/plants9111489>
- Mujib, A., Ali, M., Tonk, D., Isah, T., y Zafar, N. (2016). Embryogenesis in ornamental monocots: Plant growth regulators as signalling element. *Somatic embryogenesis in ornamentals and its applications*, 187–201. Doi: https://doi.org/10.1007/978-81-322-2683-3_12
- Mujib, A., Tonk, D., Gulzar, B., Maqsood, M., y Ali, M. (2020). Quantification of taxol by high performance thin layer chromatography (HPTLC) in *Taxus wallichiana* callus cultivated in vitro. *Biotechnologia*, 101(4), 337–347. Doi: <https://doi.org/10.5114/bta.2020.100425>
- Murashige, T y Skoog, F. (1962). A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue. *Physiologia Plantarum*, 15(3), 473-497. Doi: <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
- National Human Genome Research Institute [NHGRI]. (2024). *Células somáticas*. Recuperado de: <https://www.genome.gov/es/genetics-glossary/Celulas-somaticasm>

- NCBI. (2023). Recuperado de: <https://lifemap-ncbi.univ-lyon1.fr/?tid=78381>
- North Carolina State University[NCSU]. (2023). *Spathiphyllum*. *Spathiphyllum* (Mauna Loa Peace Lily, Peace Lily, Spathe Flower, White Sails). Recuperado de: <https://plants.ces.ncsu.edu/plants/spathiphyllum/>
- PDBe. (2019). *Growth*. Protein Data Bank in Europe. Recuperado de: <https://www.ebi.ac.uk/pdbe/news/growth#:~:text=Auxins%20%E2%80%93%20function%20and%20structure&text=Therefore%2C%20although%20auxins%20can%20be,and%20decreases%20towards%20the%20roots.>
- Pfizer. (2019). *Ficha técnica Agri-mycin® 500*. Recuperado de: <https://agrisolver.s3.amazonaws.com/1539/Ficha-T%C3%A9cnica-AGRI-MYCIN%C2%AE-500-Zoetis-%28M%C3%A9xico%29.pdf>
- PhytoTech Labs. (2022). *Polyvinylpyrrolidone, PVP-40*. Recuperado de: <https://phytotechlab.com/polyvinylpyrrolidone-pvp-40.html>
- PhytoTech Labs. (2024). *Macerozyme R-10*. Recuperado de: <https://phytotechlab.com/macerozyme-r-10.html>
- PictureThis. (2023). *Peace Lily (Spathiphyllum Cochlearispathum) flower, Leaf, care, uses*. Recuperado de: https://www.picturethisai.com/wiki/Spathiphyllum_cochlearispathum.html
- Plants Rescue. (2023). *Spathiphyllum wallisii*. Recuperado de: <https://www.plantsrescue.com/posts/spathiphyllum-wallisii>
- Polo, J., Suárez, I., y Gatti, K. (2013). Micropropagación de *Tectona grandis* L. F. a partir de meristemos pre-existentes. *Temas Agrarios*, 18(2), 83-93. Doi: <https://doi.org/10.21897/ta.v18i2.718>
- PortalTECNOAGRICOLA. (2024). *Agri-mycin 500*. Recuperado de: <https://www.buscador.portalteconoagricola.com/vademecum/mex/producto/17880/AGRI-MYCIN%20500>
- Portillo, G. (2020). *Spathiphyllum, la planta que más oxigena los ambientes*. Recuperado de: <https://www.jardineriaon.com/spathiphyllum-la-planta-que-mas-oxigena-los-ambientes.html>
- Potrykus, I., y Shillito, R. D. (1986). Protoplasts: Isolation, culture, plant regeneration. *Methods in Enzymology*, 118, 549–578. Doi: [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(86\)18101-8](https://doi.org/10.1016/0076-6879(86)18101-8)
- Power, J.B, Davey, M.R., McLellan, M., y Wilson, D. (1989). *Laboratory Manual Plant Tissue Culture*. Grupo de Manipulación Fitogenética. Departamento de Botánica. Universidad de Nottingham. 194 pp.

- Probiotek. (2023). *Macerozyme R-10*. Recuperado de: <https://www.probiotek.com/productos/reactivos/macerozyme-r-10/>
- QUIMICA. ES. (2023). *Celulasa*. Recuperado de: <https://www.quimica.es/enciclopedia/Celulasa.html>
- Raj, A. (2023). *Protoplast Culture: Stages and Methods*. Biotechnology. Biology Discussion. Recuperado de: <https://www.biologydiscussion.com/protoplasts/protoplast-culture-stages-and-methods-biotechnology/61344>
- Ramírez, M.A. (2022). Somatic Embryogenesis: Methods and Protocols. Somatic Embryogenesis. Methods and Protocols. *Methods in Molecular Biology*, 2527. Humana, Nueva York, NY. ISBN: 1071624849, 9781071624845. Doi: <https://doi.org/10.1007/978-1-0716-2485-2>
- Ramírez, R., Borodanenko, A., Barrera, J. L., y Ochoa, N. (2001). Shoot number and shoot size as affected by growth regulators in in vitro cultures of *Spathiphyllum floribundum* L. *Scientia Horticulturae*, 89(3), 227–236. Doi: [https://doi.org/10.1016/S0304-4238\(00\)00236-3](https://doi.org/10.1016/S0304-4238(00)00236-3)
- Rao, K. S., y Prakash, A. H. (1995). A simple method for the isolation of plant protoplasts. *Journal of Biosciences*, 20, 645-655. Doi: <https://doi.org/10.1007/BF02703304>
- Rego, L.D., y Faria, R.T. (2001). Tissue culture in ornamental plant breeding: a review. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, 1(3), 283-299. Doi: 10.13082/1984-7033.v01n03a09
- Regulación Comunidad Europea. (2008). Regulation (EC) no 1333/2008 of the european parliament and of the council on food additives. Recuperado de: <http://eurlex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CONSLEG:2008R1333:20120813:EN:PDF>
- Ren, J., Wang, X., y Yin, J. (2010). Dicamba and Sugar Effects on Callus Induction and Plant Regeneration from Mature Embryo Culture of Wheat. *Agricultural Sciences in China*, 9(1), 31–37. Doi: [https://doi.org/10.1016/S1671-2927\(09\)60064-X](https://doi.org/10.1016/S1671-2927(09)60064-X)
- Ren, R., Gao, J., Yin, D., Li, K., Lu, C., Ahmad, S., Wei, Y., Jin, J., Zhu, G., y Yang, F. (2021). Highly Efficient Leaf Base Protoplast Isolation and Transient Expression Systems for Orchids and Other Important Monocot Crops. *Frontiers in Plant Science*, 12. Doi: <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.626015>
- Rodríguez, F. I., Esch, J. J., Hall, A. E., Binder, B. M., Schaller, G. E., y Bleecker, A. B. (1999). A Copper Cofactor for the Ethylene Receptor ETR1 from Arabidopsis. *Science*, 283(5404), 996–998. Doi: 10.1126/science.283.5404.996

