



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A. C.

Posgrado en Ciencias Biológicas

**“Desarrollo de un protocolo para la multiplicación *in vitro* de  
*Carludovica palmata* Ruiz y Pavón”.**

Samuel Alejandro Chan Poot

En opción al título de

MAESTRO EN CIENCIAS

(Ciencias Biológicas: Opción Bioquímica y Biología Molecular)

Mérida, Yucatán, México

Noviembre 2022

CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DE YUCATÁN, A. C.

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS



## RECONOCIMIENTO

Por medio de la presente, hago constar que el trabajo de tesis de **Samuel Alejandro Chan Poot** titulado “**Desarrollo de un protocolo para la multiplicación in vitro de Carludovica palmata Ruiz y Pavón**”, fue realizado en la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas, en el laboratorio 26 del **Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.** bajo la dirección del **Dr. Gregorio del Carmen Godoy Hernández**, dentro de la opción de Bioquímica y Biología Molecular, perteneciente al Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas de este Centro.

Atentamente



---

Dra. Cecilia Hernández Zepeda  
Directora de Docencia

Mérida, Yucatán, México, a 25 de octubre de 2022

## DECLARACIÓN DE PROPIEDAD

Declaro que la información contenida en la sección de Materiales y Métodos, los Resultados y Discusión de este documento proviene de las actividades de investigación realizadas durante el período que se me asignó para desarrollar mi trabajo de tesis, en las Unidades y Laboratorios del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A. C., y que a razón de lo anterior y en contraprestación de los servicios educativos o de apoyo que me fueron brindados, dicha información, en términos de la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, le pertenece patrimonialmente a dicho Centro de Investigación. Por otra parte, en virtud de lo ya manifestado, reconozco que de igual manera los productos intelectuales o desarrollos tecnológicos que deriven o pudieran derivar de lo correspondiente a dicha información, le pertenecen patrimonialmente al Centro de Investigación Científica de Yucatán, A. C., y en el mismo tenor, reconozco que si derivaren de este trabajo productos intelectuales o desarrollos tecnológicos, en lo especial, estos se registrarán en todo caso por lo dispuesto por la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, en el tenor de lo expuesto en la presente Declaración.

Firma: 

---

IBQ. Samuel Alejandro Chan Poot

Este trabajo se llevó a cabo en la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A. C., bajo la dirección del **Dr. Gregorio del Carmen Godoy Hernández**

## **AGRADECIMIENTOS**

Al CONACYT por la beca número 774187

Al CICY por el uso de sus instalaciones para la realización de esta tesis de Maestría.

A mi comité Tutorial.

Al Dr. Gregorio Godoy por aceptarme en su grupo de trabajo, por la guía y apoyo para la realización de este trabajo.

Al Dr. Tomás González por sus consejos, recomendaciones y apoyo para la realización de este trabajo.

Al Dr. Iván Estrada Mota por su tiempo para formar parte de mi comité y por las revisiones.

Al Dr. Felipe Augusto Vázquez Flota, por formar parte de mi comité.

A la Dra. Renata Rivera por formar parte de mi comité revisor.

A la M. C. Elide por sus consejos y apoyo en el trabajo de laboratorio.

A mis amigos Marcos, Geraldly, Lucia, Zen y Estefanía por sus consejos, amistad y por hacer más ameno el tiempo y compañeros del Laboratorio 26.

## **DEDICATORIA.**

A Dios creador y proveedor de vida que me permitió llegar hasta este momento y en quien siempre encomendare mi vida, sueños y metas.

A mi Madre quien es una inspiración para mí y el más grande ejemplo en mi vida, por siempre estar y creer en mí, por tu infinito amor y sabiduría.

A mis abuelos quien son una parte importante de mi vida y a quienes tratare de seguir su ejemplo en múltiples aspectos de mi vida.

A mis hermanas por estar ahí cuando las necesito.

A todos los que han contribuido en mi vida en años pasados y tiempos presentes.

Y finalmente a Mí, por no desistir y siempre querer salir adelante

*Encomienda a Jehová tus obras, Y tus pensamientos serán afirmados*

**Proverbios 16:3**

## ÍNDICE

INTRODUCCIÓN .....	1
<b>CAPÍTULO I. ANTECEDENTES .....</b>	<b>3</b>
1.1. Familia Cyclanthaceae.....	3
1.2. <i>Carludovica palmata</i> (Ruiz & Pavón) .....	3
1.3. Taxonomía .....	5
1.4. Distribución geográfica de <i>Carludovica palmata</i> .....	5
1.5. Usos de <i>Carludovica palmata</i> .....	6
1.6. Manejo y conservación de <i>Carludovica palmata</i> .....	7
1.7. Generalidades del cultivo de tejidos vegetales .....	8
1.8. Micropropagación .....	9
1.8.1. Etapas de la micropropagación .....	9
1.8.2. Etapa 0: Selección y preparación del material vegetal .....	10
1.8.3. Etapa 1: Establecimiento del cultivo <i>in vitro</i> .....	10
1.8.4. Etapa 2: Multiplicación .....	12
1.8.5. Etapa 3: Enraizamiento.....	13
1.8.6. Etapa 4: Aclimatación y trasplante.....	13
1.9. Endurecimiento de plántulas .....	14
1.10. Medios de cultivo .....	15
1.11. Reguladores de crecimiento vegetal .....	17
1.11.1. Auxinas .....	20
1.11.2. Citocininas .....	21
1.11.3. Enzima Citocinina oxidasa/deshidrogenasa.....	22
1.12. Thidiazuron.....	23
1.13. Modo de acción del TDZ.....	26
1.14. Trabajos de cultivo <i>in vitro</i> de <i>C. palmata</i> .....	26
1.15. Recapitulación .....	27
Justificación .....	29
Objetivos .....	30
Objetivo General. ....	30
<b>CAPITULO II. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>31</b>
2.1 Estrategia experimental.....	31
2.2 Obtención de plántulas <i>in vitro</i> para ensayos con TDZ .....	32

---

2.3	Evaluación de múltiples concentraciones de TDZ en explantes de <i>C. palmata</i> ...	34
2.5	Aclimatación <i>ex vitro</i> de plántulas de <i>C. palmata</i> .....	35
<b>CAPÍTULO III. RESULTADOS</b> .....		36
3.1.	Obtención de material vegetal de <i>C. palmata</i> .....	36
3.1.1.	Explantes línea L1CP .....	36
	Línea L1CP primera resiembra (un mes) .....	36
	Línea L1CP segunda resiembra (Dos meses) .....	37
	Conclusiones de la multiplicación de la línea L1CP .....	38
3.1.2.	Explantes línea L2CP .....	39
	Línea L2CP primera resiembra (1 mes).....	39
	Línea L2CP primera resiembra (2 meses) .....	40
	Conclusiones de la multiplicación de la línea L2CP .....	42
3.2.	Evaluación de concentraciones de TDZ en la línea L1CP de <i>C. palmata</i> .....	42
	Segunda resiembra de explantes en TDZ.....	48
	Tercera resiembra de explantes en TDZ .....	50
	Cuarta resiembra de explantes en TDZ.....	52
3.3.	Aclimatación de plantas de <i>C. palmata ex vitro</i> .....	57
3.4	Análisis estadístico.....	61
3.4.1	ANOVA del número de brotes .....	61
3.4.2	Análisis comparativo de Tukey para el número de brotes .....	62
3.4.3	ANOVA de la longitud de brotes .....	64
3.4.4	Análisis comparativo de Tukey para la longitud de los brotes .....	65
3.4.5	Conclusión del análisis estadístico .....	67
<b>CAPÍTULO IV. DISCUSIÓN GENERAL</b> .....		68
4.1	Discusión General .....	68
<b>CAPITULO V. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS</b> .....		73
5.1.	Conclusiones .....	73
5.2.	Perspectivas.....	74
	Anexos.....	85

**ÍNDICE DE FIGURAS**

**Figura 1.** Características morfológicas de *Carludovica palmata*, ..... 4

**Figura 2.** Distribución geográfica de *Carludovica palmata*. ..... 6

**Figura 3.** Etapas de la micropropagación. .... 10

**Figura 4.** Concentraciones relativas de auxinas y citocininas ..... 18

**Figura 5.** Estructura química de las principales auxinas ..... 20

**Figura 6.** Estructura química de las principales citocininas ..... 21

**Figura 7.** Reacción enzimática catalizada de la CKX..... 22

**Figura 8.** Comparación de estructuras químicas de las fenilureas, auxina y citocinina ..... 23

**Figura 9.** Estrategia experimental ..... 31

**Figura 10.** Plántulas de *Carludovica palmata* cultivadas *in vitro* . ..... 32

**Figura 11.** Plántulas de *Carludovica palmata* ..... 33

**Figura 12.** Plántulas de *Carludovica palmata* utilizadas para el ensayo ..... 36

**Figura 13.** Respuesta de la línea L1CP en la primera resiembra..... 37

**Figura 14.** Respuesta de la línea L1CP en la segunda resiembra.. ..... 38

**Figura 15.** Respuesta de la línea L2CP en la primera resiembra..... 39

**Figura 16.** Respuesta de la línea L2CP en la segunda resiembra.. ..... 40

**Figura 17.** Plántulas de la línea L2CP de *C. palmata* con crecimiento de callo ..... 41

**Figura 18.** Respuesta de la línea L2CP en la segunda resiembra. .... 41

**Figura 19.** Proceso para la obtención de explantes de plántulas de *C. palmata*. ..... 42

**Figura 20.** Respuesta de los explantes del control después de un mes de cultivo..... 44

**Figura 21.** Respuesta de los explantes a la concentración PC +TDZ 0.05 µM.. ..... 44

**Figura 22.** Respuesta de los explantes a la concentración PC +TDZ 0.5 µM.. ..... 45

**Figura 23.** Respuesta de los explantes a la concentración PC +TDZ 1.5 µM. .... 45

**Figura 24.** Respuesta de los explantes a la concentración PC +TDZ 2.5 µM.. ..... 46

**Figura 25.** Respuesta de los explantes a la concentración PC +TDZ 3.5 µM. .... 46

**Figura 26.** Respuesta de los explantes a la concentración PC +TDZ 4.5 µM.. ..... 47

**Figura 27.** Respuesta de los explantes a la concentración PC +TDZ 7.5 µM.. ..... 47

**Figura 28.** Explantes representativos de cada concentración de TDZ. .... 49

**Figura 29.** Explantes representativos de cada concentración de TDZ.. ..... 51

**Figura 30.** Explantes de *C. Palmata* después de 4 meses en cultivo con diferentes  
concentraciones de TDZ. .... 52

**Figura 31.** Explantes de *C. palmata* después de 4 meses en medio con TDZ..... 53

**Figura 32.** Sistema de dos fases semisólido/líquido. .... 53

**Figura 33.** Explantes de *C. palmata* con brotes antes y después del cultivo en medio de dos fases.....54

**Figura 34.** Explantes de *C. palmata* cultivados en medio semisólido y medio de dos fases.. ...55

**Figura 35.** Plántulas de *C. palmata* separadas de explantes cultivados en medio de dos fases. ....55

**Figura 36.** Plántulas de *C. palmata* regeneradas.....57

**Figura 37.** Proceso de aclimatación *ex vitro* de plantas micropropagadas de *C. palmata*.....58

**Figura 38.** Plantas micropropagadas y aclimatadas de *C. palmata*. ....59

**Figura 39.** Plantas micropropagadas de *C. palmata*. ....59

**Figura 40.** Plantas micropropagadas de *C. palmata* en condiciones de invernadero y vivero...60

**Figura 42.** Gráfico de barras del número de brotes por explante .....63

**Figura 41.** Gráfico de índice simultáneo de confianza de la prueba Tukey para el número de brotes.....63

**Figura 43.** Gráfico de índice simultáneos de confianza de la prueba Tukey para la longitud de brotes.....66

**Figura 44.** Gráfico de barras de tamaño de brotes por explante en relación con su concentración de TDZ.....66

---

**ÍNDICE DE TABLAS**

<b>Tabla 1</b> . Clasificación taxonómica de <i>C. palmata</i> .....	5
<b>Tabla 2</b> . Propiedades y comparación de esterilizantes superficiales.....	11
<b>Tabla 3</b> . Funciones de los macronutrientes agregados al medio de cultivo.....	16
<b>Tabla 4</b> . Función de micronutrientes agregados en el medio de cultivo .....	17
<b>Tabla 5</b> . Ejemplos de reguladores de crecimiento vegetal .....	19
<b>Tabla 6</b> . Diferentes efectos fisiológicos del TDZ . .....	25
<b>Tabla 7</b> . Concentraciones de TDZ a ensayar en <i>Carludovica palmata</i> .....	34
<b>Tabla 8</b> . Número de brotes formados por explante. ....	48
<b>Tabla 9</b> . Morfogénesis de explantes de <i>C. palmata</i> .....	50
<b>Tabla 10</b> . Número de plántulas de <i>C. palmata</i> formadas .....	56
<b>Tabla 11</b> . Análisis de varianza del número de brotes.....	61
<b>Tabla 12</b> . Análisis de desviación estándar del número de brote.....	62
<b>Tabla 13</b> . Diferencia significativa y separación de medias del número de brotes.....	62
<b>Tabla 14</b> . Análisis de varianza de la longitud de brotes de <i>Carludovica palmata</i> .....	64
<b>Tabla 15</b> . Análisis de desviación estándar de tamaño de brotes.....	64
<b>Tabla 16</b> . Diferencia significativa y separación de medias de la longitud de brotes .....	65
<b>Tabla 17</b> . Resumen de las variables analizadas para cada tratamiento con TDZ. ....	67

**ÍNDICE DE ANEXOS**

**Anexo 1.** Composición del medio PC (Phillips & Collins, 1979). .....85

**Anexo 2.** Ficha técnica de Poly-feed. ....86

**Anexo 3.** Ensayo de multiplicación de *Carludovica drudei*.....87

---

## **ABREVIATURAS**

**CTV:** Cultivo de tejidos Vegetales

**RCV:** Reguladores de crecimiento vegetal

**TDZ:** Thidiazuron

**V/V:** Medida dada en relación volumen/ volumen.

**IBA:** ácido indol-3-butírico

**2,4 D:** Ácido 2,4-diclorofenoxiacético

**AIA:** Ácido indol-3-acético

**ANA:** Ácido naftalenacético

**BA:** 6-Bencilaminopurina

**ABA:** Ácido abscísico

**KIN:** Kinetina

**ZEA:** Zeatina

**2ip:** Isopentenil adenina

**μM:** Micromolar

**PC:** Medio de cultivo Phillips & Collins.

---

## Resumen.

*Carludovica palmata* es una planta terrestre y acaule, por un follaje de hojas radicales y pecíolos bastantes largos, es propia de los bosques tropicales y húmedos de América, también conocida con los nombres de jipi, jipijapa, iraca. La importancia de *C. palmata* radica en ser una especie que se emplea para la extracción de fibras. El producto más comúnmente utilizado para la artesanía, por su calidad y versatilidad de uso, es la fibra que se obtiene de las láminas inmaduras de las hojas nuevas llamadas comúnmente cogollos.

En este trabajo se evaluó la respuesta de explantes de *C. palmata* ante el Thidiazuron (TDZ), para poder así obtener un protocolo de multiplicación masiva de esta especie, se utilizaron 7 concentraciones diferentes de TDZ y un Control (0.00  $\mu\text{M}$  de TDZ), se evaluó el número de brotes y tamaños de estos por concentración de TDZ, los resultados fueron recopilados en una matriz de Excel y procesados en el programa estadístico MINITAB, para la obtención de los ANOVAS para cada parámetro y las pruebas de Tukey, con los análisis estadísticos se comprobó que la mayor cantidad de brotes se obtuvo en la concentración de 7.5  $\mu\text{M}$  de TDZ, de la cual se obtuvieron 85 brotes por explante, aunque la longitud de sus brotes fue la más baja comparado con los otros tratamientos de TDZ y el Control (0.00  $\mu\text{M}$  de TDZ). Sin embargo, una vez adaptadas a condiciones *ex vitro* las plantas no mostraron signos de deformación y alcanzaron en tamaño a las plántulas de las otras concentraciones, con base a los resultados obtenidos en el trabajo se puede concluir que se logró establecer un protocolo de multiplicación *in vitro* eficaz y reproducible para la especie *Carludovica palmata*.

---

---

## Abstract

*Carludovica palmata* is a terrestrial and watery plant, with a foliage of radical leaves and quite long petioles, it is typical of the tropical and humid forests of America, also known by the names of jipi, jipijapa, iraca. The importance of *C. palmata* lies in being a species that is used for the extraction of fibers. The most commonly used product for handicrafts, due to its quality and versatility of use, is the fiber obtained from the immature sheets of new leaves, commonly called buds.

In this work, the response of *C. palmata* explants to Thidiazuron (TDZ) was evaluated. In order to obtain a massive multiplication protocol for this species, seven different concentrations of TDZ and a Control (0.00  $\mu\text{M}$  of TDZ) were used. The number of shoots and their sizes by TDZ concentration were evaluated, the results were compiled in an Excel matrix and processed in the MINITAB statistical program, to obtain the ANOVAS for each parameter and the Tukey tests, with the analyzes Statistical data showed that the highest number of shoots was obtained in the concentration of 7.5  $\mu\text{M}$  of TDZ, from which 85 shoots per explant were obtained, although the length of its shoots was the lowest compared to the other TDZ treatments and the Control. (0.00  $\mu\text{M}$  TDZ). However, once adapted to *ex vitro* conditions, the plants did not show signs of deformation and reached the size of the seedlings of the other concentrations. Based on the results obtained in the work, it can be concluded that it was possible to establish the multiplication protocol *in vitro* effective and reproducible for the specie *Carludovica palmata*.

---

## INTRODUCCIÓN

*Carludovica palmata* también conocida comúnmente como jipi, jipijapa, iraca, palma de panamá, o paja toquilla, Es una planta parecida a una palma que crece en sitios abiertos con suelos húmedos. Produce hojas de largos pecíolos acanalados de 2 a 3 m que sostienen láminas plegadas en forma de abanico de 1.5 a 4 metros de largo (Harling, 1958). En la región de la península de Yucatán la palma de Jipi se siembra en etno-agroecosistemas denominados solares (Perea Mercado *et al.*, 2012)

La importancia de *C. palmata* radica en ser una especie que se emplea para la extracción de fibras (Fadiman, 2001; Pérez Rodríguez, 2001; Aguilar de Tamariz, 2009). La fibra de palma de Jipi es el producto más comúnmente utilizado para la artesanía por su calidad y versatilidad de uso. La fibra se obtiene de las láminas inmaduras de las hojas nuevas llamadas comúnmente cogollos que fueron definidos como la lámina aún cerrada de las hojas jóvenes inmaduras (Ceballos, 1998). Las fibras del jipi son apreciadas por su durabilidad, flexibilidad, color y la capacidad para biodegradarse (López *et al.*, 2013).

*C. palmata* presenta dos tipos de reproducción, la sexual por medio de la generación de semillas y la asexual por medio de la proliferación mediante rizomas. La propagación sexual de esta especie no es utilizada debido a que (por reportes de los productores) se presenta una muy baja o casi nula germinación de semillas en condiciones de campo; así como, al mayor tiempo requerido para iniciar la cosecha a partir de plantas propagadas mediante semilla. En consecuencia, los productores propagan asexualmente las plantas mediante rizomas. Esta práctica presenta una limitación para poder expandir la superficie de cultivo, debido a que este método es poco eficiente. Los puntos antes mencionados contribuyen a la escasez de plantas para el establecimiento de plantaciones de esta especie y en consecuencia un desabasto potencial de la materia prima para la producción artesanal.

Una alternativa para la solución de este problema son las técnicas de cultivo de tejidos vegetales, como la micropropagación, la cual consiste en la multiplicación asexual de plantas utilizando las técnicas de cultivo *in vitro*. La micropropagación es la técnica más aplicada debido a su enorme productividad comparada con las técnicas tradicionales y se basa en la utilización de tejidos asépticos, la estimulación de la regeneración del tejido vegetal, el rápido crecimiento de las plántulas jóvenes, su enraizamiento y su adaptación en condiciones normales de suelo (Collin *et al.*, 1998).

Para *C. palmata* existen pocos estudios sobre su propagación ya sea por métodos vegetativos o por cultivo *in vitro*. Por estos motivos, el propósito del presente trabajo fue generar un protocolo de propagación *in vitro* de *C. palmata*, el cual será una continuación del trabajo de Chan (2019) para lograr obtener un método eficiente y reproducible para la propagación clonal de esta especie.

## CAPÍTULO I. ANTECEDENTES

### 1.1. Familia Cyclanthaceae

Las Ciclantáceas están particularmente adaptadas a hábitats húmedos y sombreados, son hierbas perennes, rizomatosas, terrestres o epífitas, acaules o con tallos más o menos cortos, o bien lianas trepadoras por raíces, con tallos largos, delgados. Hojas espiraladas o dísticas, el pecíolo envainador en la base; limbo generalmente bífido, más raramente flabeliforme-partido o entero. Inflorescencia un espádice axilar no ramificado, pedunculado, subtendido por 2-11 espatas foliáceas o petaláceas, que lo envuelven antes de la antesis. Flores unisexuales, en grupos dispuestos en espiral, cada grupo con una flor pistilada rodeada por 4 estaminadas, o bien las flores de cada sexo en ciclos alternados (*Cyclanthus*), y en este caso las flores estaminadas y pistiladas individuales no discernibles. Las ciclantáceas constituyen una familia exclusivamente neotropical, distribuida desde el Sur de México hasta Brasil y Bolivia, incluyendo Trinidad y Tobago y algunas de las Antillas Menores (Harling, 1958).

### 1.2. *Carludovica palmata* (Ruiz & Pavón)

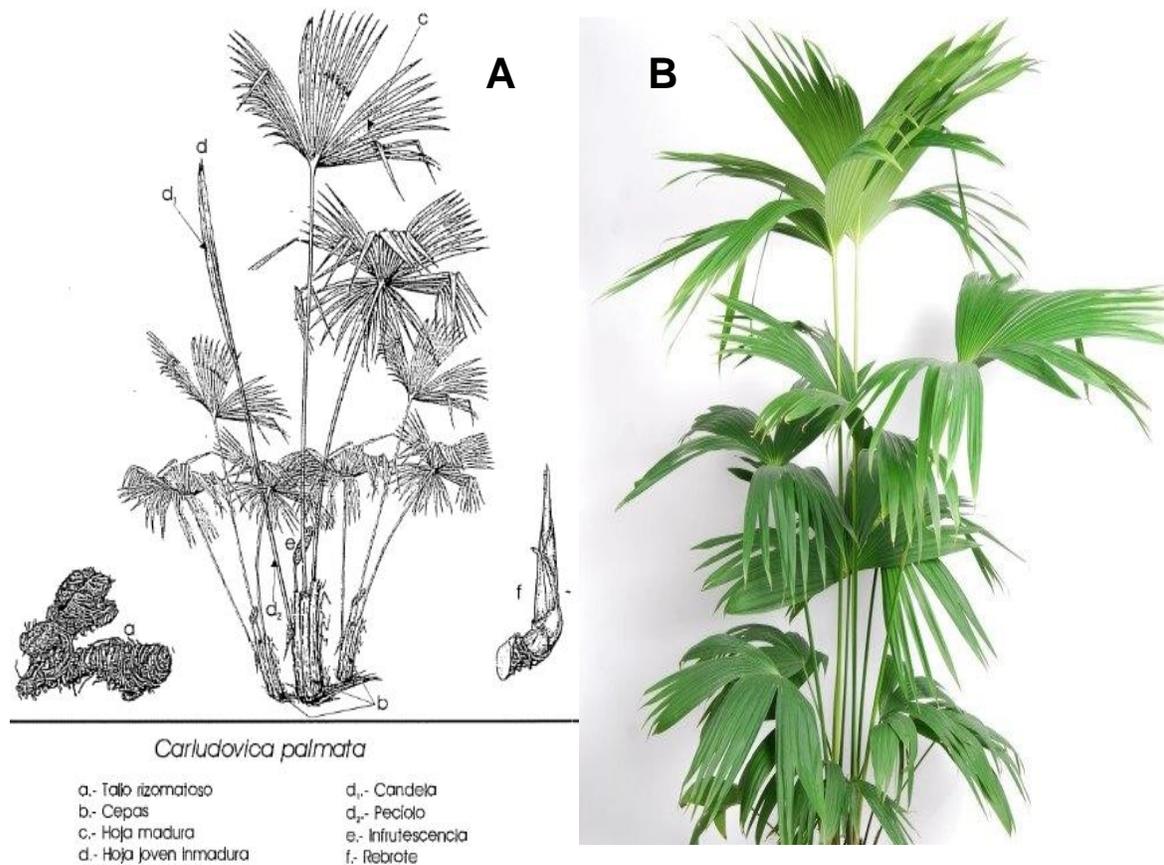
*Carludovica palmata* es una planta terrestre y acaule (Figura 1); es decir, de tallo tan corto que parece inexistente, pero tiene un follaje de hojas radicales y pecíolos bastantes largos, es propia de los bosques tropicales y húmedos de América, también conocida con los nombres de jipi, jipijapa, iraca, palma de panamá, paja toquilla, lucaina, lucua, palmiche, cestillo, nacuma, rabihorcado, murrapo, alagua y rampira (Bristol, 1961; Velasteguí, 1974; Duke, 1986; Burbano, 2000)

Sus hojas son de 1.5 a 4 metros de largo, los pecíolos pueden tener una longitud de 2 a 3 metros. Las láminas miden usualmente 1 metro de ancho o menos, se dividen en cuatro lóbulos cerca de la base y a su vez estos lóbulos en sus bordes se dividen en pequeños segmentos casi siempre irregulares. La base de la lámina presenta dos protuberancias conspicuas llamadas hástulas que es una de las características que diferencia esta especie con el resto (Harling 1958).

Presenta inflorescencias que nacen de las axilas de las hojas, usualmente con 30 cm de largo o menos, y están compuestas por un espádice subtendido por tres espatas (Muñoz *et al.*, 1999). Presenta un patrón floral que consiste en una flor femenina rodeada por cuatro flores masculinas dispuestas a manera de espiral sobre el eje principal del espádice (Harling, 1958), formando una cámara de polinización donde solo las superficies estigmáticas de las flores femeninas permanecen expuestas; dada la forma de la estructura de los frutos y el color de los espádices

*C. palmata* es comúnmente dispersada por hormigas o por aves y polinizada por escarabajos, avispas y por pequeños gorgojos (Harling, 1958; Gottsberger 1991; Ericksson, 1994).

Las flores poseen un cierto aroma y son abundantes; cuando se desarrolla la flor, los espádices se cubren por filamentos largos y enredados de color blanco cremoso, denominados estaminodios. El fruto es una baya de color castaño y de conformación tetrágona; es carnosos y contiene muchas semillas, por lo que se puede decir que es polispermo (Velasteguí, 1974).



**Figura 1. A)** Características morfológicas de *C. palmata*, tomado de Harling (1958), **B)** Planta de *C. palmata*

### 1.3. Taxonomía

*Carludovica palmata* pertenece a la familia *Cyclanthaceae* (Tabla 1), esta se divide en dos subfamilias *Carludovicoidae* y *Cyclanthoidae*, el género *Carludovica* se encuentra dentro de la subfamilia *carludovicoidae* y consta de cuatro especies: *C. palmata*, *C. rotundifolia*, *C. drudei* y *C. sulcata*. Siendo la más común la primera (Harling, 1958).

**Tabla 1 .** Clasificación taxonómica de *C. palmata*.

<b><i>Carludovica palmata</i> taxonomía</b>	
Reino	Plantae
División	Tracheophyta
Clase	Liliopsida
Orden	Pandanales
Familia	Cyclanthaceae
Subfamilia	Carludovicoidae
Especies	<i>Carludovica palmata</i>
Nombre científico	<i>Carludovica palmata</i> Ruiz & Pavón.

### 1.4. Distribución geográfica de *Carludovica palmata*

La especie *C. palmata* se distribuye desde el sureste de México hasta Bolivia central en zonas tropicales y subtropicales, en un rango de altitud que va desde 0 a 2,000 msnm, donde las temperaturas oscilan entre 22 °C a 26 °C, y la precipitación media anual entre menos de 300 mm y más de 6,000 mm (Figura 2). Se relaciona con suelos húmedos o inundados, arcillosos o franco arcilloso (Histosoles, Inceptisoles, Entisoles). La planta puede encontrarse asociada con colonias de la misma especie u otras especies (asociación Higrófila) (Standley y Steyermark, 1958; Bennett *et al.*, 1992; Pérez Rodríguez, 2001; Aguilar de Tamariz, 2009). En México, se encuentra distribuido en los estados de Veracruz, Tabasco, Chiapas, Oaxaca, Yucatán y Campeche.



**Figura 2.** Distribución geográfica de *Carludovica palmata*, tomado de Global Biodiversity Information Facility. Page web: (<https://www.gbif.org/es/species/2860922>).

### 1.5. Usos de *Carludovica palmata*

En México, Ecuador, Honduras y en otras partes de América Central, la industria del sombrero es de gran importancia regional e incluso nacional, por lo que el principal uso que se le da a las fibras tiernas o cogollos de *C. palmata* es para la elaboración de los famosos sombreros de Panamá y otras artesanías como cestas, bolsos, abanicos, etc. Para elaborar estos productos artesanales las fibras tiernas (cogollos) de *C. palmata* pasan por diferentes etapas, primero son cosechadas, luego por el separado-desvenado; este proceso se lleva a cabo para separar las venas de los cogollos que son la parte más dura de las fibras y que dificultaría el tejido de las fibras; posteriormente pasan por un proceso de cocción para mejorar la resistencia de las fibras. El siguiente paso es el secado, primero se escurren, posteriormente se sacuden para ayudar a la separación, luego se puede decidir en dos variantes de secado en sombra o en sol, y como último paso se realiza un blanqueo con azufre; el blanqueo de las fibras aumenta el costo de esta porque se considera de mejor calidad; después de esto se realiza la selección de las mejores fibras por los artesanos y se procede con el tejido de los sombreros.

Además del uso antes mencionado, las hojas maduras con una parte del pecíolo de *C. palmata* se emplean para techar viviendas, cocinas y refugios de animales; este material vegetal es muy resistente pudiendo llegar a durar hasta 20 años, mientras que las fibras de la epidermis de los pecíolos son aprovechadas para hacer canastas, petates, cordeles, cuerdas y trampas para peces. Algunos grupos indígenas de la Amazonia les dieron usos medicinales: sus pecíolos y cogollos se aplicaban masticados sobre heridas o cortes para prevenir infecciones (Bennett et

*al.*, 1992; López *et al.*, 2006). García, (1975) menciona que *C. palmata* tiene propiedades hemostáticas derivadas de una decocción hecha de sus hojas.

### **1.6. Manejo y conservación de *Carludovica palmata*.**

La importancia de *C. palmata* radica en ser una especie que se emplea para la extracción de fibras (Fadiman, 2001; Pérez Rodríguez, 2001; Aguilar de Tamariz, 2009). El producto más comúnmente utilizado para la artesanía, por su calidad y versatilidad de uso, es la fibra que se obtiene de las láminas inmaduras de las hojas nuevas llamadas comúnmente cogollos que se pueden definir como la lámina aún cerrada de las hojas jóvenes inmaduras de *C. palmata*. Las fibras que provienen de la membrana o cutícula que cubre el pecíolo también son utilizadas, pero en menor proporción dado que presentan mayor dureza y rigidez (Ceballos, 1998). Las fibras de *C. palmata* son apreciadas por su durabilidad, flexibilidad, color y la capacidad para biodegradarse (López *et al.*, 2013).

En estudios de Cevallos (1998) para la conservación y manejo de plantas de *C. palmata* recomienda que la cosecha de cogollos se realice durante los meses de junio a septiembre que es cuando está la mayor producción de hojas y cosechar preferentemente individuos de tamaños mayores. Se recomienda utilizar terrenos planos húmedos y con estratos bajos de vegetación para el cultivo de dicha especie.