- Rodríguez, M., Gómez, R., Martínez, S.J., Pons, M., Pérez, M., La "O" Cárdenas, M., y Romero, C. (2015). Formación de embriones somáticos a partir de semillas inmaduras en *Sorghum bicolor* variedad CIAP 132-R. *Acta Biológica Colombiana*, 20(2), 237-245. Doi: <http://dx.doi.org/10.15446/abc.v20n2.42302>
- Saad, A.I.M., y Elshahed, A.M. (2012). *Plant Tissue Culture Media*, IntechOpen. Recuperado de: <https://www.intechopen.com/chapters/40181>
- Salgado, J. (2007). *Cultivo in vitro de Anthurium andreanum*. Monografía. Universidad Tecnológica de Pereira. Facultad de Tecnología. 91pp.
- Schaller, G. E., Bishopp, A., y Kieber, J. J. (2015). The Yin-Yang of Hormones: Cytokinin and Auxin Interactions in Plant Development. *The Plant Cell Online*, 27(1), 44–63. Doi: <https://doi.org/10.1105/tpc.114.133595>
- Schulz, M., y Weissenböck, G. (1986). Isolation and Separation of Epidermal and Mesophyll Protoplasts from Rye Primary Leaves — Tissue-Specific Characteristics of Secondary Phenolic Product Accumulation. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 41(1-2), 22-27. Doi: <https://doi.org/10.1515/znc-1986-1-205>
- Scientificbio. (2022). *pH In Cell Culture – How Does pH Buffered Culture Media Work?* Scientific Bioprocessing. Recuperado de: <https://www.scientificbio.com/blog/ph-in-cell-culture-how-does-ph-buffered-culture-media-work/#:~:text=Changes%20in%20pH%20in%20the,is%20slightly%20lower%20at%207.2.>
- Sharma, S.K., Bryan, G.J., y Millam, S. (2007). Auxin pulse treatment holds the potential to enhance efficiency and practicability of somatic embryogenesis in potato. *Plant Cell Reports*, 26(7), 945–950. Doi: <https://doi.org/10.1007/s00299-007-0319-6>
- Sharry, S., Adema, M., y Abedini, W. (2015). *Plantas de probeta; Manual para la propagación de plantas por cultivo de tejidos in vitro*. Libros de Cátedra. Universidad Nacional de La Plata. Editorial de la Universidad de La Plata. 240pp.
- Sherrington, P., y George, F. (1984). *Plant propagation by tissue culture*. Handbook and Directory of commercial Laboratories. Exegetics limited. Inglaterra. ISBN: 9780950932507, 0950932507. 709pp.
- Shoitiro, I. (1968). Effects of mannitol on protoplasts of *Saccharomyces cerevisiae*. *Plant and Cell Physiology*, 9(3), 573–576. Doi: <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a079375>
- Singh, A. (2023). *Protoplast Culture: Isolation and Culture Methods*. Plant Cell Technology. Recuperado de: <https://www.plantcelltechnology.com/blogprotoplast-culture-isolation-and-culture->

[methods/#:~:text=Protoplast%20is%20defined%20as%20naked,artificial%20medium%20and%20environmental%20conditions.](#)

- Skirvin, R. M., Chu, M. C., Mann, M. L., Young, H., Sullivan, J., y Fermanian, T. (1986). Stability of tissue culture medium pH as a function of autoclaving, time, and cultured plant material. *Plant Cell Reports*, 5(4), 292–294. Doi: <https://doi.org/10.1007/BF00269825>
- Smith, R. (2013). *Plant Tissue Culture; Techniques and Experiments*. (3ª edición). Elsevier. ISBN: 978-0-12-415920-4.
- Steiner, A., y Winden, H. (1970). Recipe for ferric salts of ethelenediaminetetracetic acid. *Plant Physiology*, 46(6), 862-863. Doi: <https://doi.org/10.1104/pp.46.6.862>
- Steward, F., Mapes, M., y Mears, K. (1958). Growth and development of cultured cells 2. Organization in cultures grown from freely suspended cells. *American Journal of Botany*, 45(10), 705-708. Doi: <https://doi.org/10.2307/2439728>
- Stonier, T. (1971). *Les cultures des tissus de plantes*, Vol. 193. En CNRS Colloques Internationaux, Paris. 511pp.
- Su, W. (2002). *Chapter 10: Cell culture and regeneration of plant tissues*. En: G. Khachatourians, A. McHughen, R. Scorza, W. Nip, Y. Hui (Eds.). *Transgenic-Plants and Corps*. Ed. Marcel Dekker Inc. Nueva York. 151–167.
- Suárez, I. (2011). *Reguladores de Crecimiento Vegetal en el Cultivo de Tejidos In Vitro*. XLI Congreso Anual COMALFI, Ibagué 21-23 septiembre, 91-94.
- Suárez, I. (2020). *Cultivo de Tejidos Vegetales*. Fondo Editorial Universidad de Córdoba, Cra. 6 No. 77-305. Montería, Colombia. ISBN 978-958-5104-09-9.
- Suárez, I., Acosta, C., y Gatti, K. (2013). Multiplicación in vitro de árboles adultos de *Gmelina arborea* Roxb. *Revista U.D.C.A Actualidad y Divulgación Científica*, 16(1), 97–102. Doi: <https://doi.org/10.31910/rudca.v16.n1.2013.863>
- Suárez, I., Ortiz, O., y López, C. (2017). Arrow cane (*Gynerium sagittatum* Aubl.) in vitro rhizome formation and plantlet recovery. *Temas Agrarios*, 22(1), 9-18. Doi: <https://doi.org/10.21897/rta.v22i1.911>
- Suárez, I., y Otero, R. (2016). Ácido abscísico y sacarosa afectan la producción in vitro de tuberos de ñame (*Dioscorea rotundata* Poir.). *Temas Agrarios*, 21(1), 9-17. Doi: <https://doi.org/10.21897/rta.v21i1.866>
- Suyash. (2023, Octubre 10). *8 amazing peace lily benefits proven in studies*. Balcony Garden Web. Recuperado de: <https://balconygardenweb.com/peace-lily-benefits-plant/>