Ortega (2006) realizó un estudio para mejorar la producción de rizomas y cogollos evaluando el efecto de tres dosis de Vermicomposta, Triple 17 enriquecido con micro nutrientes (EM) y una mezcla de Vermicomposta más Triple 17 EM, sobre el crecimiento y sub-estadios de la hoja de *C. palmata* en una parcela experimental de la localidad de Santa Cruz Ex–Hacienda Calkiní, Campeche. Para cumplir con su objetivo realizó un experimento con un testigo, cinco tratamientos y seis repeticiones distribuidos en un diseño de Cuadrado Latino. El crecimiento lo evaluó a través del diámetro y altura de la hoja, los estadios fueron registrados conforme a la escala BBCH (Biologische Bundesanstalt, Bundessortenamt und Chemische Industrie por sus siglas en alemán) la cual es una herramienta que permite registrar con facilidad etapas del desarrollo, compararlas y compartir la información. Las observaciones de campo las realizó cada 15 días y sus resultados mostraron que al adicionar Vermicomposta al suelo, se incrementa la materia orgánica, así como el nitrógeno y fósforo. Sin embargo, los tratamientos no manifestaron diferencia significativa en número de hijuelos, hojas y cogollos.

En su artículo López *et al.*, (2013) presentan la determinación de humedad, elementos solubles e insolubles en agua de la fibra de *C. palmata*, con la finalidad de determinar su uso potencial

como refuerzo en materiales compuestos y la influencia en la resistencia mecánica. Los porcentajes de humedad de las fibras analizadas corresponde al 5,33 % de su peso. El porcentaje de elementos solubles e insolubles en agua fueron de 4,6 % y 21,87 % respectivamente, al concluir su estudio determinaron que los porcentajes obtenidos no eran muy beneficiosos para el propósito que se pretendía.

### **1.7. Generalidades del cultivo de tejidos vegetales**

El cultivo de tejidos vegetales (CTV) engloba a un conjunto de técnicas *in vitro*, que básicamente consisten en aislar un fragmento de tejido el cual se denomina explante, y que al proporcionarle de manera artificial las condiciones físicas y químicas apropiadas puede inducirse una respuesta en el tejido ya sea de calogénesis u organogénesis y posteriormente puede diferenciarse a plántulas, por lo que es indispensable mantener la asepsia de los cultivos para evitar la contaminación microbiana (Roca *et al.*, 1991; Vázquez *et al.*, 1997).

El término *in vitro*, proviene del latín en vidrio, debido a que se cultiva en recipientes de vidrio o plástico transparente, que contienen el medio artificial, compuesto de una dieta balanceada de nutrientes y reguladores de crecimiento, en condiciones asépticas y ambientales controladas, lo cual permite ejercer un control relativo sobre los procesos morfogénéticos, fisiológicos y bioquímicos que ocurren en el explante en estudio (Roca *et al.*, 1991; Abdelnour *et al.*, 1994).

El requisito previo para que funcionen estos métodos es la totipotencia morfológica y química de cada célula vegetal (Endress, 1994). La totipotencialidad celular, propuesta en 1902 por Haberlandt, y la hipótesis del balance hormonal sugerida por Skoog *et al.*, 1957, constituyen los principios más importantes, según Roca y Mroginski, 1991, en los que se fundamentan las técnicas desarrolladas en cultivo de tejidos *in vitro*, donde la totipotencia puede ser definida como la capacidad que tienen las células vegetales para desarrollar plantas completas.

Las técnicas de cultivo *in vitro* se han utilizado en el mejoramiento genético, la obtención de plantas libres de virus y otros patógenos, la conservación del germoplasma y en micropropagación, la cual involucra que las plántulas que se producen puedan crecer y ser fenotípica y genotípicamente idénticas a la planta madre de la cual se derivan (Roca *et al.*, 1991).

## 1.8. Micropropagación

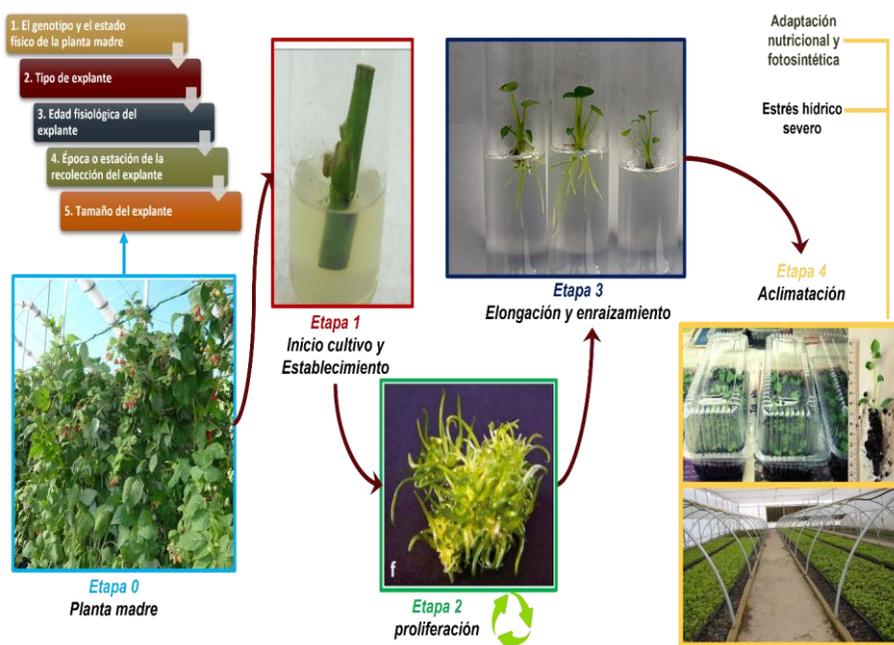
La propagación clonal de plantas fue originalmente desarrollada como una herramienta de investigación para estudiar la fisiología y la bioquímica de las plantas. Pero se observó que la técnica tenía un alto potencial comercial; se le llamó micropropagación debido a la miniaturización del proceso, y fue la primera técnica en utilizarse con fines económicos y actualmente es una tecnología industrial ampliamente utilizada alrededor del mundo (Scragg, 1995; Bhojwani *et al.*, 2013).

Se le llama micropropagación a la multiplicación vegetativa o asexual de plantas utilizando las técnicas de cultivo de tejidos *in vitro*. La micropropagación es la técnica más aplicada debido a su enorme productividad comparada con las técnicas tradicionales y se basa en la utilización de tejidos asépticos, la estimulación de la regeneración de tejido vegetal, el rápido crecimiento de las plántulas jóvenes, enraizamiento de las plántulas y su adaptación en condiciones normales de suelo (Collin *et al.*, 1998; Pérez *et al.*, 1999).

Dependiendo de las características de la planta que se pretenda propagar y del objetivo perseguido, la micropropagación puede realizarse a través de tres vías de regeneración: brotación de yemas adventicias preexistentes, producción de yemas de *novo* y embriogénesis somática. La ventaja más importante obtenida por la micropropagación sobre los métodos convencionales es que en un tiempo corto y espacios relativamente reducidos, una gran cantidad de plantas pueden ser producidas a partir de un solo individuo pudiéndose obtener aproximadamente un millón de propágulos en un período de seis meses, considerando una tasa de multiplicación de diez yemas axilares a partir de un solo explante (Chawla, 2004).

### 1.8.1. Etapas de la micropropagación

La micropropagación es un proceso bien definido de múltiples pasos (Figura 3). Consta de cinco etapas, cada una con sus requisitos y problemas específicos (Bhojwani *et al.*, 1996). Etapa 0: Es la etapa preparatoria para proporcionar explantes de calidad; Etapa 1: Iniciación de cultivos asépticos; Etapa 2: Multiplicación; Etapa 3: Enraizamiento de brotes formados *in vitro*; y Etapa 4: Transferencia de plantas a condiciones de invernadero o campo (Bhojwani *et al.*, 2013).



**Figura 3.** Etapas de la micropropagación descritas por Bhojwani *et al.*, 2013.

### 1.8.2. Etapa 0: Selección y preparación del material vegetal

Este paso se introdujo inicialmente para controlar el problema de la contaminación, especialmente de los hongos, pero ahora se considera importante para el éxito del establecimiento y la multiplicación final en las Etapas 1 y 2, respectivamente. Cualquier medida tomada para mejorar la calidad de la planta madre, ya sea por su estado de higiene o fisiológico, se incluye en esta Etapa (Bhojwani *et al.*, 2013).

La correcta elección y preparación del explante incide directamente sobre la calidad del mismo y su respuesta frente a los dos principales problemas que afectan al establecimiento del cultivo, que son la contaminación con microorganismos y la oxidación del explante. Los factores que influyen sobre la calidad del explante son: el tipo de órgano que sirve como explante, la edad ontogénica y fisiológica del mismo, la estación en la cual se colecta el material vegetal, el tamaño y el estado sanitario general de la planta donante (Levitus *et al.*, 2010).

### 1.8.3. Etapa 1: Establecimiento del cultivo *in vitro*

El objetivo de esta etapa es establecer cultivos asépticos de la planta para ser micropropagados usando explantes adecuados. Aunque el 100% de los cultivos libres de infección es difícil de obtener, un alto porcentaje reproducible de cultivos asépticos es deseable para un protocolo de

micropropagación satisfactorio (Bhojwani *et al.*, 2013). Los contaminantes microbianos pueden afectar la sobrevivencia del explante, el crecimiento y la tasa de multiplicación, ya que en el medio de cultivo pueden crecer y competir ventajosamente con el explante (Roca *et al.*, 1991; Trigliano *et al.*, 2005). En esta etapa, los principales procesos a controlar son la selección, el aislamiento y la esterilización de los explantes (Levitus *et al.*, 2010).

- **Selección del explante**

La elección del explante depende principalmente del modo de regeneración y multiplicación deseado y objetivo del estudio. El explante más comúnmente utilizado para la micropropagación es un brote apical o segmentos nodales con al menos un brote axilar. Si el objetivo es la eliminación de virus, se aplica el cultivo de la punta de meristemo. La elección de los explantes aumenta cuando el objetivo es la regeneración *de novo* de brotes o embriogénesis somática (Bhojwani *et al.*, 2013).

- **Desinfección de los explantes**

Una vez seleccionado el mejor explante se requiere desinfectarlo superficialmente; la razón es que en el medio de cultivo pueden crecer microorganismos, principalmente bacterias y hongos, que competirán ventajosamente con el explante. Para esta desinfección se han empleado diferentes compuestos, siendo los más comunes los enlistados en la tabla 2, en la cual se indican algunos de los químicos comúnmente utilizados y su efectividad en la esterilización superficial de explantes (Roca *et al.*, 1991).

**Tabla 2.** Propiedades y comparación de esterilizantes superficiales comunes para explantes, tomada y modificada de Chawla (2004).

Agente esterilizante	Concentración utilizada	Facilidad de remoción	Tiempo de tratamiento (min)	Observaciones
Hipoclorito de sodio	1-1,4%	+++	5-30	Muy efectivo
Hipoclorito de calcio	9-10%	+++	5-30	Muy efectivo
Peróxido de hidrógeno	10-12%	+++++	5-15	Efectivo
Agua de bromuro	1-2%	+++	2-10	Muy efectivo
Nitrato de plata	1%	+	5-30	Efectivo
Cloruro de mercurio	0,01-1%	+	2-10	Satisfactorio
Antibióticos	4-50mg/l	++	30-60	Efectivo
Etolol	70%	++++	5-15	Satisfactorio
Cloramina T	1 al 3 %	++	5-20	Efectivo

La selección y concentración de los desinfectantes y el tiempo de desinfección se determinan, en gran medida, por las características del explante; en la práctica, se establecen experimentalmente por ensayo y error (Roca *et al.*, 1991).

Algunos patógenos permanecen latentes y se expresan cuando son transferidos a un medio de cultivo nuevo. En general, estos patógenos incluyen los patógenos superficiales del material vegetal, los patógenos endógenos y los patógenos propios del manejo en laboratorio. En la etapa 1 también pueden observarse infecciones por bacterias y hongos, que sobreviven a los tratamientos de esterilización y por patógenos endógenos latentes dentro del sistema vascular, resultado de una esterilización inefectiva de los explantes. Estos patógenos latentes podrían manejarse mediante el empleo de bacteriostáticos o antibióticos en el medio de cultivo (Levitus *et al.*, 2010).

#### **1.8.4. Etapa 2: Multiplicación**

El éxito del protocolo de la micropropagación depende en gran medida de la eficiencia de esta etapa. El objetivo de esta etapa es mantener y aumentar la cantidad de brotes para los nuevos ciclos de multiplicación sucesivos (subcultivos) y poder destinar parte de ellos a la siguiente etapa de producción. La multiplicación de los brotes se logra a través de: A) la regeneración a partir del callo, B) la formación directa de yemas adventicias del explante, y C) la ramificación axilar forzada. Cada uno de estos métodos tiene sus propias ventajas y desventajas (Levitus *et al.*, 2010; Bhojwani *et al.*, 2013).

La etapa de multiplicación generalmente comprende dos períodos, la fase de inducción y la fase de multiplicación propiamente dicha. La primera se puede alcanzar con el uso de sustancias reguladoras de crecimiento como componentes de un medio de cultivo previamente establecido. La segunda etapa requiere del empleo de un balance hormonal adecuado para favorecer los procesos de diferenciación y multiplicación celular (Pérez *et al.*, 1998; Levitus *et al.*, 2010).

Dentro de la técnica de cultivo de tejidos vegetales las auxinas y las citocininas son los reguladores más utilizados para el crecimiento y desarrollo del explante. Los tipos de auxinas más empleados son IBA, 2,4-D, AIA, ANA y picloram, y las citocininas BA, CIN, ZEA, 2ip y TDZ (Tabla 5). El rango de concentración empleado varía con el regulador de crecimiento, los tipos de reguladores, sus combinaciones y rangos de concentraciones deben ser optimizados para cada especie, genotipo y etapa de multiplicación determinada (Hurtado *et al.*, 1987; Levitus *et al.*, 2010)

Otro de los factores muy importantes a considerar en esta etapa es la fenolización. La presencia de compuestos fenólicos oxidados se encuentra asociada con tejidos vegetales sometidos a situaciones de estrés, tales como aquel provocado por el daño mecánico producido durante el aislamiento del explante de la planta madre o durante la transformación. Los compuestos fenólicos liberados al medio pueden inhibir el crecimiento e incluso matar al explante. Para minimizar el daño de estos compuestos se emplean agentes adsorbentes de fenoles en el medio de cultivo, tales como el carbón activado y la polivinilpirrolidona o antioxidantes como el ácido ascórbico (Levitus *et al.*, 2010).

### **1.8.5. Etapa 3: Enraizamiento**

En esta etapa se produce la formación de raíces. En las especies herbáceas es relativamente fácil, mientras que en muchas especies leñosas resulta más complicada por su limitada capacidad rizogénica (Levitus *et al.*, 2010). El proceso de enraizamiento en los brotes propagados *in vitro* requiere generalmente del trasplante a un medio de cultivo con menor concentración de sales. Asimismo, se requiere cambiar el balance hormonal, esto es, disminuir las citocininas y aumentar las auxinas exógenas. En algunas especies, la eliminación de las citocininas exógenas ha sido suficiente estímulo para la diferenciación del sistema radical (Thorpe, 1980).

El enraizamiento puede realizarse tanto en condiciones *in vitro* como *ex vitro*. En el primer caso pueden emplearse varios tipos de sustratos y reguladores de crecimiento principalmente auxinas, sin embargo, es importante acentuar que el uso de auxinas a elevadas concentraciones es contraproducente porque induce la formación de callo en la base de los brotes. Por ello, para cada cultivo es necesario optimizar un protocolo de rizogénesis que minimice la formación de callo y maximice la tasa de rizogénesis y supervivencia de las plantas. El enraizamiento *ex vitro* permite que el enraizamiento y aclimatización se logren simultáneamente y que raramente se forme callo en la base de los brotes, asegurando así una conexión vascular continua entre el vástago y la raíz. Sin embargo, el estrés asociado a la transpiración acelerada de las plantas durante las etapas iniciales del trasplante puede reducir considerablemente la tasa de supervivencia (Levitus *et al.*, 2010).

### **1.8.6. Etapa 4: Aclimatación y trasplante**

El éxito final de la micropropagación depende del establecimiento de las plantas en el suelo o en la mezcla para macetas. Las plantas cultivadas *in vitro* están expuestas al ambiente artificial del vial de cultivo, que se caracteriza por el medio de cultivo rico en nutrientes orgánicos e

inorgánicos, sacarosa y reguladores del crecimiento, alta humedad, poca luz y escaso intercambio gaseoso. En estas condiciones antinaturales, las plantas pueden crecer bien, pero sufren muchas anomalías morfológicas, anatómicas, citológicas y fisiológicas, que requieren su aclimatación cuidadosa a las condiciones *in vivo* (Bhojwani *et al.*, 2013).

En la práctica, las plantas son retiradas de sus contenedores de cultivo, se les retira totalmente y con cuidado el medio de cultivo adherido a sus raíces, las plantas se colocan en el sustrato y se mantienen por varios días con alta humedad relativa, ya sea de forma manual o automática. La aparición de hojas nuevas después de que la planta se transfirió al sustrato es un indicador de que la adaptación es exitosa. Es aquí cuando se recomienda reducir la humedad relativa e incrementar la luz (Pérez *et al.*, 1999; George *et al.*, 2008; Bhojwani, 2013).

### **1.9. Endurecimiento de plántulas**

Es posible que una planta aumente su resistencia a un estrés determinado sometiéndola a dosis subletales de ese mismo estrés (Levitt, 1980). En muchos casos, la resistencia adquirida a un factor de estrés también confiere mayor resistencia a otros factores de estrés. Uno de los principales objetivos del endurecimiento es mejorar la supervivencia y el crecimiento tras el trasplante (Landis *et al.*, 1998). El endurecimiento permite, además, optimizar el cultivo evitando riegos y fertilizaciones excesivas. Por lo tanto, el endurecimiento es la fase del cultivo en la que se potencian determinados mecanismos de la biología de las plantas relacionados con la resistencia a factores de estrés, especialmente al estrés hídrico, térmico, nutricional y mecánico. Al endurecimiento también se le denomina preacondicionamiento (Vilagrosa *et al.*, 2006).

Antes de la fase de endurecimiento, las plantas pueden disponer de una calidad morfológica y sanitaria óptima y un contenido en nutrientes adecuado, pero suelen ser vulnerables a factores de estrés porque se hallan en crecimiento activo. Es en este momento cuando la planta debe ser “endurecida” para que sus mecanismos fisiológicos y morfológicos de resistencia a factores de estrés sean potenciados. Para garantizar un desarrollo óptimo de una plantación es esencial que todas las plantas que salgan al campo estén, de un modo u otro, suficientemente endurecidas, el endurecimiento puede realizarse *in vitro* para mejorar el porcentaje de aclimatación de las plántulas obtenidas por CTV. Es más común el endurecimiento de plántulas en condiciones de invernadero y/o vivero (Vilagrosa *et al.*, 2006).

### 1.10. Medios de cultivo

Los medios de cultivo son soluciones acuosas donde se desarrollan microorganismos o células o tejidos vegetales y/o animales. El desarrollo de éstos solo ocurre en presencia de los nutrientes requeridos (que dependen del microorganismo o tipo de células o tejido en particular). La composición del medio de cultivo garantiza que se le suministren los nutrientes al tejido vegetal “*in vitro*” y debe ser muy parecido a las condiciones nutricionales que ofrece el suelo a las plantas en su estado natural (tabla 3). Los componentes principales del medio son: macronutrientes, micronutrientes, vitaminas, aminoácidos, azúcares, agentes gelificantes y hormonas o reguladores de crecimiento (Perea y Tirado, 2011). La composición del medio de cultivo es uno de los principales factores a tener en cuenta para lograr una respuesta morfológica deseada, estimular la diferenciación y conducir el crecimiento de tejidos vegetales *in vitro*. Todos los medios contienen como componentes principales: agua, sustancias orgánicas y sustancias inorgánicas. Los medios de cultivo sólidos llevan además un agente solidificante. Los medios de cultivo poseen una serie de componentes generales y específicos cuya presencia, combinación y concentración dependerá de los objetivos que se persigan en su utilización (Tablas 3 y 4). Este debe tener los nutrientes esenciales para la planta (Sharry *et al.*, 2015).

**Tabla 3.** Funciones de los macronutrientes agregados al medio de cultivo.  
Adaptado de: Biología de las plantas Vol 2 (Raven *et al.*, 1992).

Elemento	Forma principal de absorción del elemento	Concentración usual en plantas	Principales funciones
<b>Macronutrientes</b>			
Carbono (C)	CO <sub>2</sub>	44-%	Componentes de compuestos orgánicos
Oxígeno (O)	H <sub>2</sub> O u O <sub>2</sub>	44 %	Componentes de compuestos orgánicos
Hidrogeno (H)	H <sub>2</sub> O	6 %	Componentes de compuestos orgánicos
Nitrógeno (N)	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> o NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	1 – 4 %	Aminoácidos, proteínas, nucleótidos, ADN, ARN, clorofila, coenzimas y polímeros de la pared celular.
Potasio (K)	K <sup>+</sup>	0.5 – 6 %	Enzimas, aminoácidos y síntesis proteica, apertura y cierre estomático, activador de muchas enzimas.
Calcio (Ca)	Ca <sup>2+</sup>	0.2 – 3.5 %	Calcio de las paredes celulares, cofactor enzimático, permeabilidad celular, etc
Fósforo (P)	H <sub>2</sub> PO <sub>2</sub> <sup>-</sup> - H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> <sup>-2</sup>	0.1 – 0.8 %	Formación de compuestos fosfatados de alta energía (ADP y ATP), ácidos nucleicos, fosforilación de azúcares, fosfolípidos y coenzimas esenciales.
Magnesio (Mg)	Mg <sup>2+</sup>	0.1 – 0.8 %	Parte de la molécula de clorofila. Activador de muchas enzimas. Presenta antagonismo con otros iones como calcio y potasio.
Azufre (S)	SO <sub>4</sub> <sup>-2</sup>	0.05 – 1%	Elemento estructural en algunos aminoácidos y proteínas. Coenzima A

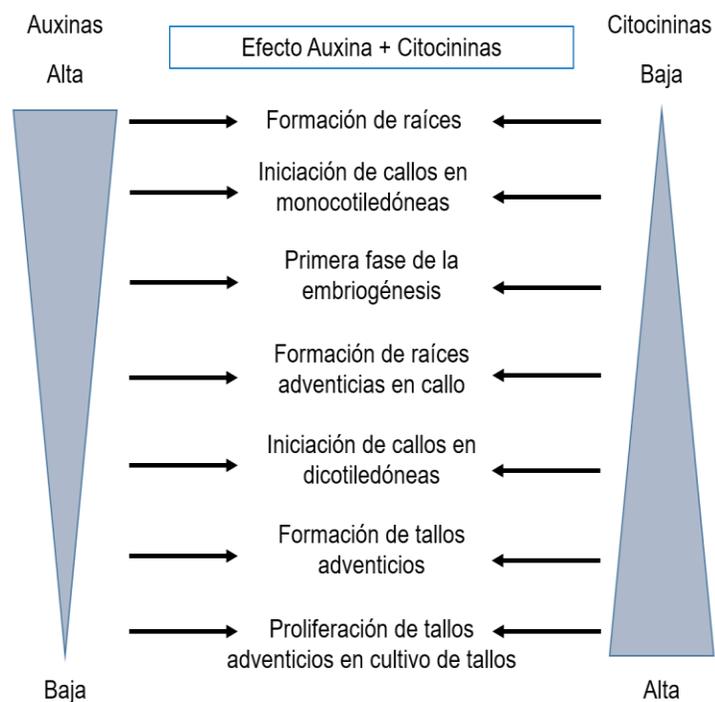
**Tabla 4.** Función de micronutrientes agregados en el medio de cultivo.  
Adaptado de: Biología de las plantas Vol 2 (Raven *et al.*, 1992).

Elemento	Forma principal de absorción del elemento	Concentración usual en plantas	Principales funciones
<b>Micronutrientes</b>			
Hierro (Fe)	$\text{Fe}^{2+}$ o $\text{Fe}^{3+}$	25-300 ppm	Síntesis de clorofila, citocromo y nitrogenasa
Cloro (Cl)	Cl	100-10.000 ppm	Ósmosis y equilibrio iónico, relacionado con el desprendimiento de oxígeno en el fotosistema II.
Cobre (Cu)	$\text{Cu}^{2+}$	4-30 ppm	Activador de ciertas enzimas
Manganeso (Mg)	$\text{Mn}^{2+}$	15-800 ppm	Activador de ciertas enzimas. Actualmente se lo relaciona con la cadena de transporte de electrones (fotosistema II)
Zinc (Zn)	$\text{Zn}^{2+}$	15-100 ppm	Activador de ciertas enzimas. Íntimamente relacionado con la biosíntesis de auxinas
Molibdeno (Mo)	$\text{MoO}_4^{2-}$	0.1-5.9 ppm	Fijación del nitrógeno atmosférico y asimilación de nitratos, forma parte de ciertas proteínas
Boro (B)	$\text{BO}_3$ - $\text{B}_4\text{O}_7^{2-}$	5-75 ppm	Influencia en la utilización del calcio, facilita el transporte de azúcares, se lo relaciona con la síntesis de ácido giberélico.

### 1.11. Reguladores de crecimiento vegetal

Los reguladores de crecimiento vegetal (RCV) son compuestos químicos orgánicos de origen natural o sintético cuya función es regulatoria, más que nutricional, en el crecimiento y desarrollo de los tejidos vegetales. También se conocen como fitohormonas u hormonas vegetales, generalmente son activos a muy bajas concentraciones y tienen la capacidad de modificar el crecimiento vegetal. Los RCV muestran efectos muy significativos en la respuesta de los tejidos

vegetales, porque determinan hasta cierto grado los patrones de desarrollo y los resultados obtenidos de los mismos (Figura 4). Los RCV que se producen de forma natural en los tejidos vegetales se denominan endógenos y los que se adicionan de forma externa exógenos. Son muy importantes en campos como la agricultura y el cultivo de tejidos vegetales (Hurtado, 1987; Pérez *et al.*, 1999; George *et al.*, 2008; Bhojwani & Dantu, 2013). Las auxinas, el ácido abscísico, las citocininas, el etileno y las giberelinas se reconocen comúnmente como las cinco clases principales de reguladores de crecimiento vegetal. Las auxinas, citocininas y las interacciones auxina-citocinina generalmente se consideran las más importantes para regular el crecimiento y el desarrollo organizado en tejidos de plantas y cultivos de órganos, ya que estas dos clases de hormonas son generalmente requeridas (Evans *et al.*, 1981; Vasil y Thorpe, 1994).



**Figura 4.** Concentraciones relativas de auxinas y citocininas requeridas para generar distintas respuestas en el cultivo *in vitro*. Tomado y traducido de George *et al.*, (2008).

Sin embargo, el ácido abscísico, el etileno, las giberelinas y otros compuestos similares a las hormonas tienen funciones reglamentarias que no deben ignorarse en los sistemas de cultivo. Por ejemplo, aunque es posible que no sea necesario agregar ácido abscísico, etileno y giberelinas a las células cultivadas para asegurar la organogénesis o la proliferación celular, esto no significa que estos RCV no tengan importancia. Más bien, se están sintetizando en los

tejidos y están desempeñando un papel activo, pero oculto, en el crecimiento y el desarrollo. Las auxinas y citocininas agregadas interactuarán con otros RCV endógenos.

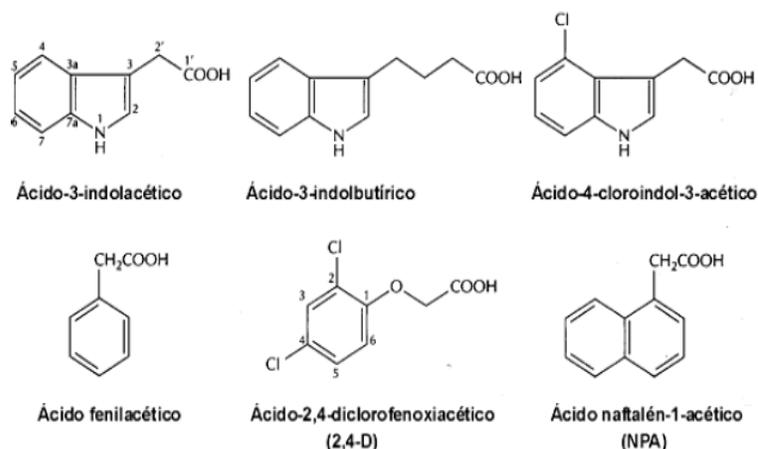
Existen compuestos sintéticos que actúan como RCV y también se denominan "reguladores del crecimiento de las plantas" (Davies, 1995). Muchos de estos RCV se han descubierto con una actividad biológica que es igual o superior a las endógenas equivalentes (Tabla 5). Además de estos compuestos útiles, ahora hay una gran cantidad de sustancias químicas que interfieren (generalmente inhiben) con la síntesis, transporte o acción de los RCV endógenas. Estos inhibidores son extremadamente útiles en el estudio del papel de los RCV en cultivos *in vitro*. Además de los RCV clásicas, en los últimos años se han descubierto nuevas sustancias de crecimiento natural con funciones reguladoras en cultivos de tejidos (Gross y Parthier, 1994).

**Tabla 5.** Ejemplos de reguladores de crecimiento vegetal

Clase de regulador	Abreviatura	Nombre químico
Auxinas	AIA ANA AIB ApCFA 2,4-D Picloran ANOA	Ácido 3-indolacético Ácido naftalenoacético Ácido Indolbutírico Ácido (4-clorofenoxi) acético Ácido 2, 4 -diclorofenoxiacético Ácido 4-amino-3, 5, 6-tricloropico-Ílnico Ácido naftoxiacético
Citocininas	Cinetina (CIN) BAP (BA) 2Ip Zeatina (ZEA) ABA Thidiazurón (TDZ)	6-furfurilaminopurina 6-benzilaminopurina, 6 -benziladenina Isopentiladenina N-(4-hidroxi-3-metilbut -2-enil) aminopurina (6-benzilamino) -9-2-tetrahidropiranil -9H-purina 1-fenil-3(1,2,3-tidiazol-5il) urea
Giberelinas	Ácido Giberélico	2, 4a, 7-trihidroxi- 1metil-8-metilen -gib-3-ene1, 10-ácido carboxílico -1 , 4-lactona
Inhibidores de Etileno	Aba Etileno Ethephon, Ether	Ácido abscísico C2H4 Ácido 2- cloroetilfosfónico

## 1.12. Auxinas

Las auxinas constituyen un grupo de hormonas vegetales que controlan múltiples procesos. El nombre auxina se deriva del griego *auxein*, que significa “aumentar” o “crecer”, dado su función de elongación. Las auxinas son reguladores de crecimiento que se encargan de la elongación celular, dominancia apical, formación de raíces adventicias y embriogénesis somática, el desarrollo de tejidos vasculares; así como la división, el alargamiento y la diferenciación celular. Estas hormonas, pueden estimular o inhibir el crecimiento dependiendo de su concentración y localización en la planta (respuestas tejido- específicas). A concentraciones bajas, generalmente se ve favorecida la iniciación del enraizamiento y a concentraciones altas puede ocurrir la formación de callo. Las auxinas en combinación con citocininas también promueven el crecimiento de callos y de células en suspensión. Generalmente, las monocotiledóneas requieren concentraciones altas de 2,4-D en un rango de 10-50  $\mu\text{M}$  para inducción de callos. Existen varias auxinas (Figura 5) como el ácido indol-3-acético (AIA), presente en la mayoría de las plantas de forma natural, así como auxinas producidas de forma sintética, tales como el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), ácido naftalenacético (ANA) y ácido indol butírico (AIB) (Guilfoyle *et al.*, 1998; Trigiano *et al.*, 2005).



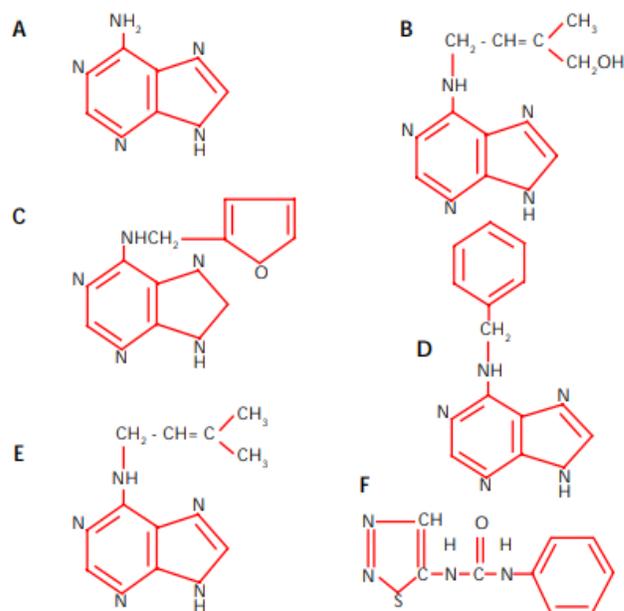
**Figura 5.** Estructura química de las principales auxinas utilizadas en el cultivo de tejidos vegetales, tomado de Ayala, (2012).

En cuanto al mecanismo de acción de las auxinas, se conoce que ellas aumentan la plasticidad de la pared celular, lo que permite la expansión de la célula (Abel & Theologis, 1996). La elongación inducida por auxinas se inicia al unirse al receptor, localizado en la cara externa de la membrana plasmática, lo que desencadena una cascada de eventos que determinan la secreción de protones por la célula. Como resultado de esta acidificación, se activan proteínas que rompen los enlaces cruzados entre las moléculas de celulosa y permiten la elongación

cuando aumenta la presión de turgencia. Durante este proceso se han detectado cambios en las concentraciones del trifosfato de inositol y del calcio iónico citoplasmático, los que actuarían como segundos mensajeros (Cleland, 1995).

### 1.13. Citocininas

Las citocininas *in vivo* incrementan la tasa de división celular, el transporte de solutos hacia las hojas, semillas, flores y frutos y producen un retardo de la senescencia de las hojas (Salisbury & Ross, 1994). Entre las principales citocininas utilizadas para el CTV están la adenina, la zeatina, la cinetina, la bencilaminopurina o bencil adenina y el thidiazuron (Figura 6). Las funciones principales *in vitro* de este grupo son promover la división celular y estimular el desarrollo de brotes, además actúan en la formación y desarrollo de callos, inhiben la formación de raíz, estimulan el crecimiento de yemas axilares, inhiben la elongación de los brotes, estimulan la diferenciación de brotes adventicios de callos y órganos y modifican la dominancia apical. De acuerdo con la concentración se puede favorecer uno u otro efecto, de esta manera cuando la concentración es alta (1-10 mg/L) estos inducen la formación de brotes adventicios, pero se inhibe la formación de raíces (Trigiano & Gray, 2005).



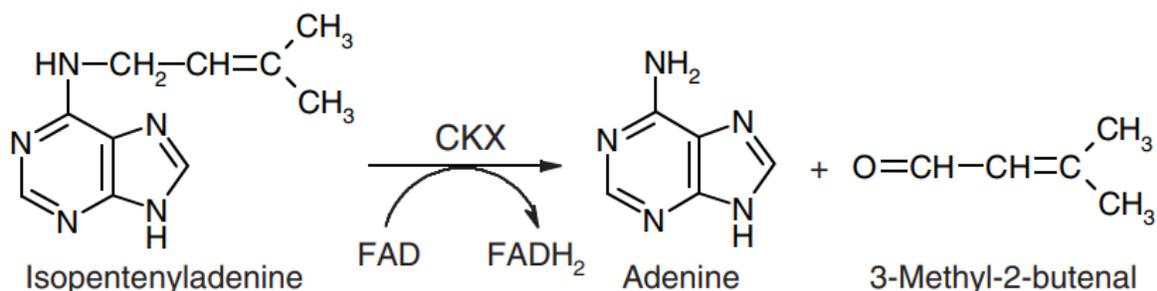
**Figura 6.** Estructura química de las principales citocininas usadas en cultivo de tejidos. A: Adenina; B: Zeatina; C: Cinetina; D: BA; E: 2iP; F: TDZ.

Además de las citocininas derivadas de adenina, se han detectado una serie de fenilureas sustituidas que tienen similar actividad y son utilizados como citocininas en algunos protocolos

de cultivo de tejidos vegetales (Krikorian, 1995; Christianson & Hornbuckle, 1999). Tales compuestos son el thidiazuron (TDZ), la N,N'-difenilurea (DPU) y la cloropiridilfenilurea (CPPU).

#### 1.14. Enzima Citocinina oxidasa/deshidrogenasa

Las citocininas regulan los procesos esenciales de las plantas, incluida la división celular, el desarrollo de los brotes, las raíces y los órganos reproductivos, el llenado de semillas y la senescencia (Kieber y Schaller, 2014). La citocinina oxidasa/ deshidrogenasa (CKX) es un factor importante en el control de citocininas en los tejidos que cataliza su degradación oxidativa irreversible a adenina/adenosina y el aldehído correspondiente (Figura 7) (Whitty y Hall, 1974; Brownlee *et al.*, 1975).



**Figura 7.** Reacción enzimática catalizada de la CKX (Schmülling *et al.*, 2003).

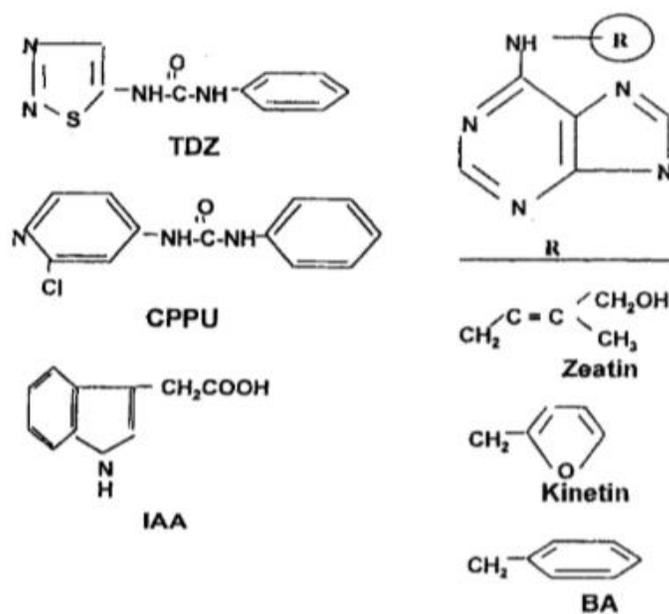
Esta actividad enzimática se ha detectado en diferentes tejidos de un gran número de plantas superiores (Armstrong, 1994). Es la única enzima capaz de romper la cadena lateral de ciertas citocininas (CKs) provocando la inactivación irreversible de esos reguladores de crecimiento. Esta enzima presenta especificidad de sustrato por la isopentenil-adenina (iP) y su ribósido (iPR) preferentemente, aunque también puede actuar sobre la Zeatina (Z) y su ribósido (RZ) (Hare y Van Staden, 1994).

Esta especificidad tiene relevancia debido a la implicación de las distintas formas de CKs en los diferentes estados de desarrollo de la planta (Dieleman *et al.*, 1997). En este sentido, en trabajos anteriores observamos que la iP e iPR aparecen asociadas a estados juveniles mientras que Z, RZ, dihidrozeatina (DHZ) y su ribósido (RDHZ) son las formas predominantes en los estados adultos (Martín, 2004). La presencia diferencial de CKs de distinta naturaleza dependiendo del estado de desarrollo de la planta, órgano o tejido concreto sugiere que el metabolismo de las CKs y las interconversiones de reguladores de crecimiento entre otros, podrían estar directamente implicados en la regulación de los procesos de maduración y envejecimiento en las plantas (García *et al.*, 2004).

Cada isoforma de CKX generalmente difiere en la especificidad del sustrato, los patrones de expresión espacial y temporal y la localización subcelular (Šmehilová *et al.*, 2009; Vroubalová *et al.*, 2009). Se ha demostrado que cuando los niveles de citocininas endógenas aumentan ligeramente durante ciertos períodos, se puede lograr una mejora en las características agrícolas. Por ejemplo, una reducción o pérdida de función de OsCKX2 en el arroz (*Oryza sativa*) condujo a la acumulación de citocininas en los meristemos de la inflorescencia, lo que resultó en un mayor número de órganos reproductores. El número total de granos por planta se incrementó en 30% y el tamaño del grano no se vio afectado (Ashikari *et al.*, 2005).

### 1.15. Thidiazuron

El thidiazuron es un potente regulador de la regeneración de plantas *in vitro* y el crecimiento posterior (Murthy *et al.*, 1998). El thidiazuron (N-phenyl-N'-1,2,3-thidiazol-5-ylurea) es un compuesto amarillo cristalino claro que es poco soluble en agua, altamente soluble en etanol y soluble en diversos grados en otros solventes orgánicos, incluyendo acetona, benceno, DMSO, etc. (Preece *et al.*, 1991). Estructuralmente, el TDZ es bastante diferente de las auxinas o de las citocininas de tipo adenina (Figura 8). Hay dos grupos funcionales en la molécula TDZ, los grupos fenilo y thidiazol, y la sustitución de cualquiera de estos grupos con otras estructuras de anillo produce la reducción de la actividad (Mok *et al.*, 1982).



**Figura 8.** Comparación de estructuras químicas de las fenilureas (TDZ, CPPU), auxina (IAA) y citocininas de tipo adenina (zeatina, cinetina y BA), tomado de Murthy *et al.*, (1998)

Curiosamente, la N,N'-di-Thiadiazolurea simétrica es el compuesto con la menor actividad similar a las citocininas, una indicación de los roles complementarios de las dos estructuras anulares (fenilo y thidiazol) en las respuestas inducidas por TDZ (Mok *et al.*, 1982).

En estudios *in vitro*, TDZ exhibe un alto nivel de actividad a concentraciones tan bajas como 10 ppm (Preece *et al.*, 1991) y la exposición del tejido vegetal a TDZ durante un período relativamente corto es suficiente para estimular la regeneración (Visser *et al.*, 1992; Hutchinson y Saxena, 1996). Estas características distinguen la TDZ de otros reguladores de crecimiento de plantas naturales o sintéticos. Estudios recientes demostraron que el TDZ se asocia frecuentemente con el metabolismo de los reguladores del crecimiento de las plantas. En realidad, el TDZ se clasificó como citocinina debido a la inducción de citocininas naturales como respuesta. Posteriormente, se registra un aumento en la auxina endógena, el etileno y el ABA en respuesta al tratamiento con TDZ (Yip y Yang, 1986; Murthy *et al.*, 1995; Murthy *et al.*, 1998).

El thidiazuron es relativamente estable en los sistemas de regeneración y las respuestas fisiológicas pueden inducirse incluso después del almacenamiento a largo plazo de las soluciones madre. Hallazgos recientes indican la formación de polímeros de longitud corta de moléculas de TDZ durante el almacenamiento prolongado. Por lo tanto, es probable que la eficacia del TDZ pueda atribuirse, en parte, al almacenamiento de moléculas del TDZ como polímeros de longitud corta y la posterior liberación de estas moléculas más adelante en el cultivo (Murthy *et al.*, 1998).

El TDZ ha sido ampliamente utilizado en ensayos de CTV en diferentes especies de plantas a diferentes concentraciones para inducir diferentes respuestas *in vitro* (Tabla 6).

**Tabla 6.** Diferentes efectos fisiológicos del TDZ en diferentes especies vegetales. Tomado y traducido de Pai & Desai, 2018.

<b>Efecto de TDZ en varios cultivos de plantas <i>in vitro</i>.</b>			
<b>Concentraciones de TDZ para inducción de embriones somáticos en diferentes plantas.</b>			
<b>Planta</b>	<b>TDZ</b>	<b>Otros Reguladores</b>	<b>Referencia</b>
<i>Crocus spp.</i>	2.0 mg/L	IAA (2.0 mg/L) & BAP (2.0 mg/L)	Verma <i>et al.</i> , (2016)
<i>Mirabilis jalapa</i>	0.5 mg/L	BAP (2.0 mg/L)	Rohela <i>et al.</i> , (2016)
<i>Lachenalia montana</i>	1 µM	2, 4D (0.5 µM)	Baskaran and Van Staden (2017)
<i>Crocus olivieri</i>	2.0 mg/L	IAA (2.0 mg/L)	Verma <i>et al.</i> , (2016)
<i>Malaxis densiflora</i>	6.80 mg/L	2, 4D (3.39 mg/L)	Mahendran and Bai (2016)
<i>Crocus sativus</i>	2.5 µM	Picloram (2.00 µM)	Devi <i>et al.</i> , (2014)
<i>Lachenalia viridiflora</i>	1.0 µM	Picloram (2.50 µM)	Kumar <i>et al.</i> , (2016)
<i>Digitalis trojana</i>	1.0 mg/L	IAA (0.5 mg/L)	Verma <i>et al.</i> , (2012)
<i>Cajanus cajan</i>	10.0 µM	–	Singh <i>et al.</i> , (2003)
<i>Azadirachta sp.</i>	1.0 µM	–	Gairi and Rashid (2004)
<b>Concentraciones de TDZ para inducción de brotes en diferentes plantas.</b>			
<b>Planta</b>	<b>TDZ</b>	<b>Otros Reguladores</b>	<b>Referencia</b>
<i>Phalaenopsis spp.</i>	0.5 mg/L	2,4D (0.5 mg/L)	Chen <i>et al.</i> , (2000)
<i>Aconitum balfourii</i>	0.5 mg/L	–	Gondval <i>et al.</i> , (2016)
<i>Solanum tuberosum</i>	2.0 mg/L	–	Sherkar and Chavan (2002)
<i>Oryza sativa</i>	0.5 mg/L	BAP (0.5 mg/L), (Kn 1.5 mg/L), NAA (0.5 mg/L)	Dina <i>et al.</i> , (2016)
<i>Brassica oleracea</i>	0.33 y 0.088 mg/L	Adenina (79.70 mg/L) y IAA (0.22 mg/L)	Gambhir <i>et al.</i> , (2017)
<i>Curcuma soloensis</i>	2.5 µM	BA (9.0 µM), NAA (1.2 µM)	Zhang <i>et al.</i> , (2011)
<i>Swertia lawii</i>	3.0 mg/L	IBA (0.3 mg/L)	Kshirsagar <i>et al.</i> , (2015)
<i>Ancistrocladus heyneanus</i>	6.81 µM	BAP (13.31 µM)	Pai <i>et al.</i> , (2008)
<i>Achyranthes aspera</i>	0.1 mg/L	BAP (3.0 mg/L)	Pai <i>et al.</i> (2017)
Fresa	0.5 mg/L	2, 4 D (0.02 mg/L)	Cappelletti <i>et al.</i> (2016)
Arándano	0.5 mg/L	2iP (0.2 mg/L)	Cappelletti <i>et al.</i> (2016)
<i>Agapanthus praecox</i>	4.5 µM	BA (22.2 µM) & IAA (2.9 µM)	Baskaran and Van Staden (2013)
<b>Concentraciones de TDZ para inducción de callos en diferentes plantas</b>			
<b>Planta</b>	<b>TDZ</b>	<b>Otros Reguladores</b>	<b>Referencia</b>
<i>Phalaenopsis spp.</i>	0.5 mg/L	2,4D (0.5 mg/L)	Chen <i>et al.</i> , (2000)
<i>Crocus spp</i>	4.0 mg/L	NAA (4.0 mg/L)	Verma <i>et al.</i> , (2016)
<i>Aconitum balfourii</i>	0.5 mg/L	NAA (1.0 mg/L)	Gondval <i>et al.</i> , (2016)
<i>Fragaria x ananassa</i>	0.5 mg/L	0.2 & 2, 4 D (0.02) mg/L	Cappelletti <i>et al.</i> , (2016)
<i>Hypericum triquetrifolium</i>	0.4 mg/L	IAA (0.5) mg/L	Azeez <i>et al.</i> , (2017)
<i>Curcuma soloensis</i>	2.5 µM	BA (1.2 µM), 2, 4 D (1.2 µM)	Zhang <i>et al.</i> , (2011)
<i>Cymbidium spp</i>	0.01 mg/L	NAA (0.1) mg/L	Huan <i>et al.</i> , (2004)
<i>Artemisia absinthium</i>	2.0 mg/L	NAA (1.0) mg/L	Tariq <i>et al.</i> , (2014)
<i>Digitalis spp.</i>	0.5 mg/L	IAA (0.25) mg/L	Cingoz <i>et al.</i> , (2014)
<i>Mangosteen</i>	2.25 µM	BA (2.22) mg/L	Te-chato and Lim (2000)

### 1.16. Modo de acción del TDZ

El thidiazuron (TDZ) es uno de los compuestos sintéticos más utilizados en la agricultura, que muestra un fuerte efecto de citocinina basado en una combinación de dos actividades: una fuerte actividad de citocinina (Mok *et al.*, 1982; Yamada *et al.*, 2001; Spíchal *et al.*, 2004) y también inhibe la enzima citocinina oxidasa/ deshidrogenasa.

Las citocininas naturales son derivados de adenina con una cadena lateral N6 distinta. En las plantas, los niveles de citocinina están regulados por la enzima citocinina oxidasa/ deshidrogenasa (abreviada como CKO o CKX, EC 1.5.99.12). CKX cataliza la degradación oxidativa irreversible de citocininas para formar adenina/adenosina y el aldehído correspondiente (Whitty y Hall 1974; Brownlee *et al.*, 1975; Chatfield y Armstrong 1986). El efecto negativo de TDZ sobre la actividad de CKX fue observado por primera vez por Chatfield y Armstrong (1986) en el tejido calloso de *Phaseolus vulgaris*. El TDZ inhibió la descomposición de N6-(2-isopentenyl) adenine-8-14C en la misma medida que el exceso de N6- (2-isopentenil) adenina sin marcar. Los autores plantearon la hipótesis de que el TDZ podría ser el sustrato de CKX y, por lo tanto, competir con la citocinina en el sitio activo de la enzima, pero no se excluyeron otros mecanismos de inhibición. Estudios más recientes han demostrado que los derivados de fenilurea, incluido el TDZ, son inhibidores competitivos de CKX (Bilyeu *et al.*, 2001; Kopečný *et al.*, 2010; Nisler *et al.*, 2016). Para concluir, TDZ, además de un efecto directo de citocinina a nivel del receptor, puede aumentar las concentraciones de citocininas endógenas en las plantas, lo que en conjunto podría resultar en una respuesta mejorada de la planta a la señal de citocinina. Sin embargo, el TDZ es aparentemente un inhibidor débil de las enzimas CKX, en comparación con otros compuestos de tipo urea. Además de eso, se informó que la aplicación de citocinina exógena induce una fuerte expresión de genes CKX (Mik *et al.*, 2011). Por lo tanto, es muy posible que el nivel de citocininas endógenas disminuya en las plantas después del tratamiento con TDZ y que la respuesta de la planta a las citocininas sea principalmente la respuesta a TDZ. De hecho, lo más probable es que el fuerte efecto de citocinina del TDZ esté asociado con su alta capacidad para activar los receptores de citocinina y la incapacidad de CKX para degradarlo (Nisler, 2018).

### 1.17. Trabajos de cultivo in vitro de *C. palmata*

Los estudios de regeneración *in vitro* de *C. palmata* son escasos. En Colombia investigadores de la Universidad Nacional de Colombia (Hoyos *et al.*, 2016) evaluaron el porcentaje de germinación de semillas de *C. palmata* en tres diferentes sustratos, para obtener plántulas e

iniciar un cultivo de tejidos y desarrollar un sistema de regeneración y multiplicación *in vitro*. Sin embargo, no existen trabajos publicados posteriores a su reporte.

Otro estudio fue realizado por Chan (2019) que tuvo como objetivo establecer un método de asepsia y evaluar la capacidad del TDZ para inducir la proliferación celular en *C. palmata* y para lograrlo se introdujeron material de campo utilizando etanol e hipoclorito de sodio para la desinfección de explantes obtenidos de los meristemos basales de *C. palmata*. Posteriormente, los explantes fueron sembrados con diferentes concentraciones de Thidiazuron (TDZ) adicionados al medio PC. Los resultados señalan una respuesta óptima con 3.5  $\mu\text{M}$  de TDZ. A esta concentración, se obtuvo la formación de brotes demostrándose la capacidad del TDZ para inducir la proliferación de brotes. En este trabajo se concluyó que las concentraciones de TDZ tienen que ser optimizados, para la obtención de un protocolo confiable y reproducible.

En un estudio más reciente, Hoyos *et al.* (2020) evaluaron el efecto de la concentración de 6-bencilaminopurina (BAP) en la formación de nuevos brotes y del ácido 1-naftalenacético (ANA) en la formación de raíces en medio MS, así como, la adaptación en condiciones de vivero de *C. palmata*. Se sembraron explantes de plántulas *in vitro* de 0.5 cm de longitud con 15 mL de MS semisólido en diferentes concentraciones de BAP y se cultivó bajo condiciones *in vitro* durante 90 días. Finalmente, evaluaron diferentes sustratos en la adaptación de plántulas de *C. palmata* producidas *in vitro*, bajo condiciones de invernadero por un período de 80 días. La tasa de multiplicación más alta ( $17\pm 3$  brotes por explante) fue obtenida con 2.0 mg/L de BAP. La formación de raíces fue eficiente en todos los tratamientos, sin diferencias estadísticas significativas. En el experimento de sustratos, el uso de la mezcla tierra- cáscara de arroz- t15 (fertilizante triple 15) fue el mejor tratamiento en el crecimiento de plántulas *C. palmata*, bajo condiciones de invernadero.

### **1.18. Recapitulación**

*Carludovica palmata* es una especie de importancia sociocultural en la zona norte del estado Campeche, su principal uso es como fuente de fibras naturales para la obtención de diferentes artesanías de las que destacan los sombreros de Panamá. Esta especie presenta limitaciones para su cultivo debido a su problema de germinación de sus semillas y lenta propagación vegetativa.

El cultivo de tejidos vegetales es una herramienta que permite la producción masiva de plantas mediante una técnica llamada micropropagación que consta de cinco etapas bien definidas. Para lograr la multiplicación exitosa de una especie *in vitro* se tienen que considerar ciertos parámetros

como lo son, una correcta desinfección del material vegetal, mediante la selección de una amplia gama de desinfectantes, correcta elección del medio de cultivo que esta adicionado con diferentes compuestos como vitaminas, fuente de carbono, macronutrientes, micronutrientes y los reguladores del crecimiento vegetal que son imprescindibles en la etapa de proliferación celular. La multiplicación se logra mediante el balance de dos de los reguladores de crecimientos más importantes auxinas y citocininas que son adicionadas al medio de cultivo para estimular una respuesta en el explante.

El thidiazuron es una citocinina sintética que ha sido usada exitosamente para regenerar múltiples especies vegetales, en un amplio rango de concentraciones y con diferentes respuestas morfológicas. El éxito del TDZ se le atribuye a su capacidad de inhibir a la citocinina oxidasa deshidrogenasa que es la encargada de degradar las citocininas endógenas de las plantas.

## Justificación

*C. palmata*, es fuente de una de las principales fibras naturales que permite obtener productos del tipo artesanal. Lo cual la convierte en una de las principales fuentes de desarrollo agro artesanal y más aún, con un alto valor agregado por el hecho de que actualmente, las fibras naturales están recuperando espacio en el mercado mundial, debido a que son insumos ventajosos en sostenibilidad y protección del medio ambiente (Simbaña, 2000).

*C. palmata* presenta dos tipos de reproducción. La sexual por medio de la generación de semillas, y la asexual por la proliferación mediante rizomas. La reproducción sexual vía semillas presenta limitaciones para poder expandir la superficie de cultivo, debido a la dormancia y a la baja viabilidad y germinación en condiciones de campo para la obtención de plántulas. La reproducción asexual, debido a su baja eficiencia a través de la propagación vegetativa vía rizomas, también dificulta la expansión del cultivo. Sumado a lo anterior igual se presentan limitaciones fuera de ámbito biológico y agronómico, como son el factor económico y el factor social.

Una solución viable para contribuir a aminorar el problema de desabasto de material vegetativo, abordando la problemática desde el punto de vista biológico de las plantas, sería el uso del cultivo de tejidos vegetales para la propagación y obtención de plántulas en menor tiempo posible para posteriormente permitir la expansión de la superficie de cultivo y así poder satisfacer la demanda de fibra.

El presente estudio, también sería de los primeros trabajos donde se reporta la regeneración y multiplicación de plantas por técnicas de cultivo *in vitro* para *C. palmata*.

## Objetivos

### Objetivo General.

- Establecer un protocolo de regeneración *in vitro* para *C. palmata*

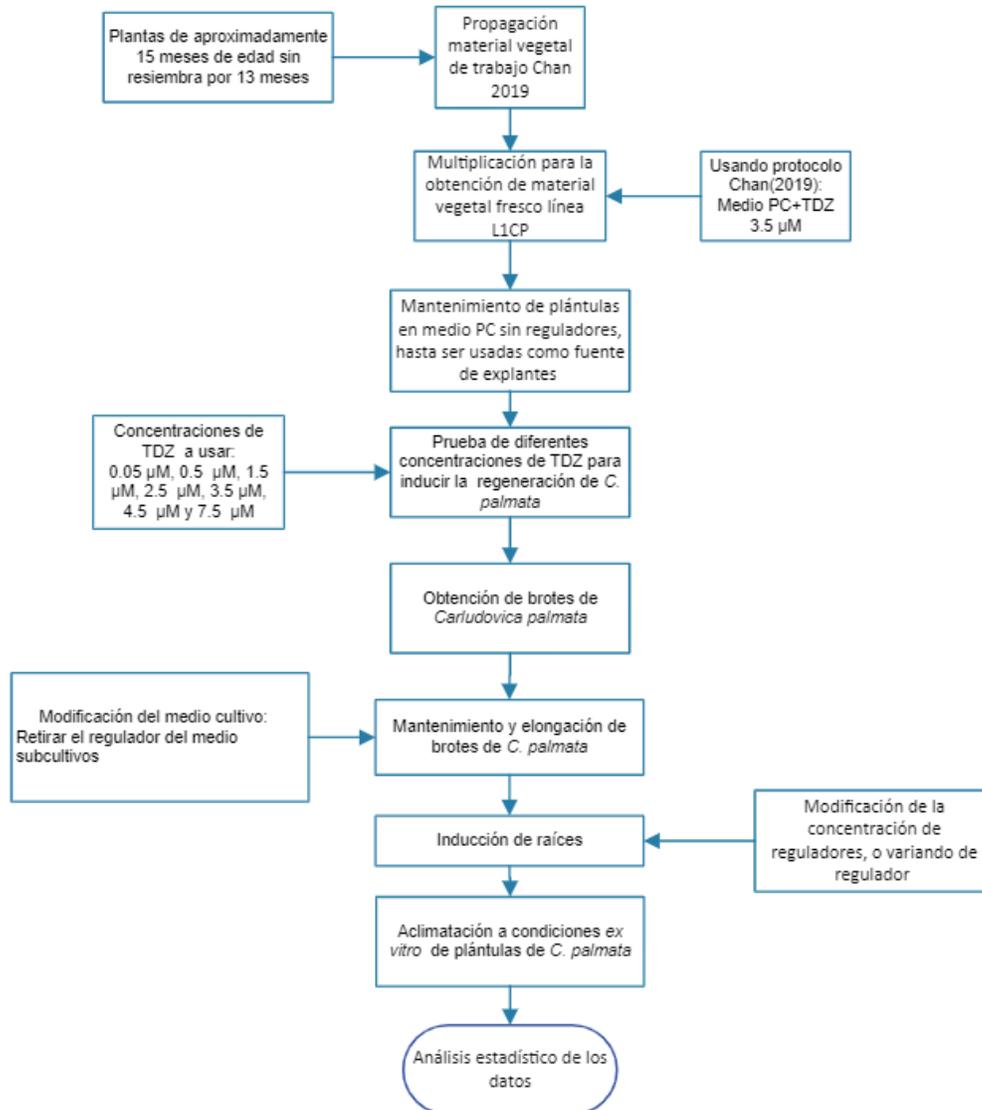
### Objetivos Específicos

- Inducir *in vitro* la formación de brotes a partir de yemas axilares de *C. palmata* empleando diferentes concentraciones de TDZ.
- Mantener y elongar los brotes *in vitro* de *C. palmata* en medio PC mediante manipulación de la concentración de TDZ u otros reguladores de crecimiento.
- Aclimatar a condiciones *ex vitro* las plántulas de *C. palmata* obtenidas *in vitro*.

## CAPITULO II. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1 Estrategia experimental

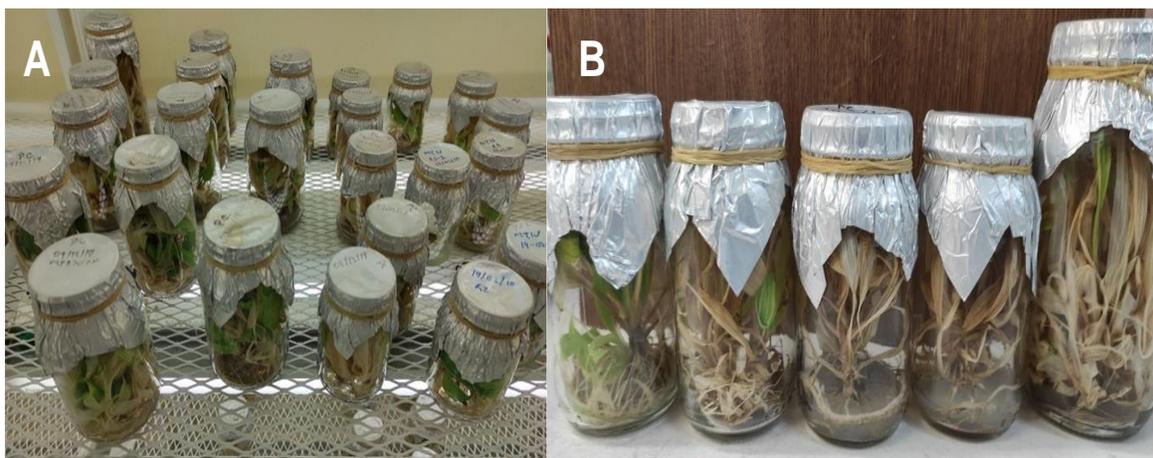
La estrategia experimental consistió en utilizar plantas de *C. palmata* establecidas *in vitro* por Chan (2019), debido a las restricciones impuestas por la pandemia de COVID 19 durante los años 2020 y 2021, las cuales se multiplicaron para contar con el material para realizar los experimentos (Figura 9).



**Figura 9.** Estrategia experimental para realizar los ensayos de CTV con *C. palmata*.

## 2.2 Obtención de plántulas *in vitro* para ensayos con TDZ

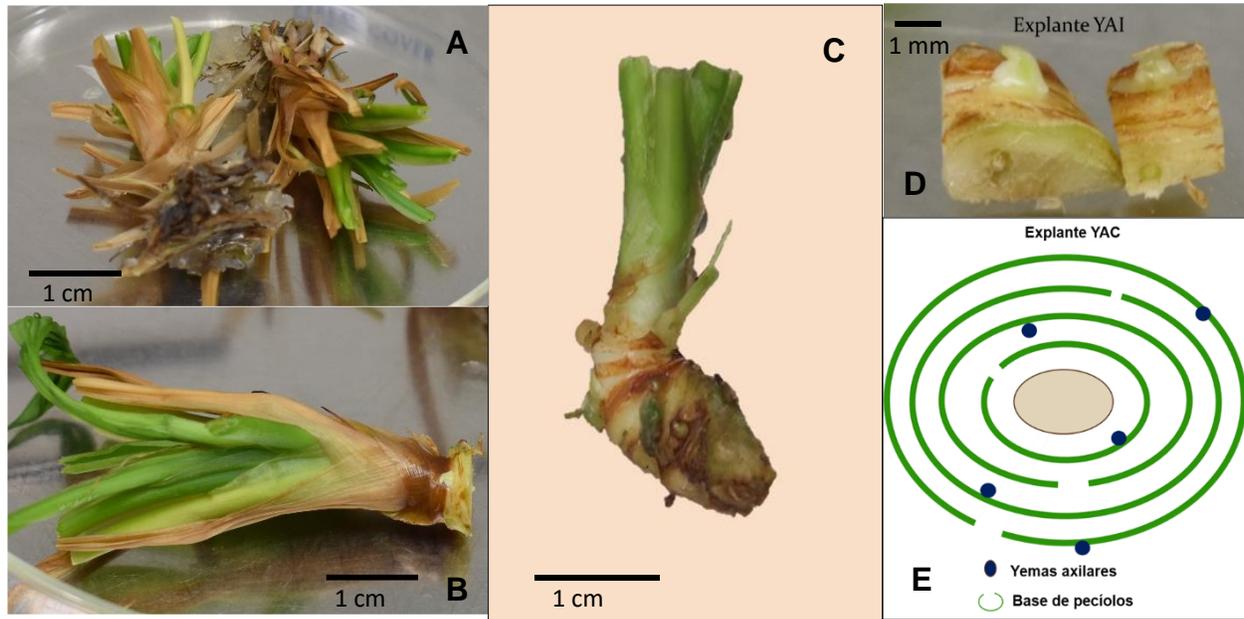
En los ensayos de optimización de las concentraciones de TDZ para *C. palmata*, se usaron plantas regeneradas *in vitro* como fuente de material vegetal para la obtención de los explantes, esto derivado de la situación de la pandemia COVID-19, la cual limitó las salidas de campo para la recolección de material vegetal, por lo que se planteó el uso de plántulas de *in vitro* que se obtuvieron en los ensayos de regeneración hechos por Chan en el 2019. Dichas plántulas tenían 18 meses *in vitro*, sin ser resembradas por 13 meses (Figura 10).