- Tabiyeh, D.T., Bernard, F., y Shacker, H. (2006). Investigation of Glutathione, Salicylic Acid and GA3 Effects on Browning in Pistacia vera Shoot Tips Culture. *Acta Horticulturae*, 726, 201-204. Doi: <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2006.726.31>
- TCKlean Lab. (2023). *Polisorbato 20 (Tween® 20)*. Recuperado de: <https://www.tckleanlab.com/polisorbato-20-tween-20/>
- Team, F. (2023, Febrero 12). *9 incredible peace lily benefits that make your jaw drop*. Florist kid. Recuperado de: <https://floristkid.com/peace-lily-benefits/>
- Teixeira Da Silva, J. A., Giang, D. D. T., y Tanaka, M. (2006). Photoautotrophic micropropagation of Spathiphyllum. *Photosynthetica*, 44(1), 53–61. Doi: <https://doi.org/10.1007/s11099-005-0158-z>
- Thomas, T. D. (2008). The role of activated charcoal in plant tissue culture. *Biotechnology Advances*, 26(6), 618–631. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2008.08.003>
- Tomiczak, K., Mikuła, A., Niedziela, A., Wójcik-Lewandowska, A., Domżalska, L., y Rybczyński, J. J. (2019). Somatic Embryogenesis in the Family Gentianaceae and Its Biotechnological Application. *Frontiers in Plant Science*, 10. Doi: <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00762>
- Toriyama, K., y Hinata, K. (1985). Cell suspension and protoplast culture in rice. *Plant Science*, 41(3), 179-183. Doi: [https://doi.org/10.1016/0168-9452\(85\)90086-X](https://doi.org/10.1016/0168-9452(85)90086-X)
- Torné, J. M., Moysset, L., Santos, M., y Simon, E. (2001). Effects of light quality on somatic embryogenesis in Araujia sericifera. *Physiologia Plantarum*, 111(3), 405–411. Doi: <https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.2001.1110319.x>
- Torres, K. (1989). *Tissue culture techniques for horticultural crops*. Springer EU: Nueva York, Londres: Chapman and Hall. ISBN: 978-1-4615-9758-2, 978-1-4615-9756-8
- Torres, L., Suárez, I., y Gatti, K. (2013). Propagación in vitro de Acacia mangium Willd. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 11(1), 81-87. Recuperado de: <https://revistas.unicauca.edu.co/index.php/biotecnologia/article/view/266>
- Toth, K., Haapala, T., y Hohtola, A. (1994). Alleviation of browning in oak explants by chemical pretreatments. *Biologia Plantarum*, 36, 511–517. Doi: <https://doi.org/10.1007/BF02921170>
- Uchendu, E.E., Paliyath, G., Brown, D.C., y Saxena, P.K. (2011). In vitro propagation of North American ginseng (Panax quinquefolius L.). *In Vitro Cellular & Developmental Biology. Plant*, 47(6), 710–718. Doi: <https://doi.org/10.1007/s11627-011-9379-y>
- Un cuarto verde. (2021). *Spathiphyllum sensation*. Recuperado de: <https://www.uncuartoverde.pe/product-page/anturio-supremo>

- Vásquez, S., Cruz, C. A., Santiago, M., y Bello, J. J. (2021). Evaluation of different antioxidants during in vitro establishment of allspice (*Pimenta dioica* L. Merrill): a recalcitrant species. *Agro Productividad*. Doi: <https://doi.org/10.32854/agrop.v14i11.2167>
- Verdeguer, A. (1985). Daños causados en las plantas ornamentales por Bacterias, Virus y Micoplasmas. *Hojas divulgadoras. Publicaciones agrarias, pesqueras y alimentarias. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, Servicio de extensión Agraria*. ISBN: 8434104954, 9788434104952. 20pp.
- Vinterhalter, D., y Vinterhalter, B. (1997). Micropropagation of *Dracaena* Species. *High-Tech and Micropropagation VI. Biotechnology in Agriculture and Forestry*, 40, 131-146. Doi: https://doi.org/10.1007/978-3-662-03354-8_10
- Von Anderkas, P., Teyssier, C., Charpentier, J. P., Gutmann, M., Pâques, L., Le Metté, C., Lelu, M. A. (2015). Effect of light conditions on anatomical and biochemical aspects of somatic and zygotic embryos of hybrid larch (*Larix × marschlinii*). *Annals of Botany*, 115(4), 605–615. Doi: <https://doi.org/10.1093/aob/mcu254>
- Von Arnold, S., Sabala, I., Bozhkov, P., Dyachok, J., y Filonova, L. (2002). Developmental pathways of somatic embryogenesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 69(3), 233–249. Doi: <https://doi.org/10.1023/A:1015673200621>
- Voz de las Empresas. (2021). *Floricultura: gran potencial de desarrollo*. Recuperado de: <https://vozelasempresas.org/floricultura-gran-potencial-de-desarrollo/>
- Wagner, A. M., Krab, K., Wagner, M. J., y Moore, A. L. (2008). Regulation of thermogenesis in flowering Araceae: the role of the alternative oxidase. *Biochim Biophys Acta*, 1777(7-8), 993-1000. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2008.04.001>.
- Wang, Z. Y., Nagel, J., Potrykus, I., y Spangenberg, G. (1993). Plants from cell suspension-derived protoplasts in *Lolium* species. *Plant Science*, 94(1-2), 179-193. Doi: [https://doi.org/10.1016/0168-9452\(93\)90019-V](https://doi.org/10.1016/0168-9452(93)90019-V)
- Watad, A.A., Raghothama, K.G., Kochba, M., Nissim, A., y Gaba, V. (1997). Micropropagation of *Spathiphyllum* and *Syngonium* is facilitated by use of interfacial membrane rafts. *HortScience*, 32(2), 307-308. Doi: <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.32.2.307>
- Waters. (2024). Guía completa sobre la hidrólisis y el análisis de aminoácidos. *Introducción a la hidrólisis*. Recuperado de: [Introducción a la hidrólisis | Waters](https://www.waters.com)
- Yao, X., Zhao, W., Yang, R., Wang, J., Zhao, F., y Wang, S. (2018). Preparation and applications of guard cell protoplasts from the leaf epidermis of *Solanum lycopersicum*. *Plant methods*, 14(1), 1-9. Doi: <https://doi.org/10.1186/s13007-018-0294-7>

- Yu, B., Liao, F., Liu, J., Sun, Y., y Huang, L. (2016). Efficient regeneration and transformation of *Spathiphyllum cannifolium*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 127(2), 325–334. Doi: <https://doi.org/10.1007/s11240-016-1052-z>
- Zhao, J., Cui, J., Liu, J., Liao, F., Henny, R. J., y Chen, J. (2012). Direct somatic embryogenesis from leaf and petiole explants of *Spathiphyllum* ‘Supreme’ and analysis of regenerants using flow cytometry. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 110, 239-249. Doi: <https://doi.org/10.1007/s11240-012-0146-5>
- Zhou, Z., Zhang, G., Liu, C., y Zhang, L. (2018). Study on somatic embryogenesis and histology of *Spathiphyllum floribundum*. *Genomics and Applied Biology*, 37(8), 3489-3494.
- Zimmerman, J. L. (1993). Somatic Embryogenesis: A Model for Early Development in Higher Plants. *The plant cell online*, 5(10), 1411–1423. Doi: <https://doi.org/10.2307/3869792>