**Figura 10.** Plántulas de *C. palmata* cultivadas *in vitro* durante 13 meses sin resiembra. A) Frascos con plántulas de la línea L1CP; B) Se observan plántulas de la línea L2CP.

Se realizó un experimento inicial para la multiplicación del material vegetal a partir de explantes de plántulas *in vitro* ya existentes de las líneas L1CP y L2CP de *C. palmata*. Este experimento fue realizado para la obtención de más vitroplántulas, ya que la mayoría del material vegetal se perdió durante el tiempo de inactividad en el CICY, debido a restricciones de acceso durante la pandemia.

Para la obtención de los explantes de las líneas clonales antes mencionadas se siguió la siguiente metodología. Por ser plantas con 13 meses *in vitro* sin resiembra, presentaban varias hojas ya muertas. Como paso inicial se retiró el material vegetal muerto con ayuda de pinzas y un bisturí, como paso siguiente se retiró la parte apical de la plántula y la parte radicular, hasta la obtención de una explante inicial 0.8 cm (Figura 11).



Para maximizar el uso de las plántulas sobrevivientes *in vitro* se usaron los siguientes explantes por línea:

Línea L1CP: Explante de yemas axilares concéntricas (YAC); Figura 10 E.

Línea L2CP: Explantes de yemas axilares individuales (YAI); Figura 10 D y explante de yemas axilares concéntricas (YAC).

El medio de cultivo utilizado para la fase de multiplicación del experimento fue el medio PC (Phillips & Collins, 1979), el cual estaba adicionado con  $3.5 \mu\text{M}$  de TDZ (concentración reportada por Chan 2019) y los explantes fueron incubados con luz continua a una temperatura de  $25 \pm 2$  °C.

Cuando las plántulas regeneradas tuvieron el tamaño, con las condiciones de desarrollo para ser separadas, fueron individualizadas y se sembraron en medio PC libre de regulador, en frascos de 600ml que contenía 80 mL de medio gelificado con agar a 10.2 gr/L, para que las plántulas tuvieran mejor soporte y espacio de elongación. Cuando las plántulas desarrollaron de 6 a 8 hojas (3 meses de cultivo) fueron utilizadas como la fuente de explantes para los ensayos de evaluación con múltiples concentraciones de TDZ.

### 2.3 Evaluación de múltiples concentraciones de TDZ en explantes de *C. palmata*

La evaluación de *C. palmata* se realizó con los explantes obtenidos de las plántulas que se obtuvieron de la propagación inicial (Sección 2.1). Se empleó el medio PC (Phillips & Collins, 1979) adicionado con TDZ a diferentes concentraciones, descritas en la Tabla 7, las cuales fueron recopiladas de la literatura.

**Tabla 7.** Concentraciones de TDZ a ensayar en *C. palmata*.

Concentraciones de TDZ ( $\mu\text{M}$ ) a usar en explantes de <i>Carludovica palmata</i> .
Control 0.0 $\mu\text{M}$
0.05 $\mu\text{M}$
0.5 $\mu\text{M}$
1.5 $\mu\text{M}$
2.5 $\mu\text{M}$
3.5 $\mu\text{M}$
4.5 $\mu\text{M}$
7.5 $\mu\text{M}$

Para la obtención de los explantes, con pinzas y bisturí se realizó el retiro de la parte apical de las plántulas y posteriormente se retiró la parte radicular, hasta obtener un explante de 0.8 cm. Los explantes fueron puestos en una caja Petri con agua destilada estéril para evitar su desecación y fueron retirados hasta el momento de ser sembrados en los frascos con medio de cultivo con su respectiva concentración de TDZ. Debido a la disponibilidad de material se realizaron 5 repeticiones por concentración, dando un total de 40 explantes para el experimento.

### 2.4 Mantenimiento y enraizamiento de brotes de *C. palmata*

Cuando los brotes presentaron raíces o alcanzaron 5 cm de altura fueron separados del explante y resembrados en frascos de cristal de 600 ml que contenían 80 ml de medio PC, sin reguladores de crecimiento vegetal. Se observó que *C. palmata* presenta rizogénesis en la fase de multiplicación, sin la necesidad de la adición de algún otro regulador además del TDZ y por consiguiente no fue necesario realizar una fase de enraizamiento adicional.

### **2.5 Aclimatación *ex vitro* de plántulas de *C. palmata***

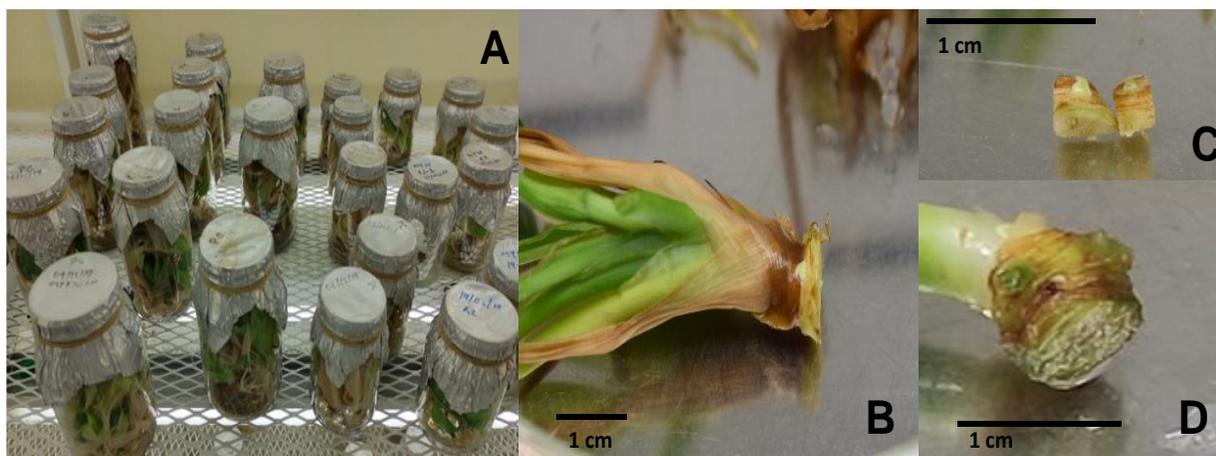
La aclimatación del material vegetal es una etapa fundamental en un sistema de micropropagación porque de esto depende la eficiencia del proceso y la calidad final de las plantas producidas *in vitro* (Agramonte *et al.*, 1998).

Para la aclimatación de las plántulas obtenidas *in vitro* se siguió la siguiente metodología. Se utilizaron bolsas negras de polietileno para vivero rellenas con un sustrato elaborado con una mezcla de suelo adicionado con turba y agrolita. Las bolsas de polietileno para invernadero se llenaron a  $\frac{3}{4}$  de su capacidad con un sustrato compuesto de: tierra, Sun Shine (Mix 3) y agrolita (Termolita Hortipearl) (2-1-1 v/v). Las plántulas enraizadas fueron removidas del medio de cultivo y lavadas cuidadosamente con abundante agua corriente hasta retirar completamente los residuos del medio de cultivo. Las plántulas sin residuos del medio de cultivo se colocaron en un vaso de precipitado y se les asperjó agua con un atomizador, para evitar la desecación hasta que fueron sembradas en el sustrato. Las raíces de la plántulas se remojaron durante 2 minutos en una solución antifúngica de Benomilo (PROMYL) 1gr/L y Captan ultra 50WP (ARYSTA) 1 gr/L. Transcurrido el tiempo en la solución, las plántulas fueron sembradas y asperjadas con la solución antifúngica cubriendo las hojas y el sustrato con la finalidad de evitar el crecimiento de hongos por la alta humedad de los primeros días de adaptación. Las plántulas trasplantadas fueron cubiertas con bolsas de polietileno transparente y fueron colocadas en un cuarto de cultivo en condiciones de fotoperíodo natural a una temperatura de  $26\pm 2^{\circ}\text{C}$ . Después, con una aguja, diariamente se realizaron orificios en la bolsa transparente de polietileno durante una semana hasta retirar completamente la bolsa. Durante esta fase se evaluó el porcentaje de sobrevivencia a los 15, 30 y 60 días.

## CAPÍTULO III. RESULTADOS

### 3.1. Obtención de material vegetal de *C. palmata*

Debido a las circunstancias derivadas de la pandemia por el COVID-19, la recolección del material vegetal de campo se dificultó, por lo que se planteó el uso de plántulas de *in vitro* que se obtuvieron en los ensayos de regeneración hechos por Chan en el 2019.



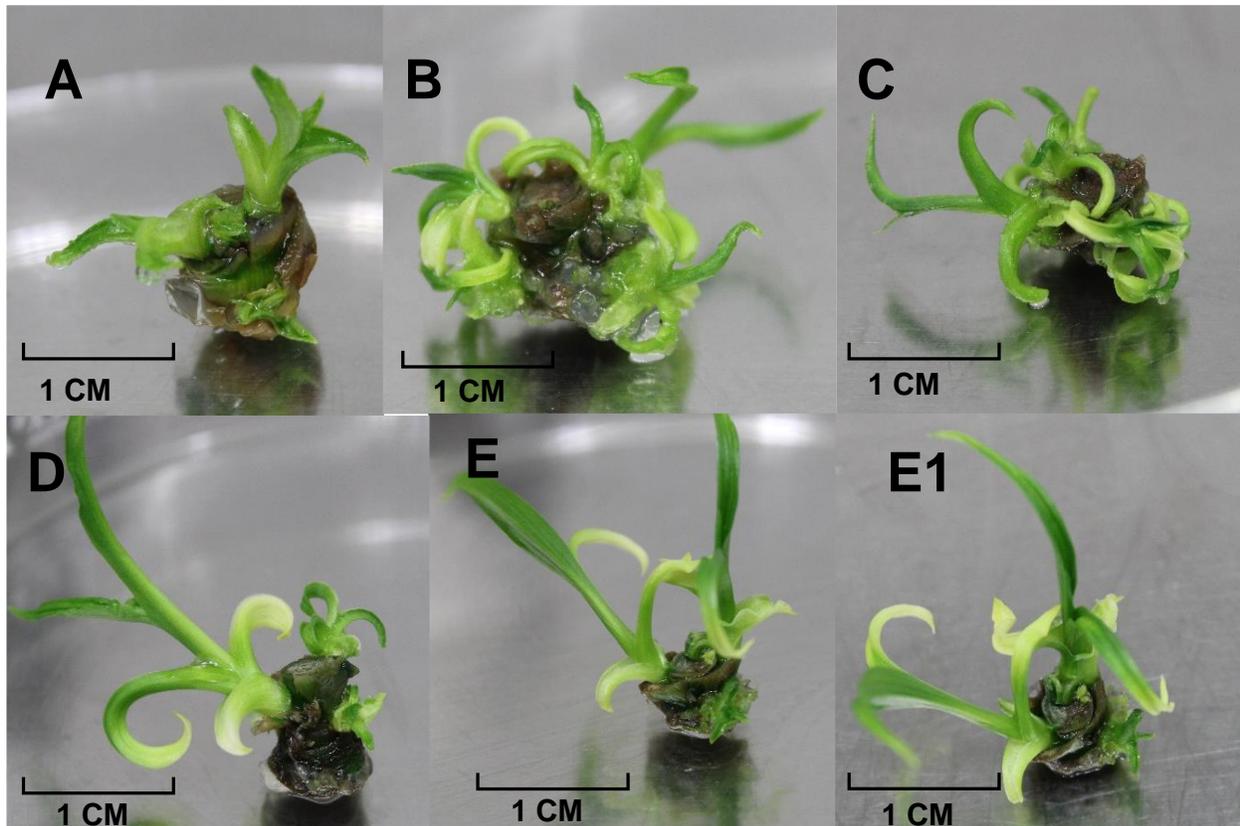
**Figura 12.** A) Plántulas de *C. palmata* utilizadas para el ensayo de multiplicación, B) Eliminación del tejido muerto para la obtención de los explantes, C) Explantes de tipo YAI, D) Explantes de tipo YAC.

Se realizó un experimento para la multiplicación a partir de explantes de plántulas *in vitro* de las líneas L1CP y L2CP de *C. palmata*, con la finalidad de obtener más vitroplántulas (Figura 12).

#### 3.1.1. Explantes línea L1CP

##### Línea L1CP primera resiembra (un mes)

En este ensayo únicamente se usaron explantes de tipo YAC. La respuesta de los explantes de la línea L1CP se observó a las 3 semanas después de su exposición a la concentración  $3.5 \mu\text{M}$  de TDZ. Dicha respuesta consistió en el desarrollo de plántulas que crecían a partir de las yemas axilares del explante. Al parecer, la regeneración tuvo comienzo en las yemas axilares y no en los meristemos basales como se planteó inicialmente en el trabajo de Chan 2019, esto después de observar que el crecimiento inicial fue en las yemas axilares en los explantes evaluados (Figura 13 A). Las plántulas desarrolladas de las yemas axilares presentaron una coloración verde intenso y se observaban muy bien definidas, sin presencia de brotes múltiples o la formación de callo. Las plántulas midieron entre 1 y 1.5 cm después de 1 mes en el medio de cultivo como se puede observar en la Figura 13.



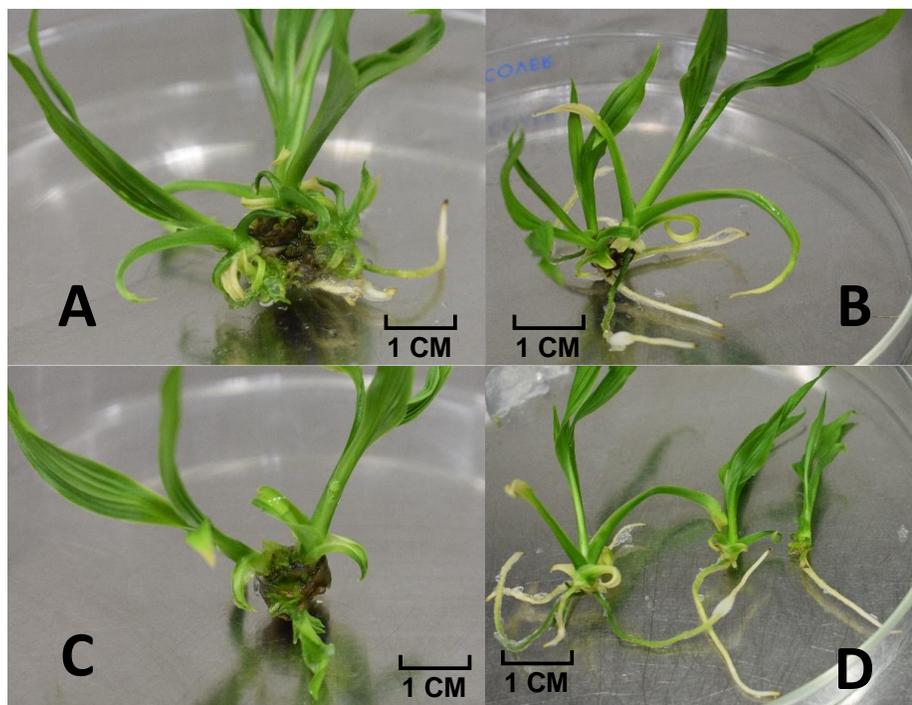
**Figura 13.** Respuesta de la línea L1CP en la primera resiembra. A) Se observa que los brotes inician partiendo de las yemas axilares que se encuentran en las axilas de los peciolos de las hojas de los explantes, A,B,C,D Y E) Explantes YAC de la línea L1CP de *C. palmata*, E1) Desarrollo de plántulas a partir de las yemas axilares.

El número de brotes durante la respuesta inicial fue equivalente al número de yemas axilares que contenía cada explante, por lo que la variación del número de plántulas por explante al inicio podría estar relacionado más al explante que a la respuesta inducida por el TDZ (Figura 13), la influencia del TDZ se observó durante la aparición de los primeros brotes múltiples donde la variación de proliferación por explante dejó de relacionarse con el número de yemas axilares iniciales ya que estos brotes excedían la cantidad de yemas iniciales al inicio del ensayo, esta hipótesis podría comprobarse mediante un análisis histológico.

### **Línea L1CP segunda resiembra (Dos meses)**

Durante la segunda resiembra el tamaño inicial de las plántulas en los explantes era de 4-5 cm de longitud (Figura 14), de color verde intenso, con las puntas de las hojas inferiores de un color amarillo cremoso. En algunos explantes las plántulas ya contaban con 2 o 3 raíces por planta. Dichas raíces de entre 0.5 – 1.5 cm de longitud de color verde intenso de la base a la mitad de la raíz y de la zona media a la punta presentaban un color blanco con pelos radiculares

absorbentes (Figura 14 D). Las plántulas estaban bien desarrolladas con las hojas sanas sin deformaciones aparentes. En dos de los explantes iniciales se empezó a visualizar la presencia de algunos brotes múltiples que se pueden observar en las Figuras 14 A y C.



**Figura 14.** Respuesta de la línea L1CP en la segunda resiembra. A) explante con plántulas ya desarrolladas se observa la presencia de algunas raíces, B) Se observa dos plántulas de 5 cm con raíces de 3 cm aproximadamente, C) En la figura se observa brotes múltiples en la base de las plántulas grandes, D) Plántulas separadas del explante original se observa el desarrollo de raíces, el color de las plántulas es de un verde intenso.

Los brotes separados fueron cultivados en medio PC basal y puestos en las mismas condiciones de cultivo que los explantes iniciales (luz continua a 25 °C), los explantes originales fueron resembrados en medio PC+TDZ 3.5  $\mu$ M.

### **Conclusiones de la multiplicación de la línea L1CP**

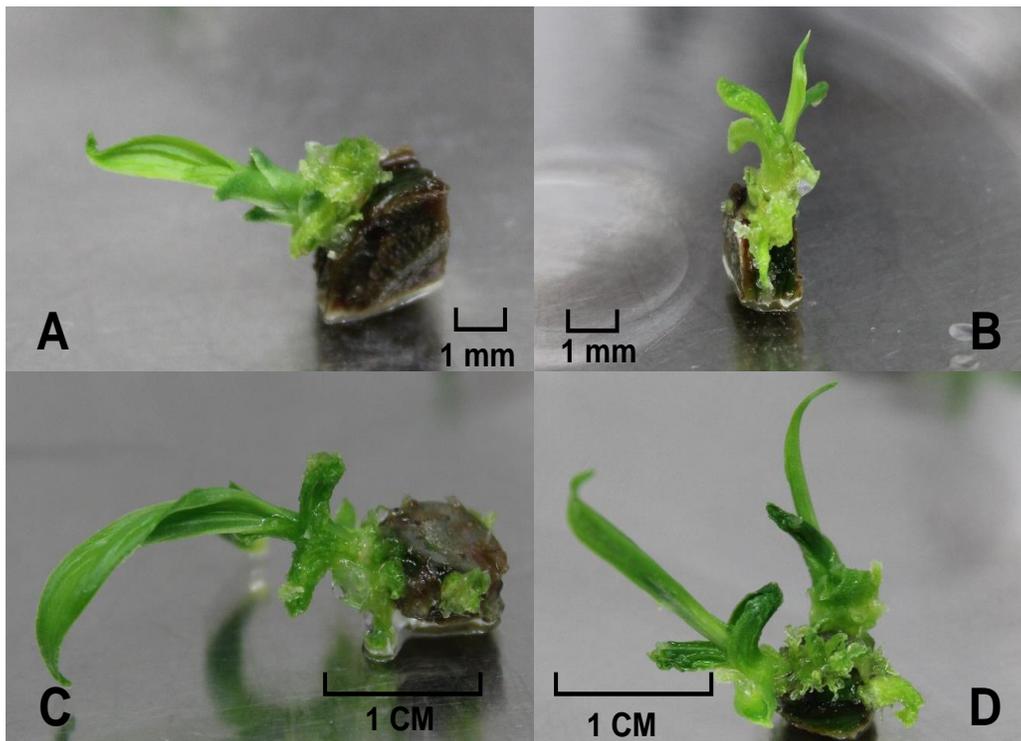
Los ensayos de multiplicación de la línea L1CP permitieron obtener plántulas para realizar los experimentos posteriores. Las resiembras de los explantes se realizaron mensualmente y se separaron plántulas en cada ocasión. Se separaron un total de 73 plántulas, todas las plántulas separadas fueron colocadas en frascos de 600 mL de cristal que contenían 80 mL de medio. Las plántulas fueron puestas en estos frascos para que desarrollaran el tamaño adecuado para los

experimentos con TDZ. Las plántulas de estos ensayos de multiplicación crecieron sin ninguna deformación aparente y sin problemas de vitrificación. La respuesta de esta línea fue muy uniforme por lo que todos los experimentos con las diversas concentraciones de TDZ se realizaron exclusivamente con esta línea.

### 3.1.2. Explantes línea L2CP

#### Línea L2CP primera resiembra (1 mes)

Para los ensayos de multiplicación de la línea L2CP se usaron explantes YAI y YAC. Para estas resiembras solo se contaba con un total de dos plántulas, las cuales se utilizaron para los ensayos de multiplicación. El tiempo de respuesta fue de 3 semanas, sin embargo, la respuesta fue diferente desde el principio. Se desarrollaron plántulas como en la línea L1CP, sin embargo, las plántulas eran más pequeñas con hojas anchas de color verde intenso. Al momento de la resiembra (1 mes), se observó que los explantes presentaban el inicio de lo que podrían ser brotes múltiples o tejido calloso. En los dos tipos de explante se observó la misma respuesta (Figura 15).

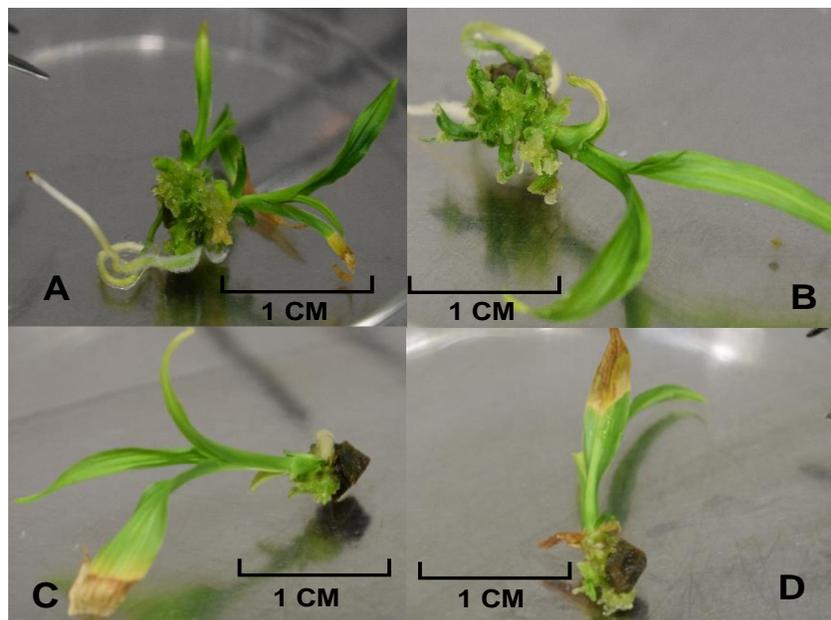


**Figura 15.** Respuesta de la línea L2CP en la primera resiembra. A-B) Explantes YAI con un brote de aproximadamente 1 cm. En la base de los brotes se observa el desarrollo de un tejido menos diferenciado. C-D) En explantes YAC se observa el desarrollo de plántulas más grandes de aproximadamente 2 cm con crecimiento de tejido en la base de cada una.

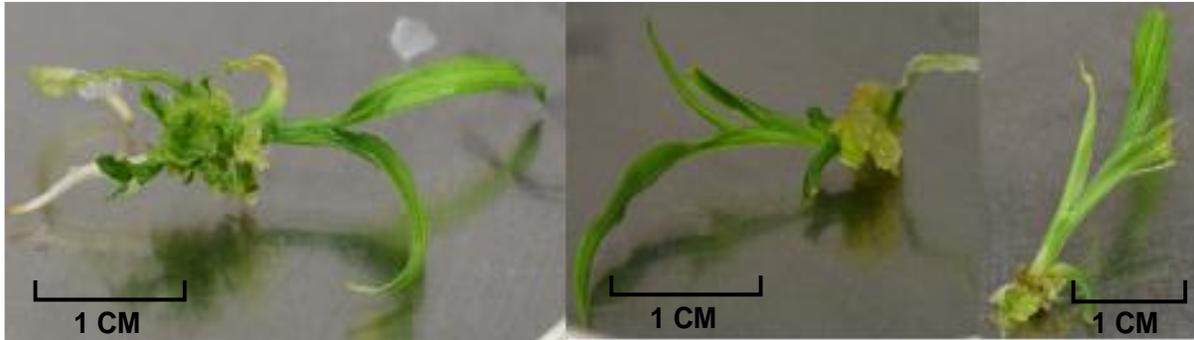
En las hojas inferiores de las plántulas de la línea L2CP se observó el crecimiento de un tejido que aparentemente era callo, sin embargo, el tejido era muy pequeño como para ser identificado por lo que se planteó tomar la muestra en el segundo mes para ser analizado en el estereoscopio y tratar de identificar este tejido.

### Línea L2CP primera resiembra (2 meses)

Para el segundo mes, las plántulas que se desarrollaban en los explantes eran de aproximadamente 3 o 4 cm y en la base de las plántulas se desarrolló tejido calloso el cual era compacto. Las plántulas desarrollaron de 1 a 2 raíces, de 2 a 4 cm de longitud, de color blanco y con unas tonalidades verdes en los primeros milímetros cercanos a la base de la plántula, sin la presencia de los pelos radiculares absorbentes. Las plántulas eran de un color verde intenso, pero presentaban secciones necrosadas del ápice a la zona media de la hoja (Figura 16 C) y el callo era de un color verde más ligero (Figuras 16 A y B). Después de la separación, se observó que había crecimiento de callo en la base de las plántulas con cierto grado de diferenciación en forma de hojas (Figura 16). Por lo tanto, fueron resembradas en medio PC + TDZ 3.5  $\mu$ M para tratar de inducir un crecimiento y diferenciación de este tejido (Figura 17), los explantes iniciales fueron resembrados en el mismo medio TDZ 3.5  $\mu$ M y colocados en el cuarto de luz continua a  $25 \pm 2$  °C.

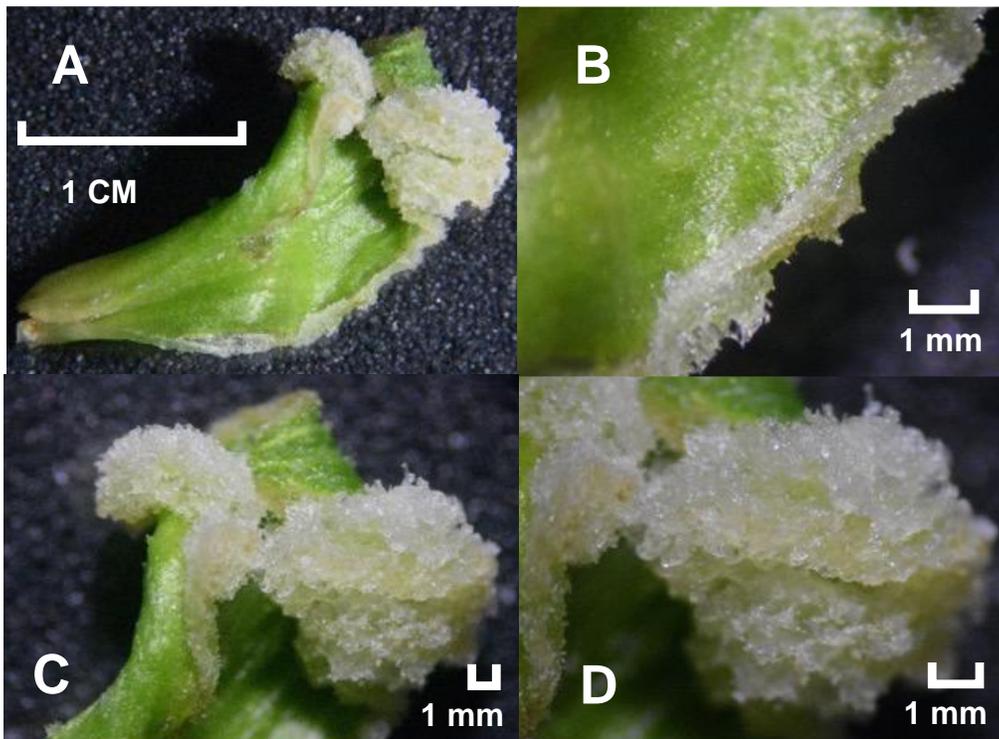


**Figura 16.** Respuesta de la línea L2CP en la segunda resiembra. A) Explante YAC se observa dos plántulas bien definidas y la formación de callo sobre el explante, además se observa muerte parcial de las hojas, B) Segundo explante YAC se observa solo una plántula desarrollada el resto del tejido en el explante es callo, C-D) Son explantes YAI al igual que las plántulas de los explantes YAC se observa muerte parcial de la hoja en ambos casos.



**Figura 17.** Plántulas de la línea L2CP de *C. palmata* con crecimiento de callo en sus bases que presentan diferenciación de tejido foliar.

Durante la segunda resiembra de esta línea se tomó una muestra de tejido de las hojas inferiores de las vitro plántulas, que al ser observadas en el estereoscopio se encontró que el tejido era callo en los bordes de la hoja. Sin embargo, se presentaba un mayor crecimiento de callo en la parte del ápice de la hoja, de igual manera se observó el desarrollo de callo en las partes de la nervadura central en la zona del envés de la hoja. El callo presentaba un color amarillo cremoso era compacto y se encontraba fuertemente unido a la hoja (Figura 18).



**Figura 18.** Respuesta de la línea L2CP en la segunda resiembra. A) Vista de la hoja analizada seccionada de plántula de la línea L2CP, B) acercamiento a la zona del borde de la hoja, C) crecimiento de callo en la zona del ápice de la hoja, D) acercamiento del callo en la zona del ápice.

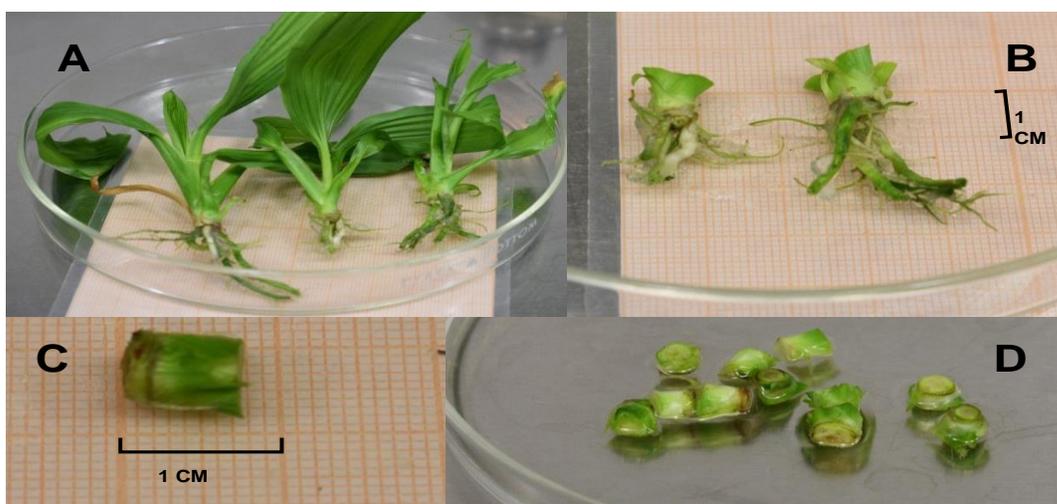
## Conclusiones de la multiplicación de la línea L2CP

Las resiembras de la línea L2CP se realizaron de manera mensual, sin embargo, se observó una respuesta diferente a la respuesta de la línea L1CP. En efecto, el número de plántulas regeneradas fue menor que las obtenidas con la línea L1CP, presentando producción de callos y muy pocos brotes. Con base en esta respuesta, se decidió tomar como fuente de explantes la línea L1CP de *C. palmata*, para realizar experimentos modificando los reguladores del medio de cultivo, variando las concentraciones del mismo, la respuesta diferente de esta línea puede deberse a que proviene de una planta donante diferente y por lo que podrían ser individuos genéticamente diferentes por lo que la respuesta al TDZ pudo variar por este factor.

### 3.2. Evaluación de concentraciones de TDZ en la línea L1CP de *C. palmata*

Con la finalidad de determinar la concentración óptima de TDZ para la multiplicación *in vitro* de *C. palmata* se realizó el siguiente experimento con explantes de la línea L1CP. Se utilizaron plántulas regeneradas en los experimentos descritos en la sección 3.1.1, cuando se encontraban en fase de elongación en medio PC libre de reguladores de crecimiento vegetal. En esta fase, las vitroplántulas contaban con 6 u 8 hojas y fueron procesadas en la campana de flujo laminar para ser usadas como fuente de explantes.

El proceso consistió en retirar las hojas de la zona apical y el sistema radicular. Una vez realizado este procedimiento se realizaron los cortes finales para obtener explantes de 0.8 cm de longitud. En la Figura 19 se observa el procedimiento de corte de explantes, todos los explantes obtenidos fueron de tipo YAC.



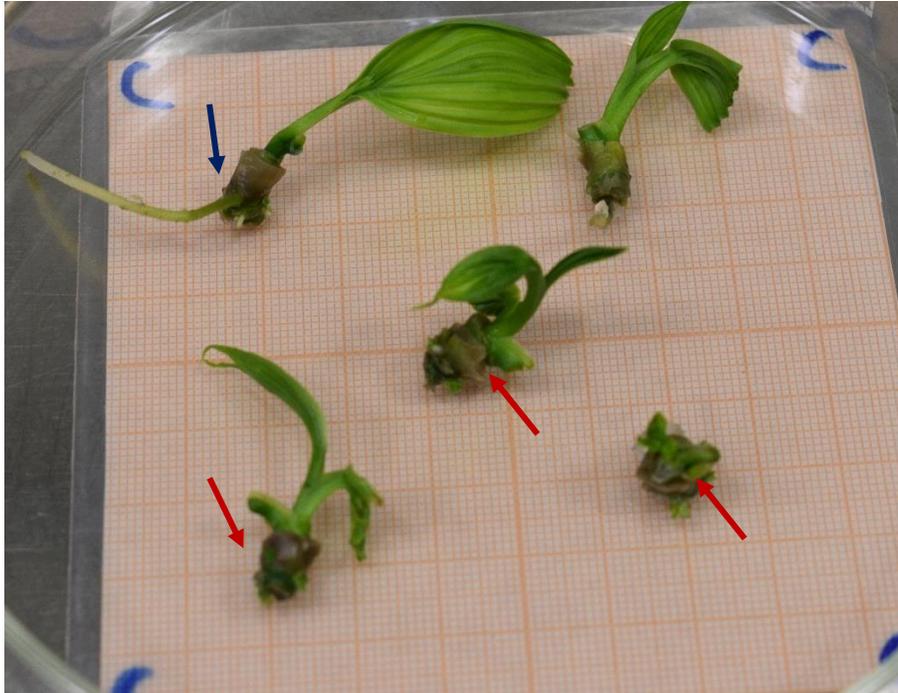
**Figura 19.** Proceso para la obtención de explantes de plántulas de *C. palmata in vitro* para los experimentos con diferentes concentraciones de TDZ. A) tamaño de plántula usada B) retiro de la parte aérea de la plántula C) Ajuste de tamaño del explante a 0.8 cm D) Explantes en agua destilada estéril para evitar la desecación hasta ser colocadas en medio de cultivo.

Después del corte, los explantes fueron sumergidos en agua destilada estéril para evitar el daño por deshidratación del tejido, pasado 5 minutos fueron retirados del agua y colocados en medio PC adicionado con las concentraciones correspondientes de TDZ. En total se utilizaron 5 explantes por concentración de TDZ descritas en la Tabla 7. Después de colocar los explantes en el medio de cultivo, los frascos con explantes fueron incubados en el cuarto de luz continua a una temperatura de  $25 \pm 2$  °C.

Las evaluaciones se realizaron semanalmente. Durante la primera semana no se observaron cambios en la morfología de los explantes para todas las concentraciones con TDZ y para los controles. A la mitad de la segunda semana se observó el inicio del crecimiento de la zona apical para las concentraciones de 7.5, 4.5, 3.5 y 2.5  $\mu\text{M}$  de TDZ, y al concluir la segunda semana las concentraciones 0.05, 0.5, 1.5  $\mu\text{M}$  de TDZ y el control (PC) presentaron el mismo crecimiento que las otras concentraciones.

Durante el inicio de la tercera semana se comenzó a observar el crecimiento de pequeños brotes en la periferia de algunos explantes en las concentraciones 7.5, 3.5 y 2.5  $\mu\text{M}$  de TDZ, seguidos de algunos explantes de las concentraciones 4.5, 0.05, 0.5  $\mu\text{M}$  de TDZ y el control (PC). El último en dar respuesta de crecimiento de brotes fue la concentración 1.5  $\mu\text{M}$  de TDZ, en todas las concentraciones continuo, el crecimiento de la zona apical de todos los explantes como se observó en la segunda semana. La cuarta semana fue evaluada durante la resiembra (Figuras 20–27).

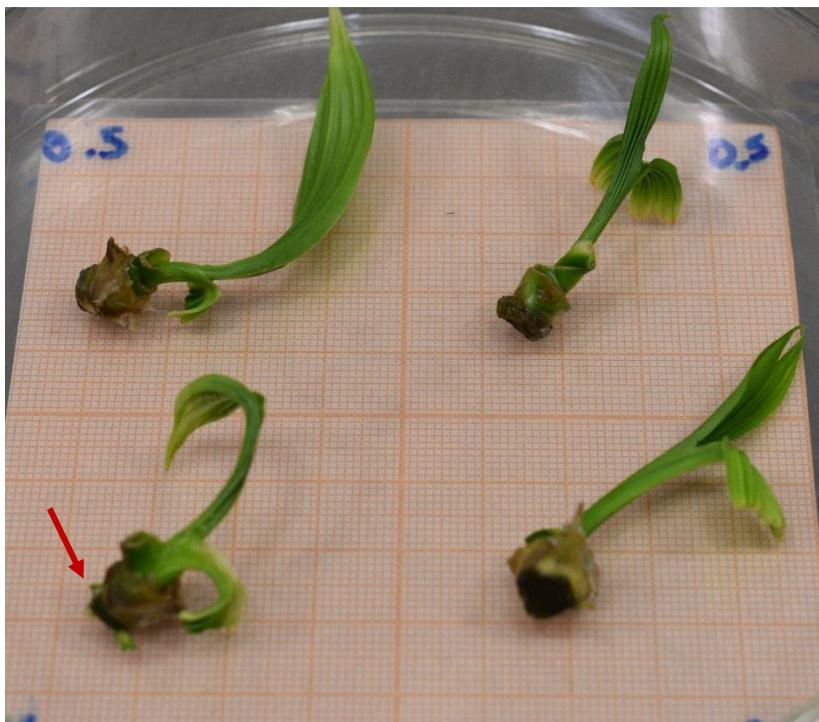
La evaluación visual de los cultivos se resume en lo siguiente, la baja respuesta de los explantes al TDZ puede ser derivado al desarrollo de la zona apical de los explantes, la cual pudo haber ejercido, durante el primer mes de evaluación una dominancia apical sobre el explante, este desarrollo pudo ser derivado a que la longitud del explante no era la adecuada y como consecuencia no se retiró completamente el meristemo apical durante la extracción de los explantes, por lo que durante la resiembra del material vegetal se procedió a disminuir el tamaño del explante de 0.8 cm a 0.5 cm, podando nuevamente la zona apical a todos los explantes de las concentraciones de TDZ y el control (PC).



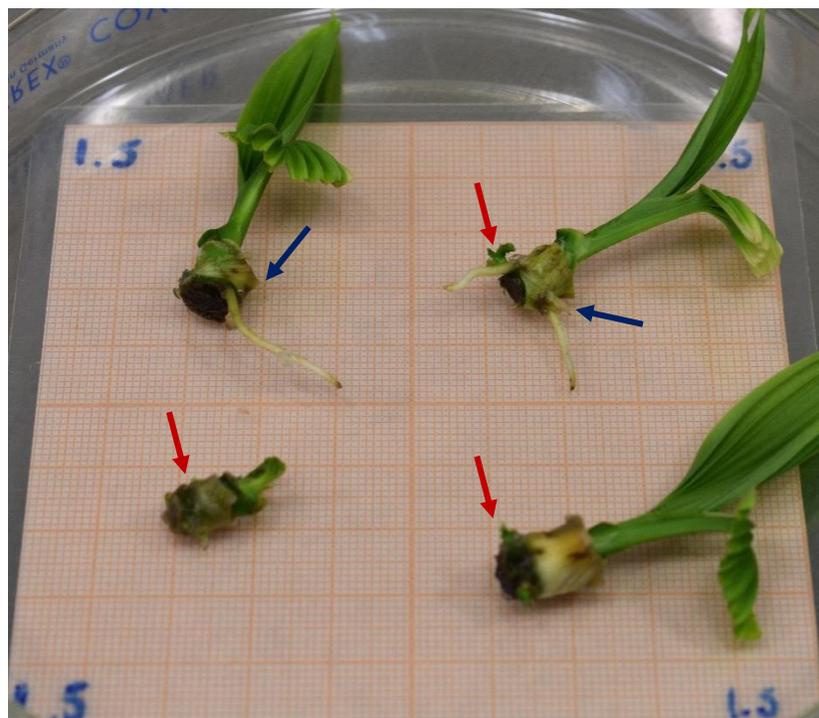
**Figura 20.** Respuesta de los explantes del control después de un mes de cultivo en medio PC sin TDZ. En la figura se observa el desarrollo de la zona apical en todos los explantes, el desarrollo de raíz en un explante (→) y el desarrollo de brotes en tres explantes (→).



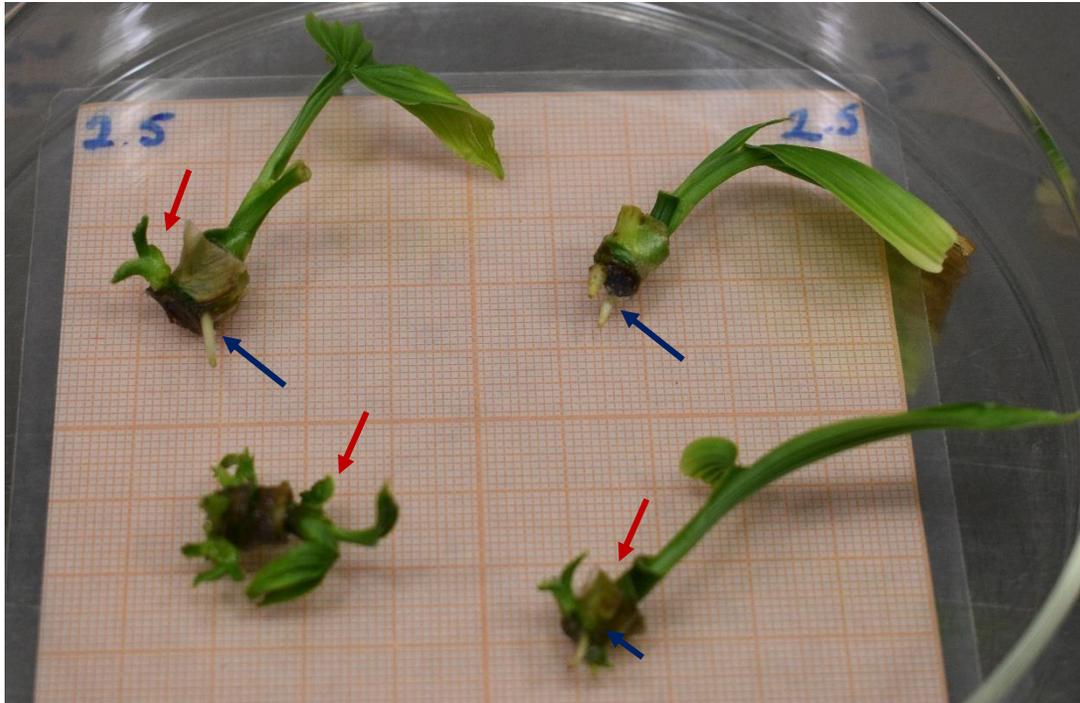
**Figura 21.** Respuesta de los explantes a la concentración PC +TDZ 0.05  $\mu\text{M}$ . Se observa el desarrollo de la zona apical en todos los explantes al igual que el desarrollo de raíces en tres explantes (→) y un solo explante presenta formación de brotes (→).



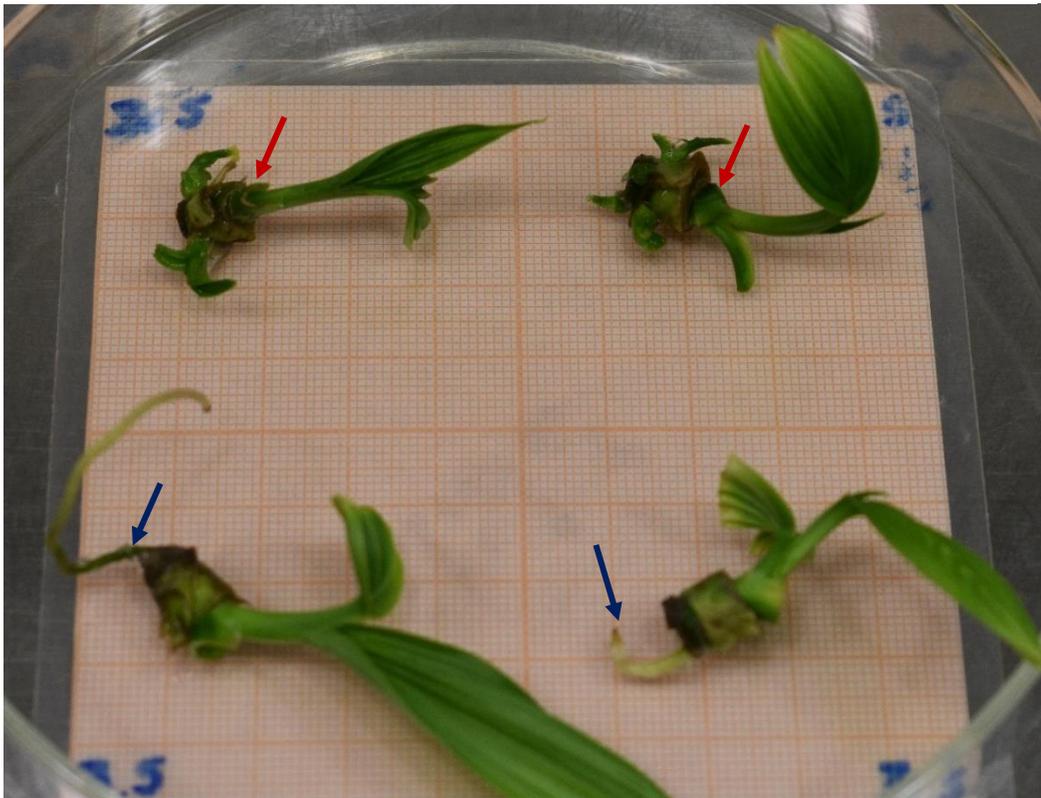
**Figura 22.** Respuesta de los explantes a la concentración PC +TDZ 0.5  $\mu\text{M}$ . Se observa el desarrollo de la zona apical en todos los explantes y un solo explante presenta formación de brotes ( $\rightarrow$ ).



**Figura 23.** Respuesta de los explantes a la concentración PC +TDZ 1.5  $\mu\text{M}$ . Se observa el desarrollo de la zona apical en todos los explantes. También se puede observar el desarrollo de raíces en dos explantes ( $\rightarrow$ ) y tres explantes presentan formación de brotes con una pequeña diferencia de tamaño ( $\rightarrow$ ).



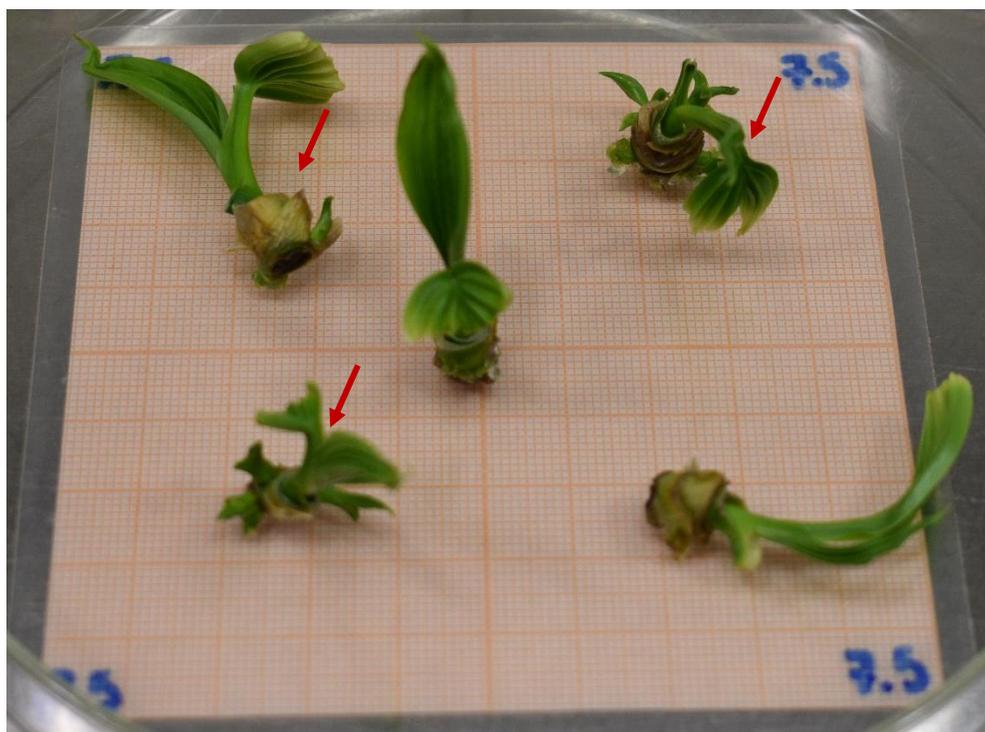
**Figura 24.** Respuesta de los explantes a la concentración PC +TDZ 2.5  $\mu\text{M}$ . Se observa el desarrollo de la zona apical en todos los explantes, el desarrollo de raíces en tres explantes ( $\rightarrow$ ) y el desarrollo de brotes en tres explantes ( $\rightarrow$ ).



**Figura 25.** Respuesta de los explantes a la concentración PC +TDZ 3.5  $\mu\text{M}$ . Se observa el desarrollo de la zona apical en todos los explantes al igual que el desarrollo de raíces en tres explantes  $\rightarrow$  y dos explantes presentan formación de brotes  $\rightarrow$ .



**Figura 26.** Respuesta de los explantes a la concentración PC +TDZ 4.5  $\mu$ M. Se observa el desarrollo de la zona apical en todos los explantes y dos explantes presentan formación de brotes  $\rightarrow$ .



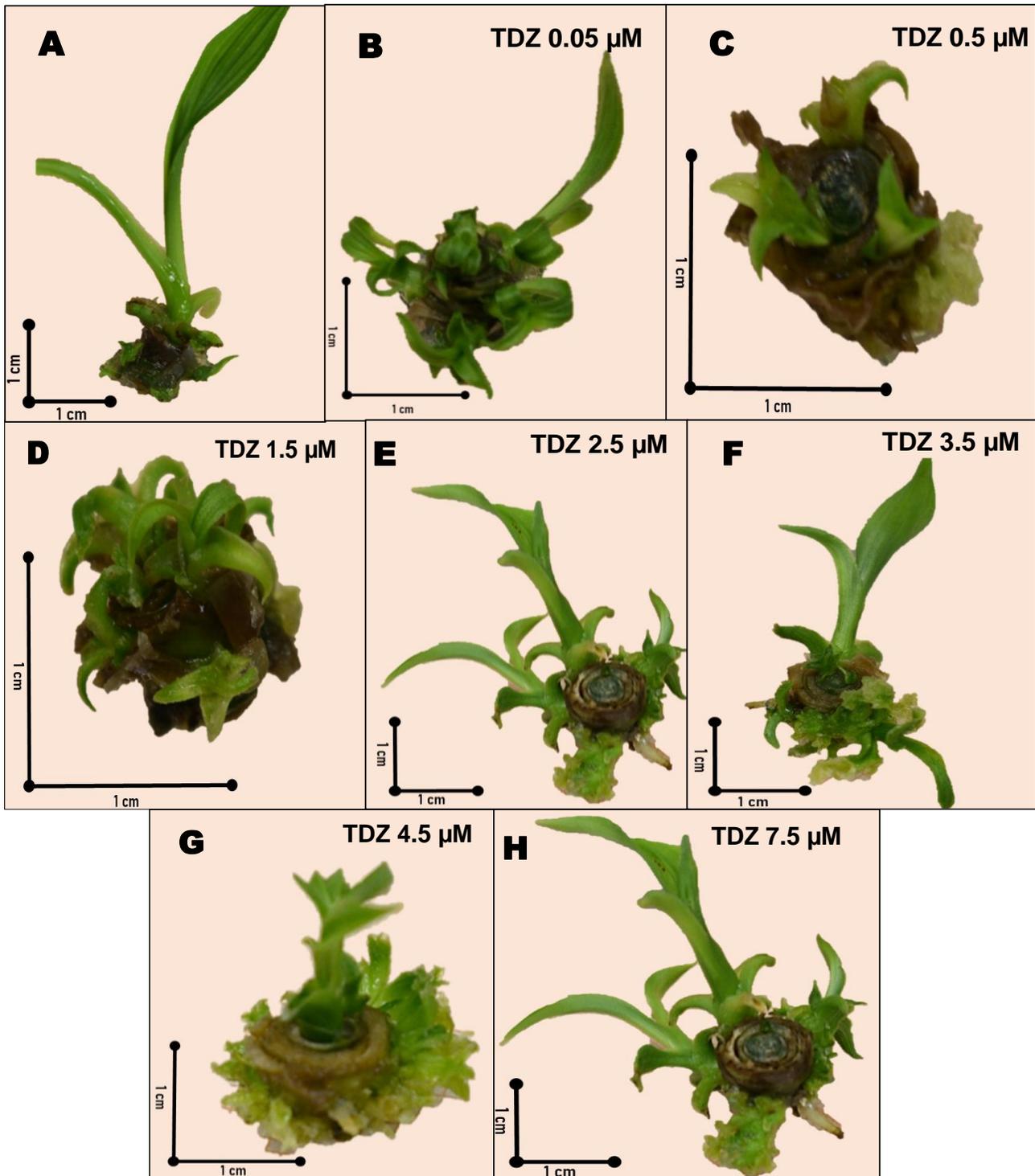
**Figura 27.** Respuesta de los explantes a la concentración PC +TDZ 7.5  $\mu$ M. Se observa el desarrollo de la zona apical en todos los explantes y tres de los explantes presenta formación de brotes  $\rightarrow$ .

## Segunda resiembra de explantes en TDZ

Para la segunda resiembra (2 meses en el medio) se separaron los primeros brotes de los explantes, igualmente se observó la formación de los primeros brotes múltiples en la base de los explantes de las concentraciones 2.5  $\mu\text{M}$ , 3.5  $\mu\text{M}$ , 4.5  $\mu\text{M}$  y 7.5  $\mu\text{M}$  de TDZ, esto después de haber reducido el tamaño del explante inicial a 0.5 cm en la primera resiembra. Las plántulas producidas en todas las concentraciones de TDZ presentaron raíces al momento de separarlas y los tamaños de estas plántulas variaron de 2 cm a 6 cm. Los brotes del control sin TDZ igual presentaron la formación de raíces sin la necesidad de adicionar ninguna hormona. Los explantes iniciales fueron puestos nuevamente en medio fresco con TDZ. Los resultados del número de brotes obtenidos en esta resiembra se presentan en la Tabla 8 y en la Figura 28.

**Tabla 8.** Número de brotes formados por explante en las diferentes concentraciones de TDZ en la segunda resiembra.

Explante	Concentraciones de TDZ							
	Control (0.00 $\mu\text{M}$ )	0.05 $\mu\text{M}$	0.5 $\mu\text{M}$	1.5 $\mu\text{M}$	2.5 $\mu\text{M}$	3.5 $\mu\text{M}$	4.5 $\mu\text{M}$	7.5 $\mu\text{M}$
	Número de brotes obtenidos							
1	4	5	2	3	5	3	4	5
2	5	2	3	5	2	2	4	4
3	4	6	2	6	4	4	3	6
4	3	3	1	4	4	4	5	2
5	6	1	0	4	6	5	3	3



**Figura 28.** Explantes representativos de cada concentración de TDZ. A) Control del experimento explante en medio sin TDZ. B-C-D) Concentraciones sin brotes múltiples. E-F-G-H) Concentraciones que presentan brotes múltiples en las bases de los explantes.

### Tercera resiembra de explantes en TDZ

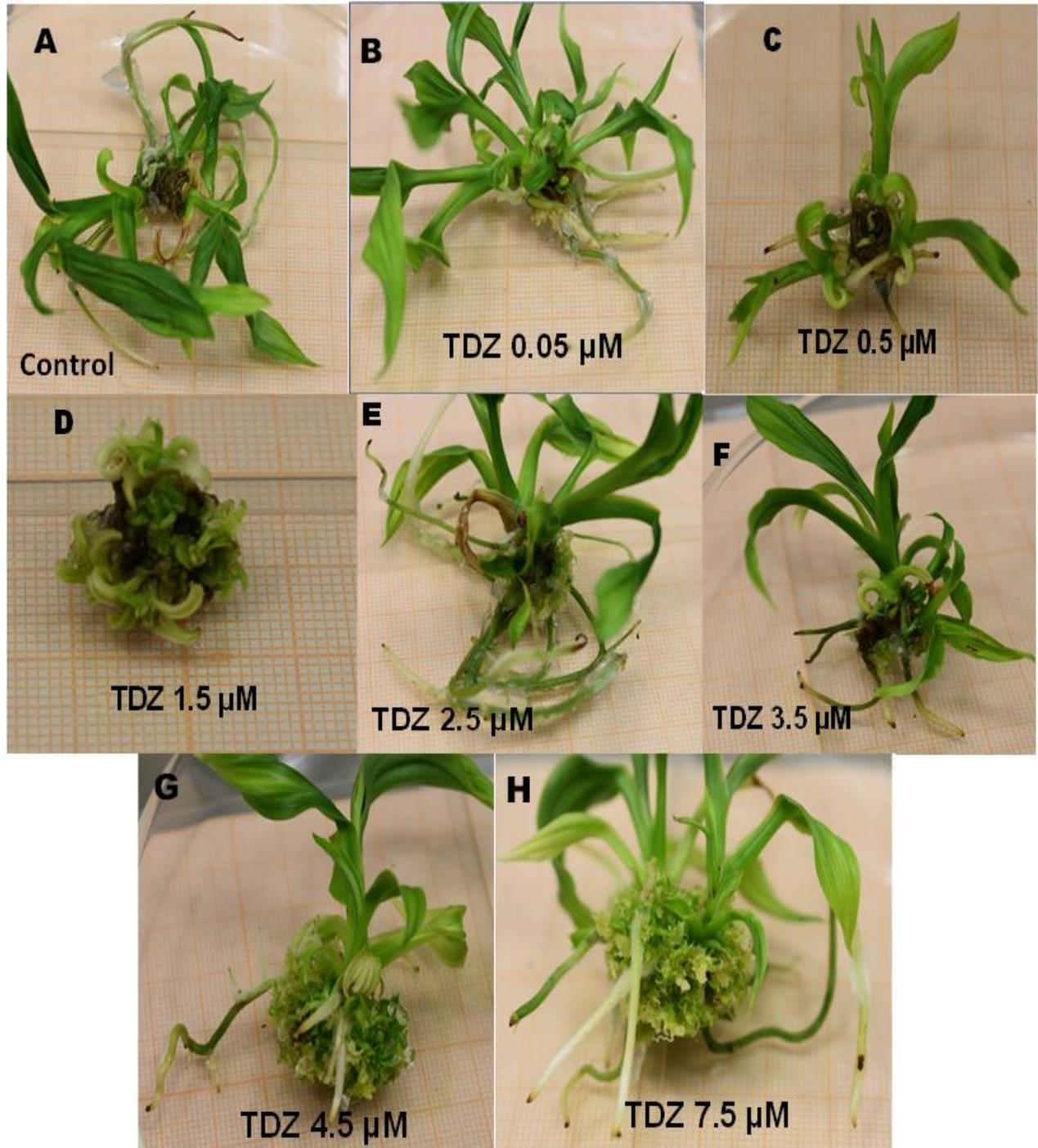
Durante la tercera resiembra se observó un aumento en la biomasa de los brotes múltiples en las concentraciones de TDZ mencionadas en la segunda resiembra. La cantidad de brotes múltiples aumento exponencialmente y eran muy pequeños 2 a 3 mm, lo cual dificultó el conteo exacto del número de brotes, por lo que se clasificó de acuerdo con cantidades aproximadas como se muestra en la Tabla 9 y la Figura 29. Para ilustrar la diferencia entre la cantidad de brotes entre las distintas concentraciones y explantes, en la Tabla 9 se incluyeron imágenes en el lado derecho de la tabla. De igual forma se contabilizaron los brotes separados en esta resiembra y se tomaron sus medidas de longitud, la mayor longitud medida fue de 6 cm y la menor fue de 4 cm.