ANEXOS

Anexo 1. Medios de cultivo y soluciones concentradas

Tabla 1. Medios que se probaron en el CAPÍTULO IV y CAPÍTULO VI, cantidades para un litro (1x)

Medio	CAPÍTULO IV			CAPÍTULO VI		
	Brotos			Inflorescencia		
	ST-1	ST-2	ST-A	ST-C		ST-I
				(inducción)	(maduración)	(inducción)
Componentes						
Sales MS I-V	100%					
Sales B5 I-V				100%		
Sales N6 I-V						100%
Vit-R2				100%		
Cock-22 (ml)	5	10				
Cock-20 (ml)						10
L-cisteína				1g		
Prolina						2.5g
Caseína hidrolizada					100mg	200mg
Glicina				2mg		
Adenina						1mg
2,4-D						2mg
ANA					1mg	
AIB	0.05mg					
Dicamba				5mg	2.5mg	
BA	7mg		3mg	0.5mg		0.3mg
AG ₃			3mg			
AA				100mg		
AC				100mg		

PVP	0.25g	
Sacarosa	30g	
pH	5.7	
Gelzan	3.5g	
Cefotaxima	250mg	
Vancomicina	25 mg	
Ketoconazol	50mg	
Nistatina	50mg	

Procedimiento para preparar medio de cultivo con antibióticos y antifúngicos: En un vaso de precipitados con 200 ml de agua deionizada estéril se vierten las soluciones anteriores en el siguiente orden: Sales del medio I-V, Vit-R2 o cockteles, aminoácidos en solución, auxina, citocinina, posteriormente en una balanza analítica se pesan los aminoácidos en reactivo así como los ácidos y en una balanza granataria digital la sacarosa, una vez pesados se añaden uno por uno esperando a que se disuelva cada uno para añadir el siguiente, se ajusta el pH a 5.7 utilizando NaOH o HCl de concentraciones 0.1 N- 1N, posteriormente se afora a 1 litro y se vuelve a medir el pH, después se añade el Gelzan esparciéndolo en forma uniforme para evitar la formación de grumos; se homogeniza el medio de cultivo durante 1 minuto; posteriormente se coloca en el horno de microondas para que se disuelva totalmente por la temperatura tomando el tiempo aproximado de 1 min/100ml (si se sirve afuera de la campana de flujo laminar) y si se sirve dentro de la campana basta con poner 2 min/1l. Finalmente se saca el medio de cultivo del microondas, se homogeniza una vez más; se tapa con papel aluminio y cinta; se coloca dentro de la autoclave previamente precalentada. Se esteriliza durante 18 min, a una temperatura de 122°C y a una presión de 1.2 kg/cm². Pasado el tiempo de esterilización se espera a que baje la presión de la autoclave a 0 kg/cm², se saca el medio de cultivo y se sirve en la campana de flujo laminar en frascos estériles de la siguiente forma: lavarse las manos muy bien; ponerse cofia, cubrebocas y bata; esperar a que baje la temperatura del medio con ayuda de

la agitación de una parrilla de agitación, la temperatura óptima se considera cuando al poner el antebrazo en contacto con el vaso de precipitados es soportable y no quema; se añaden los antibióticos y antifúngicos con ayuda de jeringas estériles; esperar un poco a que homogenice el medio, servir en frascos estériles 12 ml de medio si son frascos chicos y 25 ml de medio si son frascos estándares, tapar frascos y etiquetar.

Tabla 2. Soluciones concentradas (100x) del medio de cultivo conocido como MS (Murashige y Skoog, 1962)

NOMBRE DEL COMPUESTO	FÓRMULA	1L (g)	500 mL (g)	250 mL (g)	100 mL (g)	50 mL (g)
Solución I: NITRATOS						
Nitrato de Potasio	KNO ₃	190	95	47.5	19	9.5
Sulfato de Amonio	(NH ₄) ₂ SO ₄	165	82.5	41.25	16.5	8.25
Solución II: SULFATOS						
Sulfato de Magnesio	MgSO ₄ .7H ₂ O	37	18.5	9.25	3.7	1.85
Sulfato de Manganeso	MnSO ₄ .4H ₂ O	2.23	1.115	0.5575	0.223	0.1115
	MnSO ₄ .H ₂ O	1.69	0.845	0.4225	0.169	0.0845
Sulfato de zinc	ZnSO ₄ .7H ₂ O	0.86	0.43	0.215	0.086	0.043
Sulfato de cobre *	CuSO ₄ .5H ₂ O	0.0025*	0.00125*	0.000625*	0.00025*	0.000125*
Solución III: HALÓGENOS						
Cloruro de Calcio	CaCl ₂ .2H ₂ O	44	22	11	4.4	2.2
	CaCl ₂ .H ₂ O	38.5	19.25	9.625	3.85	1.925
	CaCl ₂	33.2	16.6	8.3	3.32	1.66
Yoduro de Potasio	KI	0.083	0.0415	0.02075	0.0083	0.00415
Cloruro de Cobalto *	CoCl ₂ .6H ₂ O	0.0025*	0.00125*	0.000625*	0.00025*	0.000125*
Solución IV: FOSFATO, ÁCIDO BÓRICO, MOLIBDATO						
Fosfato de Potasio	KH ₂ PO ₄ .H ₂ O	19.248	9.624	4.812	1.9248	0.9624
	KH ₂ PO ₄	17	8.5	4.25	1.7	0.85

	K_2HPO_4	21.76	10.88	5.44	2.176	1.088
Ácido bórico	H_3BO_3	0.62	0.31	0.155	0.062	0.031
Molibdato de sodio*	$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	0.025*	0.0125*	0.00625*	0.0025*	0.00125*
Solución V: QUELANTES						
Sulfato ferroso	$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	2.784	1.392	0.696	0.2784	0.1392
Na2EDTA	$C_{10}H_{14}N_2O_8Na_2$	3.36	1.68	0.84	0.336	0.168
Na2EDTA.2H2O	$C_{10}H_{14}N_2O_8Na_2 \cdot 2H_2O$	3.724	1.862	0.931	0.3724	0.1862

*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 solución madre 100x de un volumen de 50 ml

*1 ml para preparar solución madre 100x de un volumen de 100 ml

*2.5 ml para preparar solución madre 100x de un volumen de 250 ml

Tabla 3. Medio de cultivo conocido como MS (Murashige y Skoog, 1962)