**Tabla 9.** Morfogénesis de explantes de *C. palmata* expuestos a diferentes concentraciones de TDZ (tercera resiembra)

Concentración de TDZ	Tipo de brote formado por explante										Total de plántulas	Tamaño Prom. de plántulas
	Explante 1		Explante 2		Explante 3		Explante 4		Explante 5			
	Plántula individual	Brote múltiple	Plántula individual	Brote múltiple	Plántula individual	Brote múltiple	Plántula individual	Brote múltiple	Plántula individual	Brote múltiple		
Control (PC)	1	–	3	–	1	–	1	–	2	–	8	6 cm
0.05 $\mu\text{M}$	1	–	1	–	1	–	1	–	6	–	10	4 cm
0.5 $\mu\text{M}$	1	–	1	–	1	–	1	–	3	–	7	5 cm
1.5 $\mu\text{M}$	2	15 $\geq$ 35	2	–	0	36 $\geq$ 50	1	15 $\geq$ 35	2	15 $\geq$ 35	7	5 cm
2.5 $\mu\text{M}$	3	–	5	36 $\geq$ 50	3	15 $\geq$ 35	2	–	2	15 $\geq$ 35	15	6 cm
3.5 $\mu\text{M}$	4	15 $\geq$ 35	6	15 $\geq$ 35	4	> 51	1	15 $\geq$ 35	2	36 $\geq$ 50	17	5 cm
4.5 $\mu\text{M}$	1	> 51	1	> 51	2	15 $\geq$ 35	1	36 $\geq$ 50	2	> 51	7	6 cm
7.5 $\mu\text{M}$	4	15 $\geq$ 35	2	> 51	3	15 $\geq$ 35	3	> 51	3	> 51	15	6 cm



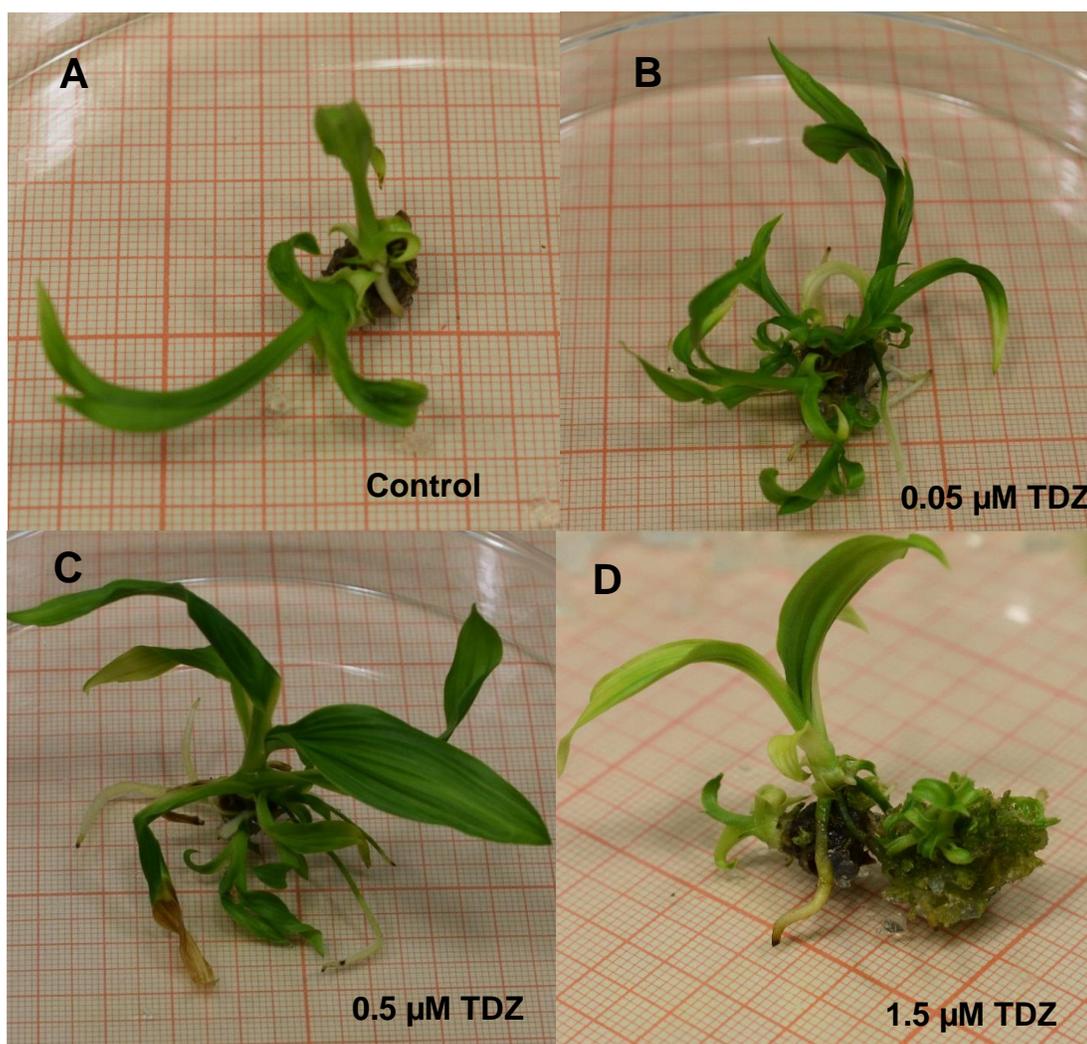
Los brotes que fueron separados de los explantes se colocaron en medio PC libre de regulador, para su elongación. Los brotes obtenidos de los explantes contaban con raíces propias por lo que no fue necesario la adición de otro regulador para la inducción del sistema radicular de las plántulas. Todos los brotes de todas las concentraciones de TDZ y el control presentaron formación de raíces.



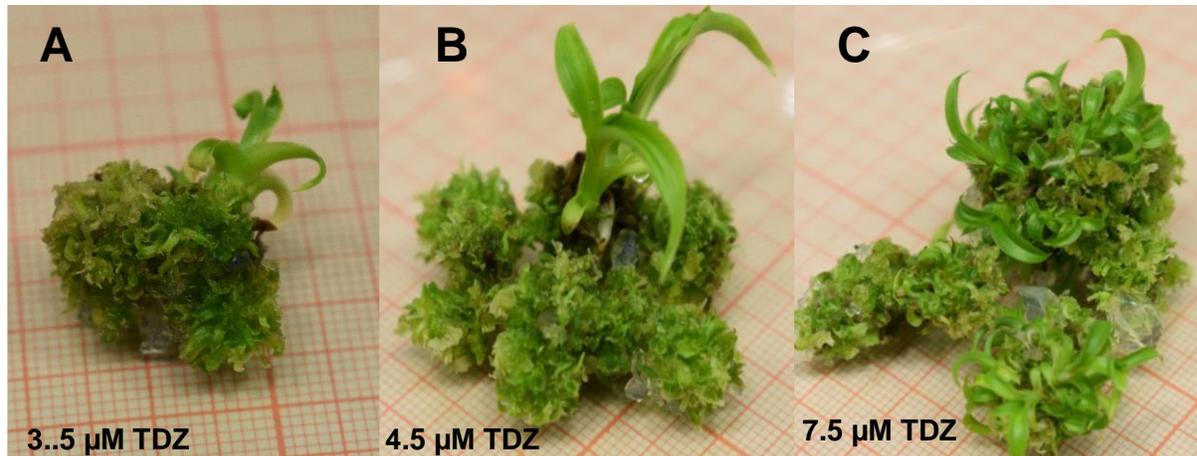
**Figura 29.** Explantes representativos de cada concentración de TDZ. A) Control del experimento explante en medio sin TDZ. B-C) Concentraciones sin brotes múltiples. D-E-F-G-H) Concentraciones que presentan brotes múltiples en las bases de los explantes. E-F) Concentraciones con más brotes múltiples y mayor crecimiento de biomasa.

### Cuarta resiembra de explantes en TDZ

En la cuarta resiembra, para las concentraciones control, 0.05, 0.5, 1.5  $\mu\text{M}$  y 2.5 de TDZ no se apreció un cambio significativo en la formación de brotes múltiples (Figura 30). Sin embargo, se observó un aumento en la cantidad de biomasa de los explantes en las concentraciones de 3.5  $\mu\text{M}$ , 4.5  $\mu\text{M}$  y 7.5  $\mu\text{M}$  de TDZ, destacando las dos últimas concentraciones, ya que el aumento fue mucho más significativo como se puede observar en la Figura 31. En dicha figura se observa que al aumentar la concentración del TDZ se incrementa el número de brotes múltiples.

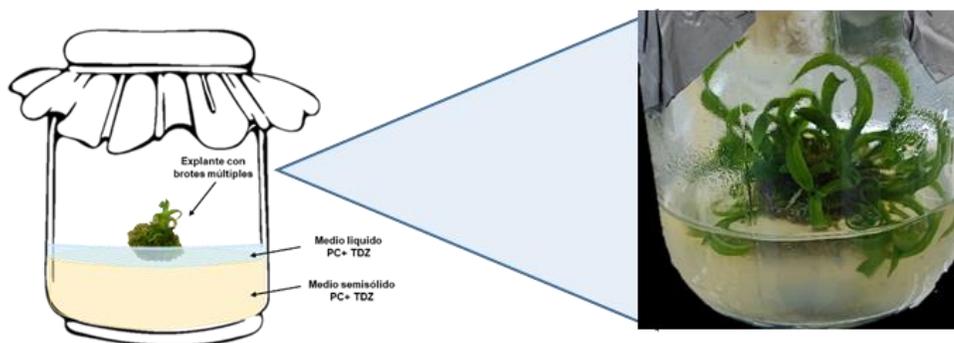


**Figura 30.** Explantes de *C. palmata* después de 4 meses en cultivo con diferentes concentraciones de TDZ. A) Explante control sin TDZ, B) Explante con 0.05  $\mu\text{M}$  de TDZ, C) Explante con 0.5  $\mu\text{M}$  de TDZ, D) Explante con 1.5  $\mu\text{M}$  de TDZ.



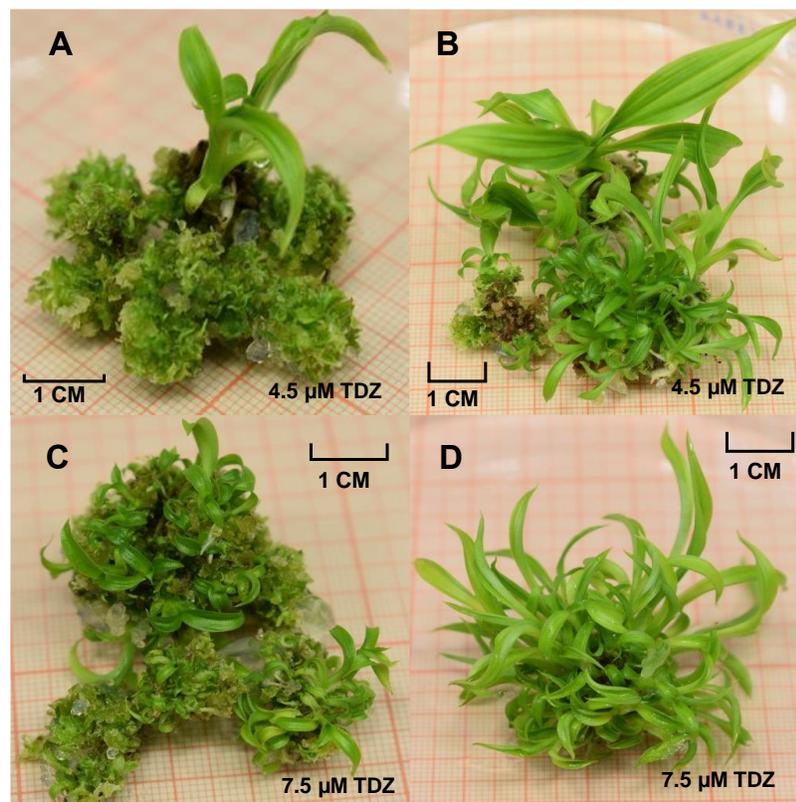
**Figura 31.** Explantes de *C. palmata* después de 4 meses en medio con TDZ. A) Explante con 3.5 µM de TDZ B) Explante con 4.5 µM de TDZ, B) Explante con 7.5 µM de TDZ.

A pesar de que la cantidad de brotes en las concentraciones 4.5 µM y 7.5 µM de TDZ seguía aumentando, no lograban elongar para poder ser separados del explante inicial, por lo que se decidió adoptar una estrategia experimental basada en la revisión de la literatura de los trabajos de Maene, & Debergh, 1985, Alvard *et al.*, 1993, Chu *et al.*, 1993, Vyas *et al.*, 2008, Pati *et al.*, 2011 y Prabhuling & Sathyanarayana, 2017. Dichos autores mencionaron el uso de medio líquido para estimular el desarrollo de las plántulas durante la proliferación. Por lo tanto, la metodología que se usó consistió en agregar medio de cultivo líquido PC + TDZ con la misma concentración que se utilizó en el medio semisólido y aplicarlo sobre el medio semisólido de los frascos que contenían los explantes, hasta un nivel de un 1/3 de tamaño del explante esto para que no se ahogue el material en el medio líquido; al final se obtuvo un sistema de dos fases semisólido/líquido como se ilustra en la Figura 32. El medio semisólido sirvió como soporte para el explante y así evitar que este se sumergiera completamente. Las ventajas que incluye el uso de medio líquido es una mayor disponibilidad de agua y sustancias disueltas para el explante y menores costos de mano de obra y producción (Gupta y Timmis 2005; Mehrotra *et al.*, 2007).

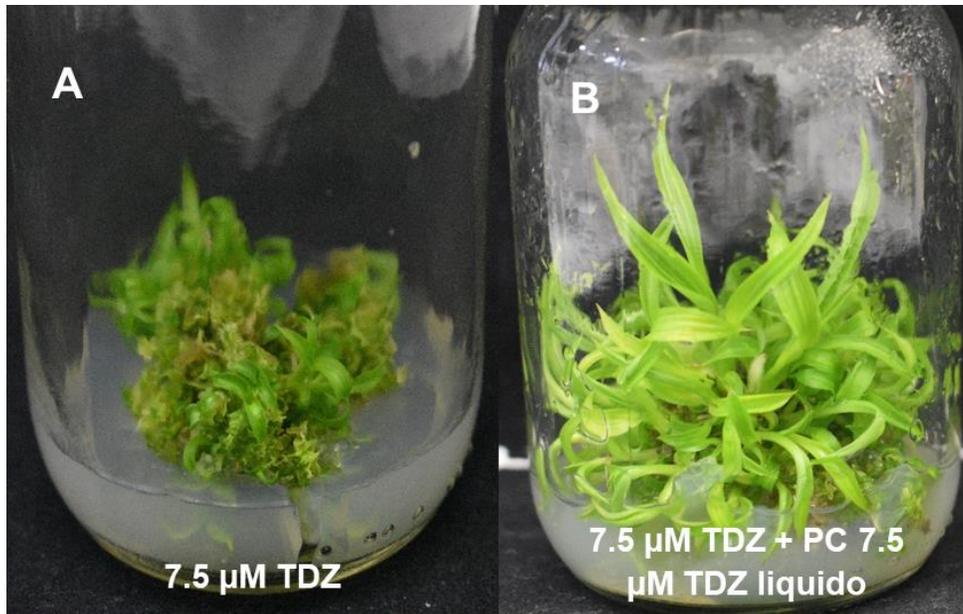


**Figura 32.** Sistema de dos fases semisólido/líquido usado para estimular la elongación de las plántulas de *C. palmata* durante su cultivo *in vitro*.

Este procedimiento se realizó exclusivamente en las concentraciones 4.5 y 7.5  $\mu\text{M}$  de TDZ, ya que eran las que contenían más biomasa por lo que se corría menos riesgos de perder el material vegetal inicial. Otro punto considerado fue que ambas concentraciones tenían suficiente biomasa para realizar una división de dicho material en más frascos de cultivo y poder realizar la comparación del cultivo en medio semisólido y el cultivo de dos fases (semisólido/líquido). Pasadas tres semanas el medio líquido fue casi completamente absorbido por los brotes, y se observó la muerte de los brotes en las bases de los explantes ya que estos se sumergieron completamente; los brotes que se encontraban en la superficie del explante, fuera del medio líquido, tuvieron un crecimiento notorio al igual que los brotes que se encontraban parcialmente sumergidos (Figura 33). Cabe destacar que no se observó vitrificación en las plantas que se desarrollaron durante el experimento con el medio líquido. En contraste con el sistema de dos fases, los frascos con explantes en medio semisólido tradicional, no mostraron elongación de los brotes ya preexistentes pasado el mismo periodo, pero se observó un aumento de biomasa (Figura 34). Los brotes obtenidos fueron separados y colocados en medio PC libre de TDZ, para seguir con su desarrollo (Figura 35). Los datos del número de brotes se reportan en la Tabla 10.



**Figura 33.** Explantes de *C. palmata* con brotes antes y después del cultivo en medio de dos fases. A y C) Explantes antes de aplicar el sistema de dos fases. B y D) Explantes tres semanas después de ser sometidos al sistema de dos fases, se observa la elongación de los brotes preexistentes.



**Figura 34.** Explantes de *C. palmata* cultivados en medio semisólido y medio de dos fases. A) Explante con brotes múltiples después de tres semanas en medio semisólido con TDZ. B) Explante en sistema de cultivo de dos fases (semisólido/líquido) después de tres semanas de cultivo.



**Figura 35.** Plántulas de *C. palmata* separadas de explantes cultivados en medio de dos fases (semisólido/líquido) durante tres semanas.

**Tabla 10.** Número de plántulas de *C. palmata* formadas por concentración de TDZ en la cuarta resiembra.

Explante	Concentraciones de TDZ							
	Control (0.00 $\mu\text{M}$ )	0.05 $\mu\text{M}$	0.5 $\mu\text{M}$	1.5 $\mu\text{M}$	2.5 $\mu\text{M}$	3.5 $\mu\text{M}$	**4.5 $\mu\text{M}$	**7.5 $\mu\text{M}$
	Número de brotes obtenidos							
<b>1</b>	0	1	5	10	3	20	38	73
<b>2</b>	0	2	4	6	3	18	32	84
<b>3</b>	0	0	4	8	6	16	27	80
<b>4</b>	0	1	3	7	7	21	26	76
<b>5</b>	0	3	5	8	4	18	35	80

Los datos obtenidos durante las 4 resiembras fueron compilados en una matriz de excel para posteriormente ser analizados estadísticamente en el programa de analisis estadístico MINITAB.

### 3.3. Aclimatación de plantas de *C. palmata ex vitro*

Se realizó la adaptación *ex vitro* de 50 vitroplantulas, regeneradas de los explantes de plantas *in vitro*, las cuales fueron colocados en diferentes concentraciones de TDZ para inducir su regeneración. Las plántulas aclimatadas tenían un tamaño de entre 10 y 15 cm, con 4 a 9 raíces con una longitud de 5 a 10 cm de color verde en las zonas cercanas a la base de la planta y de color blanco en la zona media y apical de la raíz (Figura 36). Las raíces de las plántulas se trataron con solución antifúngica 1% por 2 minutos, antes de ser sembradas en las bolsas de vivero. Este tratamiento se realizó con el fin de evitar la contaminación por hongos (Figura 37 A). A las plántulas, una vez sembradas, se les colocó una bolsa de polietileno transparente para evitar la disecación. Esta práctica se realizó debido al diferencial de humedad, ya que las plántulas de *in vitro* no regulan de manera eficaz la apertura y cierre de los estomas por lo tanto suelen deshidratarse con mucha rapidez. Al término del proceso de siembra se les colocó en un cubículo a una temperatura de  $26\pm 2^{\circ}\text{C}$ , en condiciones de fotoperíodo e iluminación natural (figura 37 C y D). Al día siguiente se le realizaron pequeñas perforaciones a la bolsa de polietileno transparente con ayuda de una aguja, con la finalidad de ir disminuyendo gradualmente la humedad relativa dentro de la bolsa. Este procedimiento se repitió por ocho días, hasta que se retiró por completo las bolsas en el día 12 de adaptación (Figuras 37 E y F). Una vez retiradas las bolsas, se realizó la primera poda de mantenimiento que consistió en retirar las hojas muertas en el proceso de adaptación, esto con el fin de evitar la contaminación por hongos.

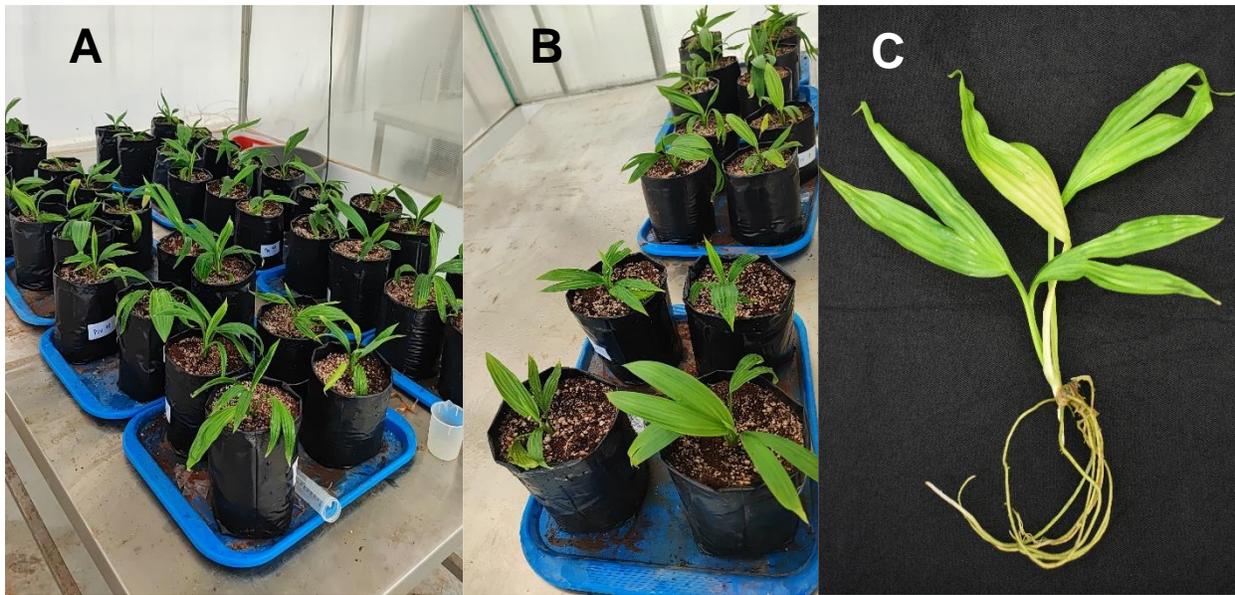


**Figura 36.** Plántulas de *C. palmata* regeneradas de explantes de plántulas de *in vitro* usadas para el proceso de adaptación.



**Figura 37.** Proceso de aclimatación *ex vitro* de plantas micropropagadas de *C. palmata*. A) tratamiento con antifúngico, B) Bolsas con sustrato previamente humectado, C) Plantas en cubículo para su aclimatación, después de ser sembradas, D) Plantas cubiertas por bolsa de polietileno transparente para ayudar a controlar la humedad, E) Plantas en los últimos días del proceso de reducción de humedad, F) Plantas adaptadas después de 12 días desde su siembra en sustrato.

Al mes de ser sembradas en sustrato se procedió a aplicar a las plantas, una solución nutritiva de Poly Feed + micronutrientes (fabricante Haifa Iberia), a una concentración de 1 g por litro de agua corriente. Se suministraron 100 ml de la solución nutritiva, aplicados en la base de las plantas. Se observó que 15 días después de la aplicación de la solución nutritiva, las plantas tomaron una coloración verde intenso y mejoró la rigidez de las hojas como se aprecia en la figura 38. La aplicación de nutrientes se realizó cada 3 semanas.



**Figura 38.** Plantas micropropagadas y aclimatadas de *C. palmata*. A-B) Plantas 15 días después de su primera aplicación de solución nutritiva poly feed. C) Estado de las plántulas el día de la siembra.

Después de que las plantas pasaron 8 semanas en el cubículo de aclimatación, fueron transferidas a condiciones de invernadero (Figuras 39 y 40), con fotoperiodo natural y temperaturas ambientales de 32 a 40 °C. En estas condiciones se mantuvieron por 6 semanas, donde se les aplicó de manera foliar una solución nutritiva de polyfeed + micronutrientes a una concentración de 1.5 g/L, cada 3 semanas. Una vez cumplidas las semanas en el invernadero, las plantas fueron transferidas a condiciones de casa sombra en la zona experimental del CICY (Figura 40 B), ninguna de las plántulas presentó problemas en el desarrollo o deformaciones derivados de los tratamientos con TDZ. Cabe señalar que todas las plantas presentaban coloración verde intenso al momento de ser transferidas a la zona de casa sombra, con una altura que oscilaba entre los 35 y 45 cm de altura, con 4 a 6 láminas foliares las cuales ya presentaban la división en 4 lóbulos, característicos de esta especie.



**Figura 39.** Plantas micropropagadas de *C. palmata* antes de su transferencia a condiciones de invernadero.



**Figura 40.** Plantas micropropagadas de *C. palmata* en condiciones de invernadero y vivero. A) Plantas de una semana en condiciones de invernadero, se empieza a observar la división de las láminas foliares en lóbulos, B) Plantas al momento de ser transferidas a condiciones de casa sombra en vivero.

### 3.4 Análisis estadístico

Los datos del número y tamaño de brotes obtenidos por tratamiento fueron procesados con el programa EXCEL y MINITAB para realizar los análisis de varianza (ANOVA) y la prueba de separación de medias de Tukey, ambos con niveles de significancia de  $\alpha = 0.005$ .

El análisis estadístico fue realizado para obtener cual es el mejor tratamiento para la producción de brotes por explante y el tamaño de los brotes obtenidos en cada tratamiento con TDZ, el análisis fue realizado en dos programas, para obtener un análisis y un procesamiento de datos confiable y mejorar la obtención de gráficos y cuadros para cada caso.

#### 3.4.1 ANOVA del número de brotes

En la Tabla 11 se reporta el resultado del ANOVA para el número de brotes inducidos a diferentes concentraciones de TDZ.

**Tabla 11.** Análisis de varianza del número de brotes de *C. palmata* en respuesta a diferentes concentraciones de TDZ

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Factor	7	25144.0	3592.00	567.91	0.000
Error	32	202.4	6.32		
Total	39	25346.4			

El valor de  $p$  obtenido del análisis de varianza del número promedio de brotes es menor al nivel de significancia 0.005, lo cual indica que las diferencias observadas corresponden a un comportamiento diferente de los explantes a la aplicación del TDZ, por lo que se descarta la hipótesis nula del análisis.

En la Tabla 12 se muestran los valores promedios del número de brotes por explante con sus desviaciones estándar y sus intervalos de confianza para la media (IC).

**Tabla 12.** Análisis de desviación estándar del número de brotes por concentración de TDZ

Tratamiento	Media	Desv.Est.	IC de 95%
Control	5.200	0.447	(2.909, 7.491)
0.05 TDZ	9.000	1.000	(6.709, 11.291)
0.5 TDZ	7.200	1.304	(4.909, 9.491)
1.5 TDZ	13.600	1.140	(11.309, 15.891)
2.5 TDZ	11.800	1.304	(9.509, 14.091)
3.5 TDZ	25.600	1.140	(23.309, 27.891)
4.5 TDZ	36.80	4.87	(34.51, 39.09)
7.5 TDZ	85.20	4.44	(82.91, 87.49)

*Desviación estándar agrupada = 2.51496 n= 40*

### 3.4.2 Análisis comparativo de Tukey para el número de brotes

Al encontrarse en el ANOVA diferencias significativas en el número de brotes entre tratamientos se procedió a comprobar la diferencia entre los valores medios del número de brotes para conocer los tratamientos con mejor desempeño.

La prueba de Tukey compara todos los pares de grupos de los datos, mientras controla el nivel de confianza simultáneo (Figura 41). Esta prueba además de demostrar si existe diferencia significativa entre los valores medios del número de brotes, agrupa y separa los valores por tratamiento. En la Tabla 13 se reporta que las medias del número de brotes de los explantes sometidos a 3.5  $\mu\text{M}$ , 4.5  $\mu\text{M}$  y 7.5  $\mu\text{M}$  de TDZ fueron estadísticamente diferentes entre sí y de los demás tratamientos, con 25.6, 36.8 y 85.2 brotes en promedio.

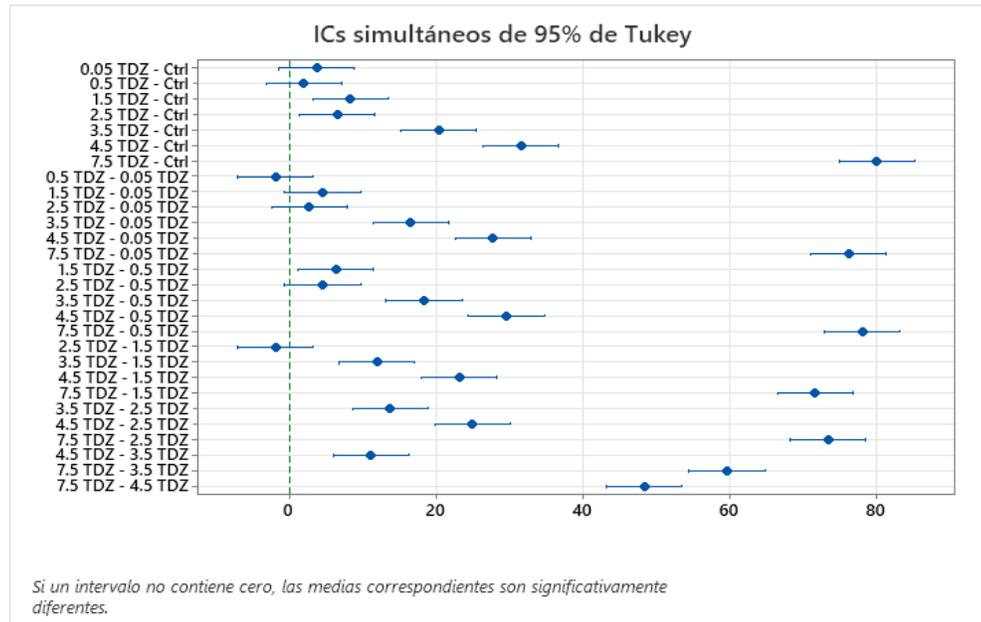
**Tabla 13.** Diferencia significativa y separación de medias del número de brotes por tratamiento por el método Tukey\*

Factor	Media	Agrupación					
7.5 TDZ	85.20	A					
4.5 TDZ	36.80		B				
3.5 TDZ	25.600			C			
1.5 TDZ	13.600				D		
2.5 TDZ	11.800				D	E	
0.05 TDZ	9.000				D	E	F
0.5 TDZ	7.200					E	F
Control	5.200						F

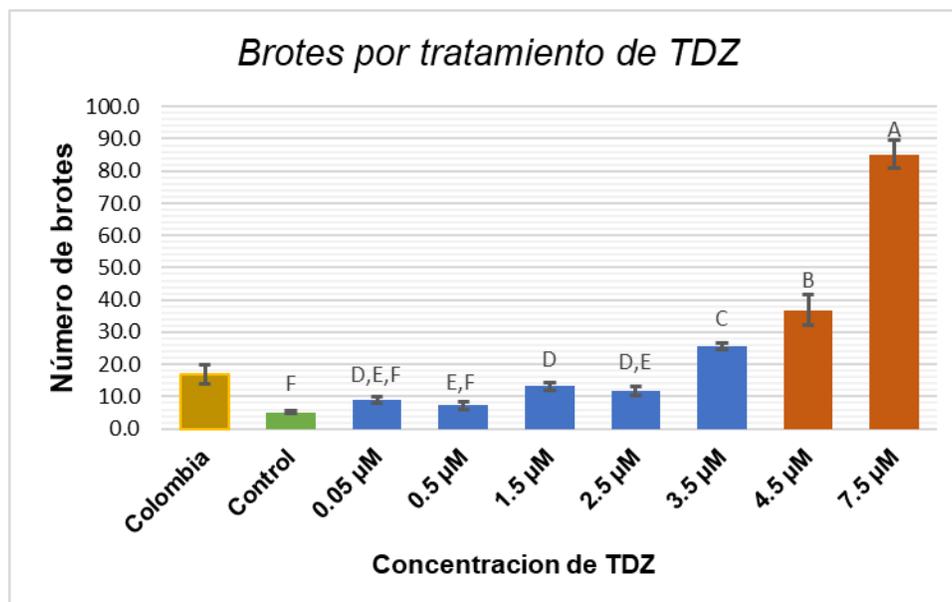
n=40

\*Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.  
Las medias que comparten una letra no tienen diferencia significativa.

Con base en los análisis estadísticos realizados, el tratamiento para inducir el mayor número de brotes se obtuvo cuando los explantes fueron cultivados en medio adicionado con 7.5  $\mu\text{M}$  de TDZ. En efecto, el tratamiento con 7.5  $\mu\text{M}$  de TDZ presentó la mejor media del número de brotes por explante con  $85.2 \pm 4.4$  con respecto al control (0.00  $\mu\text{M}$  de TDZ) que fue de  $5.2 \pm 0.4$  (Figura 42).



**Figura 41.** Gráfico de índice simultáneo de confianza de la prueba Tukey para el número de brotes por concentración de TDZ. Se observan las comparaciones por pares hechas durante el análisis.



**Figura 42.** Gráfico de barras del número de brotes por explante en relación con su concentración de TDZ. En el gráfico se observa la desviación estándar y la diferencia significativa entre los datos analizados por ANOVA y Tukey.

### 3.4.3 ANOVA de la longitud de brotes

En la Tabla 14 se reporta el resultado del ANOVA para la longitud de los brotes inducidos a diferentes concentraciones de TDZ. Este análisis permite saber si hay diferencias entre los datos recolectados de tamaño de brotes por explante en las diferentes concentraciones de TDZ para poder así determinar que concentración fue la que produjo brotes de mayor tamaño entre los diferentes tratamientos usados.