NOMBRE DEL COMPUESTO	FÓRMULA	P.M. (g)	CANTIDADES PARA UN LITRO (1X) EN:	
			MASA (mg)	MOLES (mM)
COMPUESTOS INORGÁNICOS				
Macronutrientes				
Nitrato de Potasio	KNO_3	101.108	1900	18.791
Nitrato de Amonio	NH_4NO_3	80.04	1650	20.614
Cloruro de Calcio	$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	147.02	440	2.993
	$CaCl_2 \cdot H_2O$	128.99	385.93	2.993
	$CaCl_2$	110.99	332.08	2.993
Sulfato de Magnesio	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	246.498	370	1.501
Fosfato de Potasio	$KH_2PO_4 \cdot H_2O$	154.086	192.48	1.249
	KH_2PO_4	136.09	170	1.249
	K_2HPO_4	174.2	217.6	1.249
Sulfato de Amonio	$(NH_4)_2SO_4$	132.146	134	1.014

Micronutrientes				
Sulfato de Manganeso	MnSO ₄ .4H ₂ O	223.0618	22.3	0.099
	MnSO ₄ .H ₂ O	169.01	16.7	0.099
Sulfato de Zinc	ZnSO ₄ .7H ₂ O	287.54	8.6	0.0299
Ácido Bórico	H ₃ BO ₃	61.86	6.2	0.1002
Yoduro de Potasio	KI	166.01	0.83	4.99x10 ⁻³
Sulfato de cobre	CuSO ₄ .5H ₂ O	249.68	0.025	0.1μM
Molibdato de sodio	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	241.95	0.25	1.03μM
Cloruro de Cobalto	CoCl ₂ .6H ₂ O	237.93	0.025	0.105μM
Sulfato ferroso	FeSO ₄ .7H ₂ O	278.028	27.8	0.1
Na ₂ EDTA	C ₁₀ H ₁₄ N ₂ O ₈ Na ₂	336.2	33.28	0.099
Na ₂ EDTA.2H ₂ O	C ₁₀ H ₁₄ N ₂ O ₈ Na ₂ .2H ₂ O	372.3	37.3	0.099
COMPUESTOS ORGÁNICOS				
AMINOÁCIDOS				
Glicina	C ₂ H ₅ NO ₂	75.07	NO	0
VITAMINAS				
Myo-Inositol	C ₆ H ₁₂ O ₆	180.2	100	0.555
Tiamina-HCl	C ₁₂ H ₁₇ ClN ₄ S.HCl	337.3	10	0.00296
Ácido Nicotínico	C ₆ H ₅ NO ₂	123.1	1	8.123x10 ⁻³
Piridoxina-HCl	C ₈ H ₁₁ NO ₃ .HCl	205.6	1	4.864x10 ⁻³

Tabla 4. Soluciones concentradas (100x) del medio de cultivo conocido como B5 (Gamborg *et.al.*, 1968)

NOMBRE DEL COMPUESTO	FÓRMULA	1L (g)	500 mL (g)	250 mL (g)	100 mL (g)	50 mL (g)
Solución I: NITRATOS						
Nitrato de Potasio	KNO ₃	250	125	62.5	25	12.5

Sulfato de Amonio	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	13.4	6.7	3.35	1.34	0.67
Solución II: SULFATOS						
Sulfato de Magnesio	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	25	12.5	6.25	2.5	1.25
Sulfato de Manganeso	$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	1	0.5	0.25	0.1	0.05
	$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	1.31	0.655	0.3275	0.131	0.0655
Sulfato de zinc	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.2	0.1	0.5	0.02	0.01
Sulfato de cobre *	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.0025*	0.00125*	0.000625*	0.00025*	0.000125*
Solución III: HALÓGENOS						
Cloruro de Calcio	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	15	7.5	3.75	1.5	0.75
	$\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	13.156	6.578	3.289	1.315	0.657
	CaCl_2	11.32	5.66	2.83	1.132	0.566
Yoduro de Potasio	KI	0.075	0.0375	0.01875	0.0075	0.00375
Cloruro de Cobalto *	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.0025*	0.00125*	0.000625*	0.00025*	0.000125*
Solución IV: FOSFATO, ÁCIDO BÓRICO, MOLIBDATO						
Fosfato de sodio	$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	15	7.5	3.75	1.5	0.75
	$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	13.247	6.623	3.311	1.324	0.662
	NaH_2PO_4	11.51	5.755	2.8775	1.151	0.5755
Ácido bórico	H_3BO_3	0.3	0.15	0.075	0.03	0.015
Molibdato de sodio*	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.025*	0.0125*	0.00625*	0.0025*	0.00125*
Solución V: QUELANTES						
Sulfato ferroso	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	2.11	1.055	0.527	0.211	0.105
Na2EDTA	$\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_8\text{Na}_2$	2.55	1.275	0.6375	0.255	0.1275
Na2EDTA.2H2O	$\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_8\text{Na}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	2.82	1.41	0.705	0.282	0.141

Tabla 5. Medio de cultivo conocido como B5 (Gamborg *et al.*, 1968)

NOMBRE DEL COMPUESTO	FÓRMULA	P.M. (g)	CANTIDADES PARA UN LITRO (1X) EN:	
			MASA (mg)	MOLES (mM)
COMPUESTOS INORGÁNICOS				
Macronutrientes				
Nitrato de Potasio	KNO ₃	101.108	2500	24.726
Cloruro de Calcio	CaCl ₂ .2H ₂ O	147.02	150	1.02
	CaCl ₂ .H ₂ O	128.99	131.56	1.02
	CaCl ₂	110.99	113.2	1.02
Sulfato de Magnesio	MgSO ₄ .7H ₂ O	246.498	250	1.014
Fosfato de sodio	NaH ₂ PO ₄ .2H ₂ O	156.01	150	0.96
	NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	137.99	132.47	0.96
	NaH ₂ PO ₄	119.98	115.18	0.96
Sulfato de Amonio	(NH ₄) ₂ SO ₄	132.146	134	1.014
Micronutrientes				
Sulfato de Manganeso	MnSO ₄ .4H ₂ O	223.0618	13.16	0.059
	MnSO ₄ .H ₂ O	169.01	10	0.059
Sulfato de Zinc	ZnSO ₄ .7H ₂ O	287.55	2	0.00695
Ácido Bórico	H ₃ BO ₃	61.833	3	0.048
Yoduro de Potasio	KI	166.01	0.75	0.00451
Sulfato de cobre	CuSO ₄ .5H ₂ O	249.68	25µg	1.001x10 ⁻⁴
Molibdato de sodio	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	241.95	250µg	0.001033
Cloruro de Cobalto	CoCl ₂ .6H ₂ O	237.93	25µg	1.05x10 ⁻⁴
Sulfato ferroso	FeSO ₄ .7H ₂ O	278	21.128	0.076
Na ₂ EDTA	C ₁₀ H ₁₄ N ₂ O ₈ Na ₂	336.2	25.55	0.076

Na ₂ EDTA.2H ₂ O	C ₁₀ H ₁₄ N ₂ O ₈ Na ₂ .2H ₂ O	372.2	28.28	0.076
COMPUESTOS ORGÁNICOS				
AMINOÁCIDOS				
Glicina	C ₂ H ₅ NO ₂	75.07	NO	0
VITAMINAS				
Myo-Inositol	C ₆ H ₁₂ O ₆	180.2	100	0.555
Tiamina-HCl	C ₁₂ H ₁₇ ClN ₄ O ₄ S.HCl	337.3	10	0.00296
Ácido Nicotínico	C ₆ H ₅ NO ₂	123.1	1	8.123x10 ⁻³
Piridoxina-HCl	C ₈ H ₁₁ NO ₃ .HCl	205.6	1	4.864x10 ⁻³

Tabla 6. Soluciones concentradas (100 x) del medio de cultivo conocido como N₆ (Chu *et.al*, 1972)

NOMBRE DEL COMPUESTO	FÓRMULA	1L (g)	500 mL (g)	250 mL (g)	100 mL (g)	50 mL (g)
Solución I: NITRATOS						
Nitrato de Potasio	KNO ₃	283	141.5	70.75	28.3	14.15
Sulfato de Amonio	(NH ₄) ₂ SO ₄	46.3	23.15	11.575	4.63	2.315
Solución II: SULFATOS						
Sulfato de Magnesio	MgSO ₄ .7H ₂ O	18.5	9.25	4.625	1.85	0.925
Sulfato de Manganeso	MnSO ₄ .4H ₂ O	0.44	0.22	0.11	0.044	0.022
	MnSO ₄ .H ₂ O	0.332	0.166	0.083	0.0332	0.0166
Sulfato de zinc	ZnSO ₄ .7H ₂ O	0.15	0.075	0.0375	0.015	0.0075
Solución III: HALÓGENOS						
Cloruro de Calcio	CaCl ₂ .2H ₂ O	16.6	8.3	4.15	1.66	0.83
	CaCl ₂ .H ₂ O	14.56	7.28	3.64	1.456	0.728
	CaCl ₂	12.53	6.265	3.13	1.25	0.626
Yoduro de Potasio	KI	0.08	0.04	0.02	0.008	0.004

Solución IV: FOSFATO, ÁCIDO BÓRICO						
Fosfato de Potasio	$\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	45.14	22.57	11.28	4.51	2.25
	KH_2PO_4	40	20	10	4	2
	K_2HPO_4	51.04	25.52	12.76	5.104	2.552
Ácido bórico	H_3BO_3	0.16	0.08	0.04	0.016	0.008
Solución V: QUELANTES						
Sulfato ferroso	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	2.78	1.39	0.695	0.278	0.139
Na2EDTA	$\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_8\text{Na}_2$	3.365	1.6825	0.84125	0.3365	0.16825
Na2EDTA.2H2O	$\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_8\text{Na}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	3.73	1.865	0.9325	0.373	0.1865

Tabla 7. Medio de cultivo conocido como N₆ (Chu *et.al.*, 1972)

NOMBRE DEL COMPUESTO	FÓRMULA	P.M. (g)	CANTIDADES PARA UN LITRO (1X) EN:	
			MASA (mg)	MOLES (Mm)
COMPUESTOS INORGÁNICOS				
Macronutrientes				
Nitrato de Potasio	KNO_3	101.108	2830	27.98
Sulfato de Amonio	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	132.146	463	3.5
Cloruro de Calcio	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	147.02	166	1.12
	$\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	128.99	145.62	1.12
	CaCl_2	110.99	125.3	1.12
Sulfato de Magnesio	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	246.498	185	0.75
Fosfato de Potasio	$\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	154.086	451.45	2.93
	KH_2PO_4	136.09	400	2.93
	K_2HPO_4	174.2	510.406	2.93

Micronutrientes				
Sulfato de Manganeso	MnSO ₄ .4H ₂ O	223.0618	4.4	0.0197
	MnSO ₄ .H ₂ O	169.01	3.32	0.0197
Sulfato de Zinc	ZnSO ₄ .7H ₂ O	287.54	1.5	5.21µM
Ácido Bórico	H ₃ BO ₃	61.86	1.6	25.86µM
Yoduro de Potasio	KI	166.01	0.83	4.999µM
Sulfato Ferroso	FeSO ₄ .7H ₂ O	278.028	27.8	0.097
Na ₂ EDTA	C ₁₀ H ₁₄ N ₂ O ₈ Na ₂	336.2	33.65	0.1001
Na ₂ EDTA.2H ₂ O	C ₁₀ H ₁₄ N ₂ O ₈ Na ₂ .2H ₂ O	372.3	37.3	0.1001
COMPUESTOS ORGÁNICOS				
AMINOÁCIDOS				
Glicina	C ₂ H ₅ NO ₂	75.07	2	0.0266
VITAMINAS				
Tiamina-HCl	C ₁₂ H ₁₇ ClN ₄ O ₄ S.HCl	337.3	1	2.964x10 ⁻⁴
Ácido Nicotínico	C ₆ H ₅ NO ₂	123.1	0.5	4.062x10 ⁻³
Piridoxina-HCl	C ₈ H ₁₁ NO ₃ .HCl	205.6	0.5	2.432x10 ⁻³

Tabla 8. Compuestos orgánicos. Soluciones concentradas(100x) para preparar fitohormonas, glicina, adenina y antioxidantes.

NOMBRE DEL COMPUESTO	ABREVIATURA	FORMULA	P.M. (g)	CONCENTRACION (mg)		
				100 ml	250 ml	500 ml
COMPUESTOS ORGÁNICOS						
Auxinas¹						
Acido 2,4-d. iclorofenoxiacético	2,4-D	C ₈ H ₆ Cl ₂ O ₃	221	10	25	50
Acido α-Naftalenacético	ANA	C ₁₂ H ₁₀ O ₂	186.2	10	25	50
Acido indol-3-butírico	AIB	C ₁₂ H ₁₃ NO ₂	203.2	10	25	50

Ácido 3,6-Dicloro-o-anísico	Dicamba	C ₈ H ₆ Cl ₂ O ₃	221	10	25	50
Cinetinas						
6-Bencilaminopurina	BAP	C ₁₂ H ₁₁ N ₅	225.3	10	25	50
Cinetina (6-Furfurilaminopurina)	Kin	C ₁₀ H ₉ N ₅ O	215.2	10	25	50
6-(γ-γ-dimetilalilamino) purina	Zip	C ₁₀ H ₁₃ N ₅	203.2	10	25	50
Giberelinas						
Ácido giberélico	AG ₃	C ₁₉ H ₂₂ O ₆	346.4	10	25	50
OTROS COMPUESTOS ORGANICOS utilizadas			Concentraciones			
(6-aminopurina) Hemisulfato ²	Adenina	C ₅ H ₅ N ₆ 1/2H ₂ SO ₄	184.2	100	250	500
Ácido aminoacético o aminoetanoico	Glicina	C ₂ H ₅ NO ₂	75.07	20	50	100
ANTIOXIDANTES						
L-Ácido ascórbico	Vitamina C	C ₆ H ₈ O ₆	176.1	50	125	250
Ácido cítrico		H ₃ C ₆ H ₅ O ₇ H ₂ O	210.146	50	125	250

¹Las auxinas disolverlas con unas gotas de NaOH 1N y agua caliente. Las citocininas disolverlas con unas gotas de HCl 1N y agua caliente. La giberelina disolverlas con agua tibia.