**Tabla 14.** Análisis de varianza de la longitud de brotes de *C. palmata* en respuesta a diferentes concentraciones de TDZ

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Factor	7	24.38	3.4821	5.69	0.000
Error	32	19.60	0.6125		
Total	39	43.97			

El análisis de varianza de la longitud promedio de brotes es menor al nivel de significancia de p (0.005), por lo cual existen diferencias estadísticas significativas que corresponden a un comportamiento diferente de los explantes a la aplicación del TDZ.

En la Tabla 15 se muestran los valores promedio de la longitud de los brotes por explante con sus desviaciones estándar y sus intervalos de confianza para la media (IC).

**Tabla 15.** Análisis de desviación estándar de tamaño de brotes por concentración de TDZ

Factor	Media	Desv.Est.	IC de 95%
<b>Control</b>	5.400	0.894	(4.687, 6.113)
<b>0.05 TDZ</b>	5.200	0.837	(4.487, 5.913)
<b>0.5 TDZ</b>	5.200	0.447	(4.487, 5.913)
<b>1.5 TDZ</b>	4.800	0.837	(4.087, 5.513)
<b>2.5 TDZ</b>	4.800	0.447	(4.087, 5.513)
<b>3.5 TDZ</b>	5.400	0.548	(4.687, 6.113)
<b>4.5 TDZ</b>	4.000	1.000	(3.287, 4.713)
<b>7.5 TDZ</b>	3.000	1.000	(2.287, 3.713)

**Desviación estándar agrupada = 0.782624**

### 3.4.4 Análisis comparativo de Tukey para la longitud de los brotes

Debido a que el ANOVA reportó diferencias significativas entre tratamientos para la longitud promedio de los brotes, se procedió a comprobar la diferencia entre los valores medios del número de brotes para conocer los tratamientos con mejor desempeño.

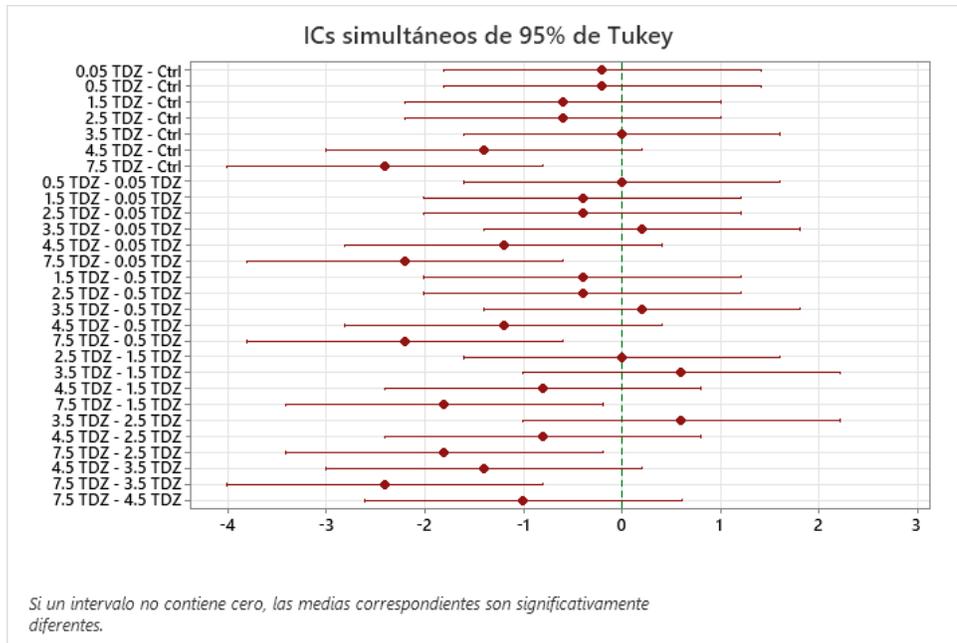
La prueba de Tukey compara y separa los valores medios por tratamiento de todos los pares de grupos de datos (Figura 42). Además, permite demostrar si existe diferencia significativa entre los valores medios de la longitud de los brotes. En la Tabla 16 se reporta que las longitudes medias de los brotes en explantes sometidos a 4.5  $\mu\text{M}$  y 7.5  $\mu\text{M}$  de TDZ fueron estadísticamente similares. Sin embargo, la longitud de los brotes en explantes sometidos a 4.5  $\mu\text{M}$  no fueron diferentes al resto de los tratamientos.

**Tabla 16.** Diferencia significativa y separación de medias de la longitud de brotes por tratamiento por el método Tukey\*

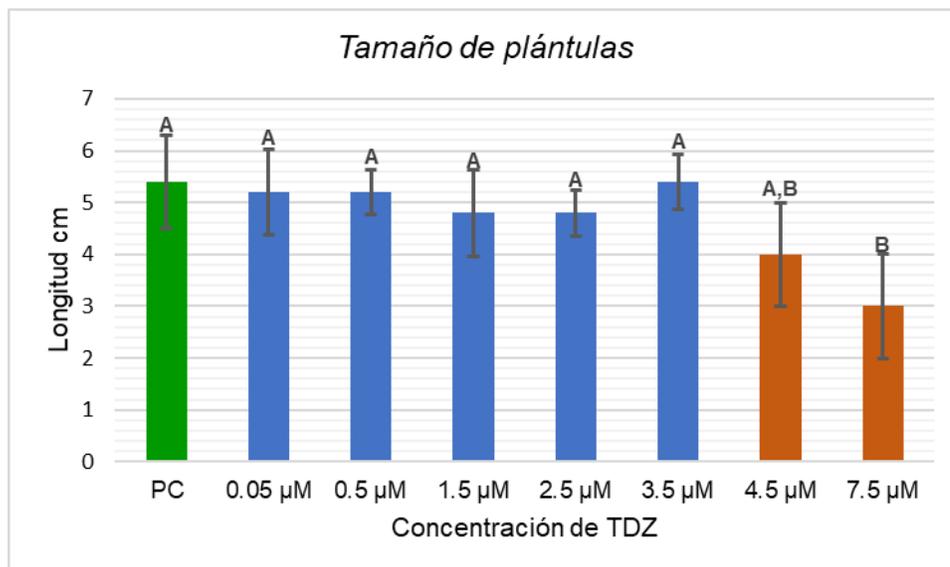
Factor	Media	Agrupación	
3.5 TDZ	5.400	A	
Control	5.400	A	
0.5 TDZ	5.200	A	
0.05 TDZ	5.200	A	
2.5 TDZ	4.800	A	
1.5 TDZ	4.800	A	
4.5 TDZ	4.000	A	B
7.5 TDZ	3.000		B

\*Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

En resumen, la prueba de separación de medias indica dos grupos considerando la longitud de los brotes. Con base en la prueba de Tukey realizada, el tratamiento que resultó con los brotes más pequeños se obtuvo cuando los explantes fueron cultivados en medio adicionado con 7.5  $\mu\text{M}$  de TDZ. En efecto, el Tratamiento con 7.5  $\mu\text{M}$  de TDZ presentó la media de longitud más pequeña por explante con  $3.0 \pm 1.0$  cm (Tabla 15 y Figura 42).



**Figura 43.** Gráfico de índice simultáneos de confianza de la prueba Tukey para la longitud de brotes por concentración de TDZ. Se observan las comparaciones por pares hechas durante el análisis



**Figura 44.** Gráfico de barras de tamaño de brotes por explante en relación con su concentración de TDZ. Se observa la desviación estándar y la diferencia significativa entre los datos analizados por ANOVA y Tukey.

### 3.4.5 Conclusión del análisis estadístico

Con base en el ANOVA y la prueba de Tukey realizados se puede concluir que para ambas variables (número y longitud de brotes) hay una diferencia significativa en al menos un tratamiento de TDZ con respecto al control. El tratamiento con 7.5  $\mu\text{M}$  de TDZ presentó la mejor media del número brotes por explante con  $85.2 \pm 4.4$  con respecto al control que fue de  $5.2 \pm 0.4$ . Sin embargo, la concentración 7.5  $\mu\text{M}$  de TDZ presentó la media más baja en el análisis de la longitud de las plántulas con  $3.0 \pm 1.00$  en comparación con el control con  $5.4 \pm 0.89$  (Tabla 17).

**Tabla 17.** Resumen de las variables analizadas para cada tratamiento con TDZ.

Concentración	Número de brotes		Tamaño de brotes (cm)	
	Promedio	Tukey	Promedio	Tukey
Control	$5.2 \pm 0.4$	F	$5.4 \pm 0.89$	A
0.05 $\mu\text{M}$	$09 \pm 1.0$	D-E-F	$5.2 \pm 0.83$	A
0.5 $\mu\text{M}$	$7.2 \pm 1.3$	E-F	$5.2 \pm 0.44$	A
1.5 $\mu\text{M}$	$13.2 \pm 1.14$	D	$4.8 \pm 0.83$	A
2.5 $\mu\text{M}$	$11.8 \pm 1.3$	D-E	$4.8 \pm 0.44$	A
3.5 $\mu\text{M}$	$25.6 \pm 1.14$	C	$5.4 \pm 0.54$	A
4.5 $\mu\text{M}$	$36.8 \pm 4.8$	B	$4.0 \pm 1.00$	A-B
7.5 $\mu\text{M}$	$85.2 \pm 4.4$	A	$3.0 \pm 1.00$	B

\*Los promedios que no comparten una letra son significativamente diferentes.

En conclusión, el tratamiento 7.5  $\mu\text{M}$  de TDZ produjo el mayor número de brotes (plántulas) en comparación con las otras concentraciones de TDZ y con respecto al Control (0.00  $\mu\text{M}$  de TDZ), pero produjo plántulas de menor longitud comparadas con los otros tratamientos de TDZ y con respecto al Control (0.00  $\mu\text{M}$  de TDZ).

## CAPÍTULO IV. DISCUSIÓN GENERAL

### 4.1 Discusión General

Con los resultados obtenidos se puede señalar que *C. palmata* es una especie que puede propagarse por técnicas de cultivo de tejidos *in vitro* usando para su multiplicación como regulador de crecimiento el TDZ. Unos de los factores que influyen en la multiplicación *in vitro* de los brotes es el manejo que se realiza al explante inicial. En varias especies de plantas se realizan seccionados totales o parciales de los explantes, así como el decapitado del mismo con la finalidad de inhibir la dominancia apical de la yema terminal y propiciar el desarrollo de las pequeñas yemas axilares (Orellana, 1998; George y Debergh, 2008). Durante la etapa 1, el establecimiento del cultivo, se usaron inicialmente explantes de 0.8 cm de longitud, el tamaño no fue el idóneo. Esta conclusión es en base a los resultados obtenidos y documentados después de la primera resiembra ya que el meristemo apical del explante predominó y ejerció una dominancia apical sobre los brotes en desarrollo provenientes de las yemas axilares. La dominancia apical es la inhibición o control del crecimiento que ejerce la yema apical sobre las yemas axilares, este fenómeno se debe fundamentalmente a la acción de dos hormonas: auxinas y citocininas, responsables ambas de la división celular. Mientras exista la yema apical se concentran en ésta para producir el alargamiento del eje celular (Lallana & Lallana, 2014). La proliferación de brotes axilares se logra con la adición de citocininas en el medio de cultivo para romper la dominancia apical y estimular la brotación de las yemas que se encuentran en las axilas de las hojas (Mrogisnski *et al.*, 1991) o como alternativa se secciona completamente el explante. Para solucionar el problema durante el trabajo experimental se realizó un ajuste de tamaño al explante el cual fue reducido hasta 0.5 cm, con la finalidad de tratar de retirar toda la yema apical. Al final del estudio 0.5 cm fue el tamaño adecuado de explante. El dato obtenido sobre el tamaño del explante, concuerda con el tamaño de explante reportado por el grupo de trabajo de Hoyos y colaboradores en el 2020, con la diferencia que las plántulas usadas en su trabajo eran provenientes de la germinación *in vitro* de semillas de *C. palmata* con 60 días post-germinación, mientras que en este trabajo se usaron plantas regeneradas con 90 días después de regeneración.

A pesar de tener explantes con origen diferente, para ambos estudios se utilizaron plántulas previamente establecidas *in vitro*, lo cual contribuyó con la eficiencia del sistema de regeneración. El uso de plántulas jóvenes con pocos meses de cultivo *in vitro* como fuente de explantes es ampliamente recomendado, puesto que el establecimiento de explantes poco diferenciados como es el caso de semillas y tejidos jóvenes como las bases de hojas de plántulas, presentan

grandes ventajas, entre otras, sus respuestas rápidas, menos problemas de contaminación por microorganismos, disponibilidad del explante, factibilidad de manipulación, homogeneidad y rápida respuesta *in vitro* (Hurtado y Merino, 1987; Mroginski y Roca, 1993).

Una diferencia con el estudio publicado por Hoyos *et al.* (2020), fue el medio de cultivo base para los experimentos. En este estudio, durante la realización del trabajo experimental se utilizó como medio de cultivo basal el PC (Phillips & Collins, 1979), mientras que Hoyos y colaboradores reportaron el uso del medio de cultivo MS (Murashige & Skoog, 1962). Además, el regulador de crecimiento adicionado a su medio de cultivo para la inducción y proliferación de nuevos brotes fue la 6-bencilaminopurina (BAP) en concentraciones de 0.00, 0.25, 0.50, 0.75, 1.00, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0 mg/L. El BAP es la citocinina más frecuentemente usada y muestra una actividad alta en muchas especies de plantas (Jankiewicz, 2003). Para los experimentos en este estudio el regulador de crecimiento para la etapa de inducción y proliferación fue el Thidiazuron (TDZ) en concentraciones de 0.0, 0.05, 0.5, 1.5, 2.5, 3.5, 4.5 y 7.5  $\mu\text{M}$ . El regulador TDZ es estructuralmente diferente de la auxina y de la citocinina, pero puede 'imitarlas' en sus efectos sobre el crecimiento y la diferenciación de los explantes cultivados. En estudios realizados *in vitro* se ha demostrado que el TDZ tiene un alto nivel de actividad a concentraciones bajas (Preece *et al.*, 1991; Murthy *et al.*, 1998).

Con relación a la aparición de brotes, el tiempo de respuesta para los explantes en las concentraciones de 2.5 a 7.5  $\mu\text{M}$  de TDZ fue de dos semanas. En contraste, el tiempo de respuesta para las concentraciones 0.00 (control), 0.05, 0.5, y 1.5  $\mu\text{M}$  fue a las tres semanas del establecimiento del cultivo. El TDZ parece promover la iniciación de brotes estimulando la división y multiplicación celular en los meristemos mientras que también reprograma las células a la etapa de desarrollo apropiada para el inicio de la diferenciación de brotes (Vu *et al.*, 2006; Dey *et al.*, 2012). Al igual que en otros procesos inducidos por el TDZ, diversos factores pueden afectar la capacidad de TDZ para inducir la iniciación y el crecimiento de yemas de brotes, incluidos: concentración de TDZ, tipo y fuente de explante, edad o fase de crecimiento, cultivar, presencia de otros reguladores de crecimiento vegetal, particularmente auxina en el medio, balance de reguladores de crecimiento endógenos y presencia de luz (Visser *et al.*, 1992; Sanikhani *et al.*, 2006). A partir del segundo mes de subcultivo se empezó a presentar la respuesta de brotes múltiples en los explantes de las concentraciones 2.5  $\mu\text{M}$ , 3.5  $\mu\text{M}$ , 4.5  $\mu\text{M}$  y 7.5  $\mu\text{M}$  de TDZ. Es bien conocido que el TDZ suprime el crecimiento de los meristemos apicales e induce la formación de meristemos laterales resultando en brotes múltiples (Tzitzikas *et al.*, 2004). Se ha sugerido que el TDZ puede intervenir en la síntesis y acumulación de citocininas en el cultivo de

tejidos (Capelle *et al.*, 1983; De Carvalho *et al.*, 2000), Para la formación de yemas múltiples se hace necesario el empleo de altas concentraciones de citocininas en los medios de cultivo (Pérez, 1998). Al respecto, se observó durante la tercera resiembra que la cantidad de brotes múltiples aumentaba en las concentraciones antes mencionadas, sin embargo, solo lograban elongar una cantidad limitada de ellos. Por estos motivos, en el cuarto mes de subcultivo se implementó un sistema de cultivo de dos fases (semisólido/líquido) ya que en los trabajos de Maene, & Debergh, 1985 (*A. Philodendron*), Alvard *et al.*, 1993 (*Musa acuminata*), Chu *et al.*, 1993 (*Rosa chinensis* Jacq), Vyas *et al.*, 2008 (*C. borivilianum*, *C. paniculatus*, *T. bellerica* y *B. serrata*), Pati *et al.*, 2011 (*Catharanthus roseus* L.G. Dony), Prabhuling & Sathyanarayana, 2017 (*Musa acuminata*), lograron mejorar la elongación y proliferación de los brotes en sus modelos usando medio líquido comparados con los métodos tradicionales de medios de cultivo semisólidos.

El sistema de dos fases implementado en este estudio mejoró significativamente la cantidad de brotes elongados por explante. La concentración 7.5  $\mu\text{M}$  de TDZ obtuvo un promedio de  $85.20 \pm 4.44$  brotes por explante, esto representa 16 veces más brotes por explante con respecto al control el cual tuvo un promedio de  $5.2 \pm 0.44$  brotes por explante. La segunda concentración 4.5  $\mu\text{M}$  de TDZ, cuyos explantes fueron tratados con el sistema de dos fases produjo un promedio de  $36.8 \pm 4.87$  brotes, esto representa aproximadamente siete veces más brotes con respecto al control. Resultados similares fueron obtenidos por Vyas *et al.*, 2008 en sus cultivos de *C. paniculatus* cuando se expusieron a medio líquido; la concentración 3.5  $\mu\text{M}$  de TDZ obtuvo un promedio de  $25.6 \pm 1.14$  brotes, lo cual representa aproximadamente cinco veces más comparado con el control. En este estudio, las concentraciones 0.5 y 0.05  $\mu\text{M}$  de TDZ no presentaron diferencia significativa en el número de brotes por explantes cuando se compararon con el control, sin embargo, las concentraciones 1.5 y 2.5  $\mu\text{M}$  de TDZ presentaron diferencia significativa entre sus promedios de brotes por explante cuando se les comparó con el control, pero no mostraron diferencia significativa entre ellos. Hoyos *et al.* (2020), reportaron como mejor promedio la obtención de  $17 \pm 3$  brotes por explante con una concentración de 2 mg/L de BAP, lo cual es cinco veces menos si se compara con el mejor promedio del tratamiento con 7.5  $\mu\text{M}$  de TDZ del presente estudio.

Cabe destacar el efecto positivo de la adición del medio líquido. En la literatura el uso de medio líquido en el cultivo de tejidos se describe a menudo como un medio para reducir el costo de la micropropagación (Alvard *et al.*, 1992). La implementación del medio líquido proporciona ciertas ventajas incluyendo una mayor disponibilidad de agua y sustancias disueltas para el explante y menores costos de mano de obra y producción (Gupta y Timmis, 2005; Mehrotra *et al.*, 2007).

Sin embargo, los medios líquidos proporcionan un entorno sustancialmente diferente para las plántulas y su uso generalizado se ve obstaculizado por varios problemas que incluyen la hiperhidricidad del tejido, la rápida propagación de contaminantes y la asfixia de las plántulas (Vyas *et al.*, 2008). En el transcurso de los experimentos del presente estudio se observó la asfixia por el medio líquido de los brotes inferiores del explante, pero no se presentaron problemas posteriores en el desarrollo de los brotes. Algunos de los posibles factores por los que el medio semisólido no era suficiente para permitir la elongación se podrían encontrar en la literatura, la cual indica que el agar en el medio de cultivo puede quelar o adsorber iones de nutrientes haciéndolos no disponibles para el explante y puede, dependiendo de su fuente, agregar impurezas iónicas al medio (Romberger & Tabor, 1971; Debergh, 1983; Conner y Meredith, 1984; Bornmann y Vogelmann 1984). Sin embargo, tampoco se descarta que la cantidad de biomasa pudo ser una limitante para que los brotes elongaran, ya que eran demasiados brotes y los nutrientes no se podían distribuir con equidad y rapidez en el explante.

Un aspecto relevante en el desarrollo de metodologías de micropropagación de plantas se relaciona con el tamaño de las plántulas regeneradas debido al impacto que tiene sobre los costos y tiempos de producción. Al respecto, los promedios de longitud de los brotes generados a las concentraciones 0.05, 0.5, 1.5, 2.5, 3.5, 4.5  $\mu\text{M}$  de TDZ no tuvieron diferencia significativa entre ellos y tampoco con respecto al promedio del control (Tabla 17). En contraste, la concentración 7.5  $\mu\text{M}$  de TDZ fue la que presentó diferencia significativa con su promedio de longitud  $3 \pm 1$  cm cuando se le comparo con el promedio de tamaño del control  $5.4 \pm 0.89$  cm el cual fue superior.

Para la etapa de enraizamiento no fue necesaria la adición de alguna otra hormona al medio de cultivo, ya que entre las respuestas generadas por el efecto del TDZ se observó que las plántulas de *C. palmata* desarrollaron un sistema radicular funcional. Esta respuesta concuerda con lo reportado por Hoyos *et al.*, (2020) quienes observaron la formación de raíces sin la necesidad de la modificación del medio de proliferación que usaron. Sin embargo, en su estudio, realizaron experimentos para inducir el sistema radicular de sus plántulas regeneradas, mediante un análisis de nueve concentraciones de ANA a 0.0, 0.02, 0.05, 0.10, 0.50, 0.75, 1.00, 1.25, 1.5 mg/L. Sus resultados indican que en todas las concentraciones obtuvieron enraizamiento, pero describiendo como óptima la concentración de 0.75 mg/L de ANA; a pesar de este resultado concluyen que no hay necesidad de realizar la adición del regulador ANA para una etapa de enraizamiento. La diferencia entre los estudios previos y el presente radica en que se ahorró completamente la fase de enraizamiento durante nuestros experimentos de multiplicación *in vitro*,

por lo que las plántulas separadas en la etapa de proliferación pueden pasar de manera directa a la fase de elongación y mantenimiento que se realiza en medio PC basal. En este medio puede continuar el desarrollo de las raíces, sin ningún problema a pesar de no tener regulador de crecimiento. Es importante mencionar que el control presentó formación de raíces y no contaba con TDZ como regulador de crecimiento, por lo que la influencia de los reguladores exógenos adicionados puede no ser la causa del crecimiento de raíces, sin embargo, la presencia del TDZ en el medio de cultivo podría reducir el tiempo de aparición de raíces en la fase proliferación.

En la fase de aclimatación *ex vitro*, se usó una sola mezcla de sustrato, el cual consistió en Agrolita / Sun-shine / Tierra (1-1-2 v/v). Utilizando este sustrato, después de tres semanas de aclimatación se obtuvo un porcentaje de adaptación del 100 %, el cual es igual al porcentaje de supervivencia reportado por Hoyos *et al.*, (2020), con la diferencia del tipo de sustrato usado el cual ellos denominan soli-t15 (tierra-turba-cáscara de arroz + fertilizante) y el tiempo de adaptación, el cual fue de cuatro semanas para el trabajo realizado para ellos. En el presente estudio las plantas regeneradas de *C. palmata* se continuaron adaptando hasta condiciones de casa sombra después de pasar seis semanas en condiciones de invernadero, con iluminación y temperaturas ambientales naturales manteniendo el porcentaje de supervivencia del 100% hasta las condiciones de vivero. De acuerdo con los resultados obtenidos el TDZ demostró ser un mejor regulador para inducir la regeneración de plantas de *Carludovica palmata*, en comparación con lo reportado por Hoyos *et al.*, (2020) usando BAP.

## CAPITULO V. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

### 5.1. Conclusiones

El uso de explantes jóvenes ya establecidos *in vitro* mejoró la disponibilidad del material y los tiempos de respuestas del explante cuando estuvo en medio con TDZ. La respuesta obtenida de los explantes fue vía organogénesis directa. Es de suma importancia manejar el tamaño adecuado de explante y asegurarse de retirar completamente el meristemo apical de cada explante, para así evitar la interferencia con la respuesta general del explante *in vitro*. El método de cultivo de dos fases semisólido/líquido, resultó ser una opción adecuada para resolver los problemas de elongación de los brotes regenerados de *Carludovica palmata* para las concentraciones de 4.5 y 7.5  $\mu\text{M}$  de TDZ.

La fase de enraizamiento no fue necesaria ya que las plántulas comenzaron a desarrollar raíces en el medio usado para la inducción y proliferación, esta respuesta permitiría que el sistema de propagación ahorre tiempo y reduzca costos.

Las plantas de *Carludovica palmata* no presentaron deformación o problemas de crecimiento durante su etapa de aclimatación a *ex vitro*, etapa de invernadero y etapa de vivero. El porcentaje de adaptación es excelente para esta especie y las plantas adaptadas presentan buen crecimiento en condiciones de cultivo en campo.

En términos generales se cuenta con un sistema de regeneración *in vitro* reproducible para la especie *Carludovica palmata* basados en el uso de plántulas *in vitro* como fuente de explantes.

## 5.2. Perspectivas

- Realizar los experimentos de micropropagación para *C. palmata* con explantes de plantas adultas de campo, para observar si hay variación del número de brotes totales por explante, tamaño de los brotes obtenidos y tiempo total de protocolo de regeneración.
- Usar como fuente de explantes para los ensayos de inducción plántulas provenientes de semillas para poder comparar la respuesta ante el TDZ.
- Realizar los experimentos de inducción y diferenciación en medio MS ya que es un medio más completo y podría reducir el tiempo de la regeneración o mejorar la elongación de los brotes.
- Sería recomendable realizar un análisis molecular de la variabilidad genética de las plantas regeneradas *in vitro*, para ver qué tan estable puede ser el sistema de regeneración *in vitro* desarrollado para *C. palmata*.
- La gran cantidad de brotes múltiples que se han obtenido en las concentraciones de 4.5 y 7.5  $\mu\text{M}$  de TDZ, permite plantear que *C. palmata* sea un candidato idóneo para ser utilizada en biorreactores de inmersión temporal, puesto que también presentó resistencia a la vitrificación.
- Una posible mejora para el sistema de propagación de *C. palmata* sería el uso de medio líquido con medio semisólido, para lograr que las plantas elonguen de manera adecuada y rápida. Se podría variar la concentración del regulador, nutrientes o fuente de carbono del medio semisólido con respecto a la del medio líquido y viceversa.
- Con base a los datos obtenidos en este estudio se podrían realizar los experimentos con múltiples concentraciones de TDZ para la especie *Carludovica drudei*, para evaluar su respuesta ya que es una especie muy similar a *C. palmata* por lo que podrían obtenerse resultados similares, ya que en pruebas preliminares *C. drudei* mostro una respuesta favorable al cultivo de tejidos (Anexo 3).

---

## REFERENCIAS

1. **Abdelnour-Esquivel, A., & Vincent, J. (1994).** Conceptos básicos del cultivo de tejidos vegetales. Editorial Bib. Orton IICA/CATIE, pp. 235.
2. **Abel, S., & Theologis, A. (1996).** Early genes and auxin action. *Plant Physiology*, 111(1), 9-17.
3. **Agramonte Peñalver, D; Jiménez Terry, F.; Dita Rodríguez, M.A. (1998).** Aclimatización. En: Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología, Pérez Ponce, J. N. (Ed.). Instituto de Biotecnología de las Plantas. Sta. Clara, Villa Clara. Cuba, pp.193-206.
4. **Aguilar de Tamariz, M.L. (2009).** Tejiendo la vida. ... los sombreros de paja toquilla en el Ecuador. Segunda edición ed. Cuenca, Ecuador: Centro Interamericano de Artesanías y Artes Populares CIDAP, pp. 210.
5. **Ahmed, M. R., & Anis, M. (2012).** Role of TDZ in the quick regeneration of multiple shoots from nodal explant of *Vitex trifolia* L. an important medicinal plant. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 168(5), 957-966.
6. **Alvard, D., Cote, F., & Teisson, C. (1993).** Comparison of methods of liquid medium culture for banana micropropagation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 32(1), 55-60.
7. **Armstrong DJ (1994).** Cytokinin oxidase and the regulation of cytokinin degradation. In: Cytokinin: chemistry, activity, and function, Mok DWS and Mok MC (eds), USA, pp139–154.
8. **Ashikari M, Sakakibara H, Lin S, Yamamoto T, Takashi T, Nishimura A, Angeles ER, Qian Q, Kitano H, Matsuoka M. (2005).** Cytokinin oxidase regulates rice grain production. *Science* 309, 741–745.
9. **Ayala Guerrero, L. M. (2012).** Inducción de embriogénesis somática en cultivo *in vitro* de *Agave atrovirens* Karw. Ex Salmдық. Tesis de Maestría. Instituto Politécnico Nacional. Tlaxcala, México. pp. 80.
10. **Bennett, B.C., Alarcón, R. and Cerón, C. (1992).** The Ethnobotany of *Carludovica palmata* Ruiz & Pavon (*Cyclanthaceae*) in Amazonian Ecuador. *Economic Botany* 46(3), 233-240.
11. **Bhojwani SS, Razdan MK (1996)** Plant Tissue Culture: Theory and Practice. A revised edition. Elsevier, Amsterdam, pp. 393.
12. **Bhojwani, S. S., & Dantu, P. K. (2013).** Micropropagation: in Plant Tissue Culture: An Introductory Text. Springer Science & Business Media, Amsterdam, pp. 245-274.
13. **Bilyeu, K. D., Cole, J. L., Laskey, J. G., Riekhof, W. R., Esparza, T. J., Kramer, M. D., & Morris, R. O. (2001).** Molecular and biochemical characterization of a cytokinin oxidase from maize. *Plant Physiology*, 125(1), 378-386.

- 
14. **Bornman, C. H., & Vogelmann, T. C. (1984).** Effect of rigidity of gel medium on benzyladenine-induced adventitious bud formation and vitrification *in vitro* in *Picea abies*. *Physiologia Plantarum*, 61(3), 505-512.
  15. **Bristol, M. L. (1961).** *Carludovica palmata* in broommaking. Botanical Museum Leaflets, *Harvard University Herbaria*, 19(9), 183-189.
  16. **Brownlee BG, Hall RH, Whitty CD. (1975).** 3-Methyl-2-butenal: an enzymatic degradation product of the cytokinin, N-6-(delta-2 isopentenyl) adenine. *Canadian Journal of Biochemistry* 53, 37–41.
  17. **Burbano, M.; (2000).** Manejo de paja toquilla por grupos locales del Ecuador. Departamento de Investigación, Fundación Ecociencia, Quito, pp. 50.
  18. **Capelle SC, Mok DWS, Turner JE (1983).** Effects of thidiazuron on cytokinin autonomy and the metabolism of N<sup>6</sup> adenosine in callus cultures of *Phaseolus lunatus* L. *Plant Physiology* 73, 796-802
  19. **Cassells, A; Curry, R. (2001).** Oxidative stress and physiological, epigenetic and genetic variability in plant tissue culture: implications for micropropagators and genetic engineers. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 64,145-157.
  20. **Castillo, A., Robert, M., & Larqueé, A. (2010).** CICY, Treinta años de labor científica y educativa. Mérida: Centro de Investigación Científica de Yucatán, AC, pp.416.
  21. **Ceballos E., J. (1998).** Elementos para la conservación y manejo de *Carludovica palmata* en Centroamérica. Tesis de maestría. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE). pp. 80.
  22. **Chan P., Samuel, A. (2019).** Propagación *in vitro* de Palma jipi (*Carludovica palmata* Ruiz & Pavón)", Informe Técnico de Residencia Profesional, Centro de Investigación Científica de Yucatán A.C. (CICY). pp.64.
  23. **Chatfield, J. M., & Armstrong, D. J. (1986).** Regulation of cytokinin oxidase activity in callus tissues of *Phaseolus vulgaris* L. cv Great Northern. *Plant Physiology*, 80(2), 493-499.
  24. **Chawla, H. C. (2004).** Introduction to plant biotechnology. Enfield (NH): Science Publisher, Inc, pp. 760.
  25. **Christianson, M. L., & Hornbuckle, J. S. (1999).** Phenylurea cytokinins assayed for induction of shoot buds in the moss *Funaria hygrometrica*. *American Journal of Botany*, 86(11), 1645-1648.