²La adenina se pesa en un vaso de precipitados y se le adiciona unas gotas de H₂SO₄ concentrado, después se le agrega agua deionizada y agua caliente. La glicina y antioxidantes se disuelven con agua a temperatura ambiente.

Anexo 2. Vitaminas y cocteles.

Tabla 9. Soluciones concentradas (100x) del coctel de vitaminas conocido como:

NOMBRE DEL COMPUESTO	FÓRMULA	1 l (g)	500 ml (g)	250 ml (g)	100 ml (g)
Vitaminas R₂ (MS modificado)					
Myoinositol	C ₆ H ₁₂ O ₆	10	5	2.5	1
Ac. Nicotínico	C ₆ H ₅ NO ₂	0.1	0.05	0.025	0.01
Piridoxina hidrocloreto	C ₈ H ₁₁ NO ₃ . HCl	0.1	0.05	0.025	0.01
Tiamina hidrocloreto	C ₈ H ₁₇ N ₄ O ₄ SCl . HCl	0.2	0.10	0.050	0.02
Vitaminas Coctel 20 (mezcla de aminoácidos, patente en trámite)					

Tabla 10. Soluciones concentradas (100x) de cock-22.

COCK - 22		Solución concentrada 100 X			
		1l	500 ml	250ml	100ml
Adenina	50 mg	5.0 g	2.5 g	1.25 g	500 mg
Glutamina	50 mg	5.0 g	2.5 g	1.25 g	501 mg
Arginina	50 mg	5.0 g	2.5 g	1.25 g	502 mg

Anexo 3. Preparación de antibióticos.

Material utilizado para preparar antibióticos o antifúngicos:

- Mortero con pistilo
- Caja Petri de vidrio
- Tubo falcon
- Espátula o bisturí del n°4
- Pinzas
- Agua deionizada estéril.
- Jeringas de 5 y 10 ml.

- **Amoxicilina**

Una pastilla de amoxicilina de 500 mg se disuelve en 10 ml. Todo deberá estar estéril para preparar la solución.

Tomar 7ml/l.

- **Cefotaxima**

Para 1 ampolleta de 1 g disolver en 4 ml de agua deionizada estéril.

Tomar 1 ml/l

- **Vancomicina**

Para 1 ampolleta de 500 mg disolver en 10 ml de agua deionizada estéril.

Tomar 0.5 ml/l

- **Meropenem**

Para una solución de 100 ml:

1. Se pesan 150mg en balanza digital.
2. Se pasa el polvo con bisturí del n°4 a tubo falcon estéril.

3. Se agrega 30 ml de agua deionizada estéril.
4. Se flamean boquilla y tapa del tubo falcon y se cierra
5. Se etiqueta. Tomar 2 ml/l.

Antifúngicos:

- **Ketoconazol**

Disolver una pastilla de 200 mg en 20 ml de agua deionizada estéril.

Tomar 5ml/l.

- **Nistatina**

En campana pesar 0.42 g y disolver en 25 ml de agua deionizada estéril.

Tomar 3 ml/l.

- **Terbinafina**

Para una pastilla de 250 mg disolver en 25 ml de agua deionizada estéril.

Tomar 5 ml/l.

En los siguientes procedimientos se describen los pasos para la preparación de antifúngicos, para la amoxicilina es un procedimiento similar ya que para la vancomicina y cefotaxima sólo se toma el agua deionizada estéril requerida mediante una jeringa y se inyecta a la ampolleta.

Preparación de ketoconazol:

1. Flamear boquilla de mortero.
2. Moler 2 pastillas de 200mg en mortero.
3. Con bisturí o espátula vaciar el polvo en un tubo falcon.
4. Agregar 20 ml de agua estéril en el mortero para quitar sobrante.
5. Agregar 20 ml de agua estéril en tubo falcon.
6. Flamear boquilla del tubo y tapa y cerrar.
7. Etiquetar y guardar en refrigeración.

Preparación de nistatina:

1. Pesar 0.42 g de nistatina en una caja Petri dentro de la campana.
2. Verter polvo con ayuda de una espátula o bisturí a un tubo falcon.

3. Agregar 10 ml de agua estéril en el mortero para quitar sobrante.
4. Agregar 15 ml de agua estéril en tubo falcon.
5. Flamear boquilla del tubo y tapa y cerrar.
6. Etiquetar y guardar en refrigeración.

Anexo 4. Obtención de protoplastos

Tabla 11. Composición del medio para los lavados de protoplastos CPW.

SOLUCIONES DEL MEDIO CPW				
SALES	CANTIDAD (mg) PARA 1 L	SOLUCIÓN 100 X (mg)		
		1 L	100 ml	50 ml
Solución I: Fosfatos				
KN ₂ PO ₄	27.2	2720	272	136
Solución II: Nitratos				
KNO ₃	101	10100	1010	505
Solución III: Sulfatos				
MgSO ₄ .7H ₂ O	246	24600	2460	1230
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.025	2.5	0.25	0.125
Solución IV: Calcio				
CaCl ₂ .2H ₂ O	1480	148000	14800	7400
Solución V: Yoduro				
KI	0.16	16	1.6	0.8

(Power *et al.*, 1989)

Preparación de medios de cultivo líquidos CPW.

Los pasos utilizados para su preparación se enlistan a continuación:

1. Medir volumen de las sales CPW para 600 ml. Añadir 150 ml de agua estéril.
2. Aforar a 300 ml y dividir en 3 matraces de 100 ml cada uno.

3. Agregar cantidad correspondiente de manitol para CPW13M y CPW9M.
4. Agregar a CPW21S su sacarosa correspondiente.
5. Medir a cada medio líquido el pH= 5.8
6. Aforar cada medio a 200 ml. Vaciar sin agitador en matraces de 250 ml.
7. Esterilizar medios.

Cálculos para la preparación de enzimas:

Dado que se agregan 5 ml de enzimas, se deben agregar 2.5 ml de macerozyme R-10 y 2.5 ml de celulasa, esto se agrega a 25 ml de medio líquido CPW13M, dando como volumen final 30 ml de solución enzimática. Entonces se tienen los siguientes cálculos para saber el peso de cada enzima y su preparación por reglas de 3:

Macerozyme R-10: 20 g – 1000 ml

Celulasa: 5 g – 1000 ml

Cantidad de Macerozyme R-10 para 2.5 ml de enzima:

$$\text{Macerozyme R} - 10 = \frac{20 \text{ g} \times 30 \text{ ml}}{1000 \text{ ml}} = 0.6 \text{ g}$$

Macerozyme R-10: 0.6 g -2.5 ml

Cantidad de Macerozyme R-10 para 25 ml de medio líquido CPW13M.

$$\text{Macerozyme R} - 10 = \frac{0.6 \text{ g} \times 25 \text{ ml}}{2.5 \text{ ml}} = 6 \text{ g}$$

Macerozyme R-10: 6 g -25 ml

Cantidad de Macerozyme R-10 para 15 ml de medio líquido CPW13M.

$$\text{Macerozyme R} - 10 = \frac{6 \text{ g} \times 15 \text{ ml}}{25 \text{ ml}} = 3.6 \text{ g}$$

Macerozyme R-10: 3.6 g -15 ml

Cantidad de Celulasa para 2.5 ml de enzima:

$$\text{Celulasa} = \frac{5 \text{ g} \times 30 \text{ ml}}{1000 \text{ ml}} = 0.15 \text{ g}$$

Celulasa: 0.15g -2.5 ml

Cantidad de Celulasa para 15 ml de medio líquido CPW13M.

$$\text{Celulasa} = \frac{0.15 \text{ g} \times 15 \text{ ml}}{2.5 \text{ ml}} = 0.9 \text{ g}$$

Celulasa: 0.9 g -15 ml

Tabla 12. Sacarosa a diferentes porcentajes.

	CANTIDADES PARA UN LITRO (1X) EN:	
Porcentaje (%)	3	21
Sacarosa (g)	30	210

Tabla 13. Manitol a diferentes porcentajes.

	CANTIDADES PARA UN LITRO (1 X) EN:			
Porcentaje (%)	3	6	9	13
Manitol (g)	30	60	90	130

Rendimiento de protoplastos

El rendimiento de protoplastos se calcula de la siguiente manera:

$$\text{Rendimiento total} = n \times 5 \times 10^3 \times 10 \text{ (vol. en ml)} = 5n \times 10^4$$

(Power *et al.*, 1989)

También otra fórmula reportada es:

$$\text{Rendimiento total} = \frac{\text{Número total de células} \times \text{Volumen total de células en suspensión}}{4 \times \text{Peso del tejido de hoja (g)}}$$

(Mota *et al.*, 2018)

Anexo 5. Preparación de antioxidantes y AgNO_3

Preparación de antioxidantes usados para protocolo de desinfección.

1. Pesar AA y AC 100 mg/l de cada uno.
2. Pesar L-cisteína 1g/l.
3. Medir 1 litro de agua deionizada estéril con probeta.
4. Vaciar el agua en 1 vaso de precipitado de 1 litro.
5. Agregar en parrilla de agitación los antioxidantes uno por uno, primero disolver la L-cisteína y luego los ácidos.
6. Pasar la solución antioxidante a un frasco estéril de 1 litro.
7. Esterilizar en autoclave durante 18 minutos.
8. En campana de flujo laminar agregar antibióticos ya antifúngicos.

Preparación de AgNO_3 utilizado en protocolo de obtención de Protoplastos.

1. Pesar 10 mg/ 100 ml de AgNO_3 .
2. Esterilizar previamente un frasco ámbar de 100 ml.
3. Filtrar en campana de flujo laminar 2 veces con membranas de $0.22 \mu\text{m}$.
4. Envasar en el frasco estéril y etiquetar.
5. Flamear boquilla del tubo y tapa y cerrar.
6. Etiquetar y guardar en refrigeración.

Anexo 6. Combinaciones de AA y AC comúnmente utilizadas en CTV.

Tabla 14. Combinaciones de AA y AC en el medio de cultivo y solución en CTV.

Ácido cítrico mg/l	Ácido ascórbico mg/l	Especie	Aplicación	Referencia
	25*	Banano y plátano	Al medio	Gupta (1986)
	50	Café	Al medio	Duhem <i>et al.</i> (1988)
	2.000	<i>Cynodon transvaalensis</i> <i>x C. dactylon</i>	En solución	Qu y Chaudhury (2001)
	50 – 100	En general	Al medio	Constabel (1984)
	100	<i>Mangifera indica</i>	Al medio	Litz <i>et al.</i> (1984)
	500	<i>Maytenus ilicifolia</i>	En solución	Flores <i>et al.</i> (1998)
	25	<i>Musa AAB</i>	Al medio	Utino <i>et al.</i> (2001)
	10	<i>Musa balbisiana</i>	Al medio	Afele y De Langhe (1991)
	10	<i>Musa spp</i>	Al medio	Banerjee y De Langhe (1985)
1.250 **		<i>Musa sp cv. Kanthali</i>	En solución	Titov <i>et al.</i> (2006)
1.500	1.000	<i>Musa textilis</i>	En solución	Mante y Tepeş (1983)
	70 – 140	<i>Nicotiana tabacum</i>	Al medio	Joy <i>et al.</i> (1988)
	10	<i>Parakmeria lotungensis</i>	Al medio	Mengyun y Jingmin (2004)
	10*	<i>Phleum pratense</i>	Al medio	Guo <i>et al.</i> (1999)
150	150	<i>Phoenix dactylifera</i>	En solución	Tisserat <i>et al.</i> (1979)
	100	<i>Pistacia terebinthus</i>	Al medio	Gammoun <i>et al.</i> (1995)
	100	<i>Pistacia Vera</i>	Al medio	Gammoun <i>et al.</i> (1995)
	10.000	<i>Platanus occidentalis L.</i>	Al medio	Feng-jie <i>et al.</i> (2007)
75	50	<i>Psidium guajava</i>	En solución	Amin y Jaiswal (1988)
75	50	<i>Psidium guajava</i>	En solución	Pirela (2002)
	10000	<i>Ruscus hypophyllum</i>	En solución	Ziv (1983)
	300	<i>Spondias purpurea</i>	Al medio	Azofeifa (2007)
5 - 10	1	<i>Triticum aestivum</i>	Al medio	Trottier <i>et al.</i> (1993)
	1*	<i>Vicia faba</i>	Al medio	Abdelwahd <i>et al.</i> (2008)
100	100	<i>Vigna radiata</i>	En solución	Mathews (1987)

* Esterilizado por filtración. ** Solución de Citrato de potasio:Citrato (relación 4:1 p/p).

(Azofeifa, 2009)