- 
26. **Chu, C. Y., Knight, S. L., & Smith, M. A. L. (1993).** Effect of liquid culture on the growth and development of miniature rose (*Rosa chinensis* Jacq. 'Minima'). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 32(3), 329-334.
27. **Cleland RE (1995).** Auxin and cell elongation, In: *Plant hormones: Physiology, Biochemistry and Molecular Biology* (Ed. Davies P.J.), Kluwer Academic Publishers, pp. 214–227.
28. **Collin, H. A. & Edwards, S. (1998).** *Plant Cell Culture: Introduction to Biotechniques*. Springer (United Kingdom). Bios Scientific Publishers Ltd, pp. 158
29. **Conner, A. J., & Meredith, C. P. (1984).** An improved polyurethane support system for monitoring growth in plant cell cultures. *Plant cell, tissue and organ culture*, 3(1), 59-68.
30. **Davies, P. J., (Ed.) (1995).** *Plant hormones*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, pp. 217.
31. **De Carvalho, MH, Van Lê B, Zully-Fodil Y, Pham Thi AT, Thanh Van KT (2000).** Efficient whole plant regeneration of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) using thin-cell-layer culture and silver nitrate. *Plant Science* 159 (2), 223 – 232.
32. **Debergh, P. C. (1983).** Effects of agar brand and concentration on the tissue culture medium. *Physiologia Plantarum*, 59(2), 270-276.
33. **Dieleman, J. A., Verstappen, F. W. A., Nicander, B., Kuiper, D., Tillberg, E., & Tromp, J. (1997).** Cytokinins in *Rosa hybrida* in relation to bud break. *Physiologia Plantarum*, 99(3), 456-464.
34. **Duke, J. A. (1986).** *Isthmian ethnobotanical dictionary*. Scientific Publishers, Jodhpur, India. Ecociencia, Quito, Ecuador, pp. 205.
35. **Endress, R. (1994).** *Plant Cell Biotechnology*. Germany: Springer-Publishing Company. pp. 364.
36. **Eriksson, R. (1994).** The remarkable weevil pollination of the neotropical *Carludovicoideae* (*Cyclanthaceae*). *Plant Systematics and Evolution*, 189(2), 75-81.
37. **Evans, D. A.; Sharp, W. R.; Flick, C. E. (1981).** Growth and behavior of cell cultures: embryogenesis and organogenesis, In: Thorpe, T. A., ed. *Plant cell culture: methods and applications in agriculture*. New York: Academic Press; (pp. 45-113).
38. **Fadiman, M. (2001).** Hat weaving with jipi, *Carludovica Palmata* (*Cyclanthaceae*) in the Yucatan Peninsula, Mexico. *Economic Botany*, 55(4), 539-544.
39. **García, E. V., Muñiz, B. F., Galuszka, P., Centeno, M. L., & Frébort, I. (2004).** Niveles des citoquininas endógenas y actividad citoquinina oxidasa/deshidrogenasa en estados juveniles de *Pinus sylvestris*. In *metabolismo y modo de acción de Fitohormonas*. Ediciones Universidad de Salamanca. pp. 47-52.
-

- 
40. **Garcia-Barriga, H. (1975).** Flora medicinal de Colombia, vol. 2. Inst. de Ciencias Naturales Universidad Nacional de Bogotá. Bogotá, Colombia, pp. 538.
  41. **George, e. (1993).** Plant propagation by tissue culture; part 1. The technology. 2 ed. Exegetics Limited. England, pp. 574.
  42. **George, E. F., Hall, M. A. & De Klerk G. J. (Eds.). (2008).** Micropropagation: Uses and Methods, in: Plant Propagation by Tissue Culture. Volume 1. The Background. (3rd Ed.). Netherlands: Springer, pp. 29-64.
  43. **Gonzales, S. R. (2004).** Propagación asexual de plantas: conceptos básicos y experiencias con especies amazónicas. CORPOICA/PRONATTA, pp. 55.
  44. **Gottsberger, G. (1991).** Pollination of some species of the Carludovicoideae, and remarks on the origin and evolution of the Cyclanthaceae. *Botanische Jahrbücher für Systematik*, 113, 221-235.
  45. **Gross, D., & Parthier, B. (1994).** Novel natural substances acting in plant growth regulation. *Journal of Plant Growth Regulation*, 13(2), 93-102.
  46. **Guilfoyle, T., Hagen, G., Ulmasov, T., & Murfett, J. (1998).** How does auxin turn on genes? *Plant Physiology*, 118(2), 341-347.
  47. **Hare PD, Van Staden J. (1994).** Inhibitory effect of thidiazuron on the activity of cytokinin oxidase isolated from soybean callus. *Plant Cell Physiology* 35, 1121–1125.
  48. **Harling, G. (1958).** Monograph of the Cyclanthaceae. Acta de Horticultura. Berg, 18, pp. 428.
  49. **Hoyos Sánchez, R. A., Chicaíza Finley, D., & Zambrano Arteaga, J. C. (2020).** *In vitro* multiplication of iraca palm (*Carludovica palmata* Ruiz & Pavón). *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín*, 73 (1), 939-946.
  50. **Hurtado, D., & Merino, M. (1997).** Cultivo de tejidos vegetales. México, DF Editorial Trillas, pp. 232.
  51. **Hurtado, M. D. V. y Merino, M. M. E. (1987).** Cultivo de tejidos vegetales. Editorial Trillas, pp.213.
  52. **Hutchinson, M. J., & Saxena, P. K. (1996).** Acetylsalicylic acid enhances and synchronizes thidiazuron-induced somatic embryogenesis in geranium (*Pelargonium x hortorum* Bailey) tissue cultures. *Plant Cell Reports*, 15(7), 512-515.
  53. **Jankiewicz, L. S. (2003).** Reguladores del crecimiento, desarrollo y resistencia en plantas: propiedades y acción. México. Ed. Mundi prensa, pp.487.
  54. **Kieber, J. J., & Schaller, G. E. (2014).** Cytokinins, in: The Arabidopsis Book/American Society of Plant Biologists, 12, pp. 55-90.

- 
55. **Kopečný, D., Briozzo, P., Popelková, H., Šebela, M., Končítíková, R., Spíchal, L., ... & Houba-Hérin, N. (2010).** Phenyl-and benzylurea cytokinins as competitive inhibitors of cytokinin oxidase/dehydrogenase: a structural study. *Biochimistry*, 92(8), 1052-1062.
56. **Krikorian, A. D. (1995).** Hormones in tissue culture and micropropagation, In: Plant Hormones Springer, Dordrecht, pp. 774-796.
57. **Lallana, V. H., & Lallana, M. (2014).** Manual de prácticas de fisiología vegetal. Córdoba (Argentina): Eduner, pp.113.
58. **Landis, T. D.; Tinus, R. W. y Barnett, J. P. (1998).** The container Tree Nursery Manual. Volume 6, Seedling propagation. Agricultural Handbook. 674. USDA Forest Service, Washington, DC, pp. 254.
59. **Levitt, J. (1980).** Responses of plants to environmental stresses. I. Chilling, freezing, and high temperature stresses. Academic Press, New York, pp 497.
60. **Levitus, G., Echenique, V., Rubinstein, C., Hopp, E., & Mroginski, L. (2010).** Biotecnología y mejoramiento vegetal II. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Argentina, pp. 650
61. **López, C., Shanley, P., & Cuba Cronkleton, M. (2006).** Riquezas del bosque: frutas, remedios y artesanías en América Latina. En Riquezas del bosque: frutas, remedios y artesanías en América Latina, pp. 180.
62. **López, L., Sarmiento, A., Fajardo, J., Valarezo, L., & Gallego, R. Z. (2013).** Determinación del porcentaje de humedad, solubles e insolubles en agua de la fibra de *Carludovica palmata* (paja toquilla). *Ingenius*, (9), 23-27.
63. **Loyola-Vargas V.M., Ochoa-Alejo N. (2018).** An Introduction to Plant Tissue Culture: Advances and Perspectives. In: Loyola-Vargas V., Ochoa-Alejo N. (eds) Plant Cell Culture Protocols. Methods in Molecular Biology, vol 1815. Humana Press, New York, NY, pp. 3-12.
64. **Maene, L., & Debergh, P. (1985).** Liquid medium additions to established tissue cultures to improve elongation and rooting *in vivo*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 5(1), 23-33.
65. **Martín, M. D. R. (Ed.). (2004).** Metabolismo y modo de acción de fitohormonas (Vol. 71). Universidad de Salamanca, pp.367.
66. **Mik, V., Szüčová, L., Šmehilová, M., Zatloukal, M., Doležal, K., Nisler, J., ... & Spíchal, L. (2011).** N9-substituted derivatives of kinetin: effective anti-senescence agents. *Phytochemistry*, 72(8), 821-831.
67. **Mok, M. C., Mok, D. W. S., Armstrong, D. J., Shudo, K., Isogai, Y., & Okamoto, T. (1982).** Cytokinin activity of N-phenyl-N'-1, 2, 3-thiadiazol-5-ylurea (thidiazuron). *Phytochemistry*, 21(7), 1509-1511.
-

- 
68. **Mroginski, L. A., & Roca, W. M. (1991).** Establecimiento de cultivos de tejidos vegetales *in vitro*. Cultivo de tejidos en la agricultura: Fundamentos y aplicaciones. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). Cali, Colombia, pp. 284.
69. **Muñoz, M. A., & Tuberquía, D. (1999).** Estudio preliminar para el manejo sostenible de *Carludovica palmata* R. y P. como materia prima en la producción de papel artesanal en Cabo Corrientes, Chocó, Colombia. *Actualidades Biológicas*, 21(71), 87-96.
70. **Murthy, B. N. S., Murch, S. J., & Saxena, P. K. (1995).** Thidiazuron induced somatic embryogenesis in intact seedlings of peanut (*Arachis hypogaea*): Endogenous growth regulator levels and significance of cotyledons. *Physiologia Plantarum*, 94(2), 268-276.
71. **Murthy, B., Murch, S., & Saxena, P. (1998).** Thidiazuron: A Potent Regulator of *in vitro* Plant Morphogenesis. *In vitro Cellular & Developmental Biology. Plant*, 34(4), 267-275.
72. **Nisler, J. (2018).** TDZ: mode of action, use and potential in agriculture, In: Thidiazuron: from urea derivative to plant growth regulator, Springer, Singapore, pp. 37-59.
73. **Nisler, J., Kopečný, D., Končítíková, R., Zatloukal, M., Bazgier, V., Berka, K., ... & Spíchal, L. (2016).** Novel thidiazuron-derived inhibitors of cytokinin oxidase/dehydrogenase. *Plant Molecular Biology*, 92(1), 235-248.
74. **Novikova, T. I., Asbaganov, S. V., Ambros, E. V., & Zaytseva, Y. G. (2020).** TDZ-induced axillary shoot proliferation of *Rhododendron mucronulatum* Turcz and assessment of clonal fidelity using DNA-based markers and flow cytometry. *In Vitro Cellular & Developmental Biology Plant*, 56(3), 307-317.
75. **Orellana, P. (1998).** Introducción a la propagación masiva, pp.200.
76. **Ortega Haas, J. J. (2016).** Efecto de abono orgánico e inorgánico en el crecimiento de la Palma de Jipi (*Carludovica palmata* Ruiz & Pavón) en el norte de Campeche, Tesis de licenciatura. Campeche, México. pp. 66.
77. **Pai, S. R., & Desai, N. S. (2018).** Effect of TDZ on various plant cultures: In Thidiazuron: From urea derivative to plant growth regulator., Springer, Singapore, pp. 439-454.
78. **Pati, P. K., Kaur, J., & Singh, P. (2011).** A liquid culture system for shoot proliferation and analysis of pharmaceutically active constituents of *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 105(3), 299-307.
79. **Perea, M. & Tirado, A. (2011).** Cultivo de tejidos *in vitro*. Manual de prácticas de laboratorio. Facultad de Ciencias Departamento de Biología, Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, Colombia, pp. 89.

- 
80. **Perea-Mercado, S. L., Alayón, J. A., & Lope-Alzina, D. G. (2012).** La diversidad vegetal en solares y el empoderamiento de mujeres en comunidades aledañas a la reserva de la Biósfera Calakmul, En: Aves y Huertos de México. Carteles Editores, pp. 90-91.
81. **Pérez Molphe Balch, E. M., Ramírez, R., Núñez, H. G., y Ochoa, A. N. (1999).** Introducción al Cultivo de Tejidos Vegetales. México: Universidad Autónoma de Aguascalientes, pp. 213.
82. **Pérez Ponce, J. N., & Alvarado Capó, Y. (1998).** Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología. Santa Clara: Instituto de Biotecnología de las Plantas, pp. 390.
83. **Pérez, JP (1998).** Variación Somaclonal, En: Propagación y Mejora Genética de Plantas por Biotecnología. Pérez, PJ (Ed.). IBP. Santa Clara, pp. 105-121.
84. **Pérez, R. L. (2001).** Manejo tradicional de bombonaje o paja toquilla (*Carludovica palmata*). Lima, Perú, ITDG-Perú, pp. 45.
85. **Phillips, G. C., & Collins, G. B. (1979).** *In vitro* Tissue Culture of Selected Legumes and Plant Regeneration from Callus Cultures of Red Clover. *Crop Science*, 19(1), 59-64.
86. **Prabhuling, G. y Sathyanarayana, BN (2017).** Método de cultivo en medio líquido para la multiplicación rápida de banano (*Musa acuminata*) cv.'GRAND NAINÉ' a través del cultivo de tejidos. *Revista Internacional de Ciencias de las Plantas*, 12 (1), 85-89.
87. **Preece, J. E., Huetteman, C. A., Ashby, W. C., & Roth, P. L. (1991).** Micro and cutting propagation of *silver maple*. I. Results with adult and juvenile propagules. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 116(1), 142-148.
88. **Preece, J. E., & Imel, M. R. (1991).** Plant regeneration from leaf explants of *Rhododendron* 'PJM Hybrids'. *Scientia horticultrae*, 48(1-2), 159-170.
89. **Raven, P. H., Evert, R. F., & Eichhorn, S. E. (1992).** Biología de las plantas: Cuarta edición. Editorial Reverté. España, pp. 677.
90. **Robert, M. L., Herrera, J. L., Contreras, F., & Scorer, K. N. (1987).** *In vitro* propagation of *Agave fourcroydes* Lem. (Henequen). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 8(1), 37-48.
91. **Roca M. W. y Mroginski L. A. (1991).** Cultivo de Tejidos en la Agricultura. Fundamentos y Aplicaciones, en: Centro Internacional de la Agricultura Tropical Eds. L. A. Cali. Colombia, pp. 36-143.
92. **Romberger, J. A., & Tabor, C. A. (1971).** The *Picea abies* shoot apical meristem in culture. I. Agar and autoclaving effects. *American Journal of Botany*, 58(2), 131-140.
93. **Salisbury, F. B., & Ross, C. W. (1994).** Fisiología vegetal. Cuarta edición. Grupo Editorial Iberoamérica, pp. 759.

- 
94. **Sanikhani, M., Frello, S., & Serek, M. (2006).** TDZ induces shoot regeneration in various *Kalanchoe blossfeldiana* Poelln. cultivars in the absence of auxin. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 85(1), 75-82.
95. **Schmülling, T., Werner, T., Riefler, M., Krupková, E., & y Manns, I. B. (2003).** Structure and function of cytokinin oxidase/dehydrogenase genes of maize, rice, *Arabidopsis* and other species. *Journal of Plant Research*, 116(3), 241-252.
96. **Scragg, A. H. (1995).** The problems associated with high biomass levels in plant cell suspensions. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 4(2), 163-170.
97. **Sharry, S. E., Adema, M., & Abedini, W. (2015).** Plantas de probeta. Editorial de la Universidad Nacional de La Plata (EDULP). pp. 183.
98. **Simbaña, A. (2000).** Fibras Naturales. Alternativa para el Desarrollo Nacional. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 12 (2), pp. 60-70.
99. **Skoog, F., & Miller, C. O. (1957).** Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured. *In Vitro*, 11, 23-43.
100. **Šmehilová M, Galuszka P, Bilyeu KD, Jaworek P, Kowalska M, Sebela M, Sedlářová M, English JT, Frébort I. (2009).** Subcellular localization and biochemical comparison of cytosolic and secreted cytokinin dehydrogenase enzymes from maize. *Journal of Experimental Botany* ,60, 2701–2712.
101. **Spíchal, L., Rakova, N. Y., Riefler, M., Mizuno, T., Romanov, G. A., Strnad, M., & Schmülling, T. (2004).** Two cytokinin receptors of *Arabidopsis thaliana*, CRE1/AHK4 and AHK3, differ in their ligand specificity in a bacterial assay. *Plant and Cell Physiology*, 45(9), 1299-1305.
102. **Standley, P.C. and Steyermark, J.A. (1958).** Flora of Guatemala. United States of America: Chicago Natural History Museum, *Fieldiana: Botany*, 24(6), 36- 38.
103. **Tabiyeh, D. T., Bernard, F., & Shacker, H. (2006).** Investigation of glutathione, salicylic acid and GA3 effects on browning in *Pistacia vera* shoot tips culture. *Acta horticulturae*, 726, 201-204.
104. **Tacoronte, M., Vielma, M., Mora, A., & Valecillos, C. (2004).** Propagación *in vitro* de caoba (*Swietenia macrophylla* King) a partir de yemas axilares. *Acta Científica Venezolana*, 55, 7-12.
105. **Thorpe, T. A. (1980).** Organogénesis *in vitro*: Structural, physiological and biochemical aspects. International Review of Cytology, Supplement 11A. *Academic Press*, Nueva York, 71-111.
-

- 
106. **Trigiano, R. N., & J., G. D. (Eds.) (2005).** Plant Development and Biotechnology. Florida: CRC PRESS, pp. 369.
107. **Tzitzikas, E. N., Bergervoet, M., Raemakers, K., Vincken, J. P., van Lammeren, A., & Visser, R. G. (2004).** Regeneration of pea (*Pisum sativum* L.) by a cyclic organogenic system. *Plant Cell Reports*, 23(7), 453-460.
108. **Valdés, A. E., Centeno, M. L., & Fernández, B. (2003).** Changes in the branching pattern of *Pinus radiata* derived from grafting are supported by variations in the hormonal content. *Plant Science*, 165(6), 1397-1401.
109. **Vasil, I. K.; Thorpe, T. A., (Eds.) (1994).** Plant cell and tissue culture. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, pp. 370.
110. **Vázquez Y. C., Orozco A., Rojas M., Sánchez M. E. y Cervantes V. (1997).** La reproducción de las plantas: Semillas y Meristemos. Fondo de Cultura Económica, pp.104.
111. **Velasteguí Ramos, D. (1974).** Aplicación de los colorantes dispersos a la paja toquilla (Tesis de licenciatura). Escuela Politécnica Nacional, Facultad de Ingeniería Química y Agroindustrial, Quito, Ecuador. pp. 86.
112. **Vilagrosa, A, Villar-Salvador, P, & Puértolas, J. (2006).** El endurecimiento en vivero de especies forestales mediterráneas. En: Calidad de planta forestal para la restauración en ambientes mediterráneos: estado actual de conocimientos. MMA, Organismo Autónomo de Parques Nacionales, Madrid, pp.205.
113. **Visser, C., Qureshi, J. A., Gill, R., & Saxena, P. K. (1992).** Morphoregulatory role of thidiazuron: substitution of auxin and cytokinin requirement for the induction of somatic embryogenesis in geranium hypocotyl cultures. *Plant Physiology*, 99(4), 1704-1707.
114. **Vu, N. H., Anh, P. H., & Nhut, D. T. (2006).** The role of sucrose and different cytokinins in the in vitro floral morphogenesis of rose (hybrid tea) cv. "First Prize". *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 87(3), 315-320.
115. **Vyas, S., Rao, M. S., Suthar, R. K., & Purohit, S. D. (2008).** Liquid culture system stimulates in vitro growth and shoot multiplication in four medicinally important plants. *Medicinal and Aromatic Plant Science and Biotechnology*, 2(2), 96-100.
116. **Vyroubalová S, Václavíková K, Turecková V, Novák O, Smehilová M, Hluska T, Ohnoutková L, Frébort I, Galuszka P. (2009).** Characterization of new maize genes putatively involved in cytokinin metabolism and their expression during osmotic stress in relation to cytokinin levels. *Plant Physiology* 151, 433–447.
-

- 
117. **Whitty CD, Hall RH. (1974).** A cytokinin oxidase in *Zea mays*. *Canadian Journal of Biochemistry*, 52, 789–799.
  118. **Yamada, H., Suzuki, T., Terada, K., Takei, K., Ishikawa, K., Miwa, K., & Mizuno, T. (2001).** The *Arabidopsis* AHK4 histidine kinase is a cytokinin-binding receptor that transduces cytokinin signals across the membrane. *Plant and Cell Physiology*, 42(9), 1017-1023.
  119. **Yip, W. K., & Yang, S. F. (1986).** Effect of thidiazuron, a cytokinin-active urea derivative, in cytokinin-dependent ethylene production systems. *Plant Physiology*, 80(2), 515-519.
  120. **Zepeda, C; Sagawa, Y. (1981).** *In vitro* propagation of pineapple. *Hortscience*, 16, 490-497.

## Anexos.

### Anexo 1. Composición del medio PC (Phillips & Collins, 1979).

Soluciones	Macroelementos	Concentración		Preparación soluciones madre
		mg.L <sup>-1</sup>	mM	g/500 ml
<b>PC1</b> <b>(FILTRAR)</b>	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1,000	12.5	10 g
	KNO <sub>3</sub>	2,100	20.8	21 g
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	325	2.4	3.25 g
	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	85	0.6	0.85 g
<b>PC1a</b>	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	435	1.8	4.35 g
<b>PC1b</b>	CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	600	4.1	6.00 g
	<b>Microelementos</b>	<b>mg.L<sup>-1</sup></b>	<b>mM</b>	<b>g/200 ml</b>
<b>PC2a</b>	KI	1	6.0	0.1 g
	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	5	82.0	0.5 g
	MnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O	15	90.0	1.5 g
	ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	5	17.5	0.5 g
	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0.4	1.7	0.04 g
<b>PC2b</b>	CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0.1	0.4	0.01 g
	CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0.1	0.4	0.01 g
		<b>mg.L<sup>-1</sup></b>	<b>mM</b>	<b>g/500 ml</b>
<b>Solución</b> <b>Nitsch</b>	FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O(EDTA)	25	0.09	2.78 g
	NA <sub>2</sub> EDTA	37.3	100	3.73 g
	<b>Componentes orgánicos</b>	<b>mg.L<sup>-1</sup></b>	<b>μM</b>	<b>g/200 ml</b>
<b>PC3</b>	Tiamina.HCL	2	6	0.4 g
	Pirodoxina.HCL	0.5	2.5	0.1 g
<b>PC4</b>	Mio-inositol	250.0	1,400	10 g /250 ml
	Sacarosa	25,000	7.3 M	25 g/L
<b>Agar</b>		10 g/L		
<b>Ajustar pH a 5.5 con KOH 1M.</b>				
<b>Nota: preparar todos los stocks con agua destilada estéril.</b>				

## Anexo 2. Ficha técnica de Poly-feed.

# Poly-feed GG

### Poly-feed GG 19-19-19+ME

Fertilizante sólido hidrosoluble NPK enriquecido con micro-elementos

#### INFORMACIÓN DEL PRODUCTO

NUTRIENTES		MICRO-NUTRIENTES	
Nitrógeno Total (N)	19.0 %	Hierro (Fe)	1000 ppm
Nitrógeno nítrico (N-NO <sub>3</sub> )	5.5 %	Manganeso (Mn)	500 ppm
Nitrógeno Amoniacal (N-NH <sub>4</sub> )	3.5 %	Zinc (Zn)	150 ppm
Nitrógeno Ureico (N-NH <sub>2</sub> )	10.0 %	Boro (B)	200 ppm
Fósforo (P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> )	19.0 %	Cobre (Cu)	110 ppm
Soluble en agua y solución neutral de citrato de amonio		Molibdeno (Mo)	70 ppm
Potasio soluble (K <sub>2</sub> O)	19.0 %		
pH (Solución al 0.1%)	5.5-6.0		
CE (Solución al 0.01%)	0.13-0.18 mS/cm		
Solubilidad (g/L a 25°C)	600-650		

**Fuente de Nutrientes Primarios:** Nitrato de Potasio, Urea, Fosfato Monoamónico.

Las materias primas como fuente de microelementos son sales de Boro y Molibdeno, quelatos EDTA de Fe, Mn, Zn, Cu.

#### Presentación:

- Saco de polietileno o polipropileno laminado de 25 kg.

#### Uso:

- Fertilizante para Nutrigación™ y aplicaciones foliares en los cultivos.
- Poly-feed GG puede ser mezclado con una amplia variedad de agroquímicos.

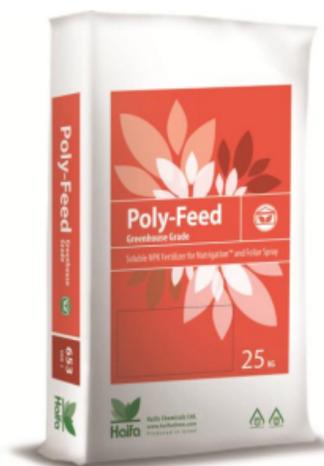
Actualizado: Junio 2012



Haifa Chemicals Ltd. P.O.Box 15011, Matam-Haifa, 31905, Israel Tel: +972-74-7373737, Fax: +972-74-7373733 info@haifachem.com

Haifa México S.A. de C.V Sierra Candela 111-513 Col. Loas de Chapultepec Sección I, 11000 México D.F. Tel: +52-55-5280-4366, Fax: 5280-9015 Mexico@haifa-group.com

www.haifa-group.com



---

### **Anexo 3. Ensayo de multiplicación de *Carludovica drudei*.**

Durante la realización de este trabajo se rescataron 2 explantes de *Carludovica drudei* que fueron introducidos a *in vitro* en el 2020, fueron colocados en medio PC con 3.5  $\mu\text{M}$  de TDZ. De uno de los explantes se obtuvieron las primeras plantas regeneradas *in vitro*, esta línea fue denominada línea L1CD, la cual es la primera línea clonal *in vitro* para esta especie.

#### **Resiembra explantes de *Carludovica drudei*.**

##### **Explante L1CD de *Carludovica drudei*.**

El explante uno de *C. drudei* que dio origen a la línea LICD creció hasta dar origen a más plántulas las cuales fueron separadas y resembradas en medio PC libre de reguladores. Las plántulas presentaban una coloración verde intensa, de tamaños variables de 5 cm a 12 cm, de igual manera presentaban un sistema radicular bien formado con unas raíces rígidas de color verde intenso y las cuales presentaban pelos absorbentes, las plantas de esta especie no mostraron signos de vitrificación o susceptibilidad a algún factor derivado de su manejo *in vitro* (Figuras 1 y 2). Otro punto importante para recalcar es la aparición de las raíces sin la necesidad de la adición de otro regulador vegetal, lo cual muestra una gran similitud en la forma de regeneración con *C. palmata*.



**Figura 1.** Plántulas de *C. drudei* regeneradas en medio PC +TDZ 3.5  $\mu\text{M}$



**Figura 2.** Se observa el sistema radicular de las plántulas regeneras *C. drudei*.

### **Línea L2CD de *Carludovica drudei*.**

La segunda línea de *C. drudei* presentó una respuesta de callogénesis en la concentración de 3.5  $\mu\text{M}$  de TDZ. Los callos de esta línea presentaron múltiples coloraciones, de las cuales pudieron distinguir tres colores: verde, amarillo y morado (Figura 3). Lo cual es un dato muy interesante lo que podría indicar la producción de antocianinas en estos callos. Es importante mencionar que las plantas de *C. drudei* en campo presentan la producción de esta pigmentación morada en la base de sus peciols, lo que es una marca fenotípica que ayuda a diferenciarlas de las plantas de la especie *C. palmata*.



**Figura 3.** Callos de *C. drudei*, en la figura se observa las diferentes tonalidades del callo regenerado en medio PC + TDZ 3.5  $\mu\text{M}$

---

Los callos de esta línea fueron resemebrados de forma periódica cada 30 días, durante las resiembras de los callos se puede observar el tejido superficial necrosado (Figura 4), sin embargo, se retiró dicho material y se resemebró la zona céntrica del callo el cual presentaba alguna de las coloraciones antes mencionadas.



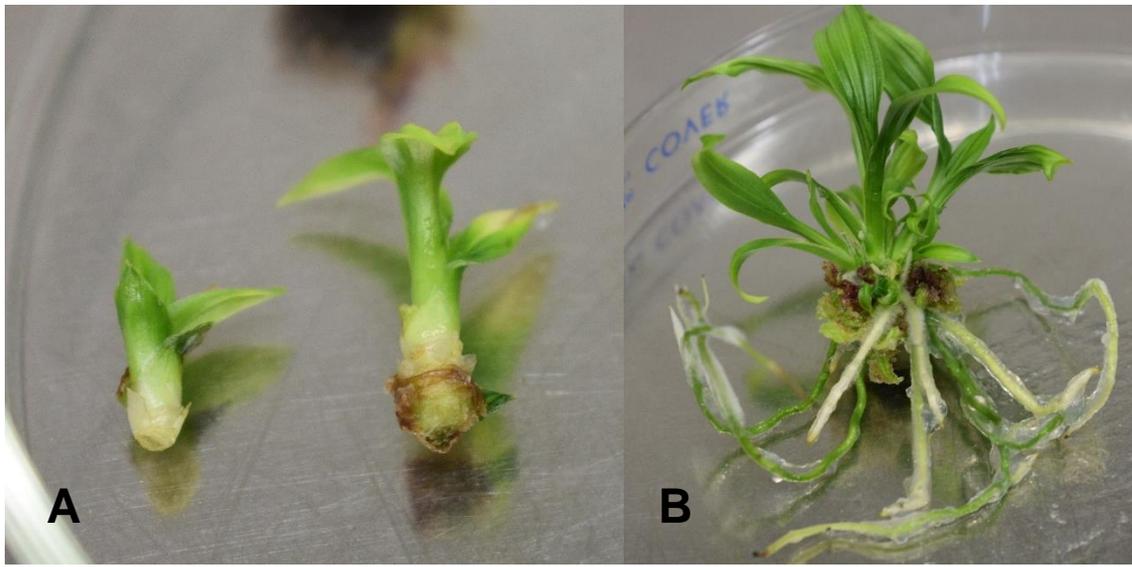
**Figura 4.** A) En la figura se observa un callo de *C. drudei* después de un mes en medio PC + TDZ 3.5  $\mu$ M se observa tejido necrosado en la superficie. B) En el círculo rojo se observa el tejido que será resemebrado.

Durante los trabajos de mantenimiento de estos callos, también se logró observar la formación de algunos brotes, pero con la presencia de la misma necrosis rodeando el tejido calloso circundante (Figura 5) de igual manera presentaba tejido sano en la zona central y en algunas zonas circundantes al callo.



**Figura 5** A) En la figura se observa un callo de *C. drudei* después de un mes en medio PC + TDZ 3.5  $\mu$ M el cual presenta la formación de dos brotes rodeados de tejido muerto en la zona superior del callo, pero con zonas de tejido sano en la periferia.

Los brotes separados del callo carecían de un sistema radicular, con una morfología diferente a las plantas obtenidas de la línea L1CD, estas plántulas no tenían desarrollado la zona del peciolo de la hoja, lo que contrasta en la forma de desarrollo de la línea antes mencionada en la Figura 6, se pueden observar mejor estas diferencias.



**Figura 6.** A) En la figura se observa dos botes formados de un callo de *C. drudei* perteneciente a la línea L2CD. B) En la figura se observan brotes formados vía organogénesis directa estas plántulas cuentan con un sistema radicular bien desarrollado y con la zona de los peciolos bien diferenciada.

Con los datos obtenidos se puede sugerir, que *C. drudei* podría llegar a tener una respuesta similar a la de *C. palmata*, ya que se lograron obtener 25 plántulas en total, las cuales se conservaron *in vitro* para su uso como fuentes de explantes para trabajos posteriores.