



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

**EVALUACIÓN Y DETERMINACIÓN DE TÉCNICAS DE  
CULTIVO *IN VITRO* PARA LA PROPAGACIÓN DE  
FILODENDRO XANADU (*Philodendron xanadu*)**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
DOCTOR EN CIENCIAS AGROPECUARIAS Y  
DESARROLLO RURAL**

**P R E S E N T A:**

**M.C. MOISES LARA ASCENCIO**

Director de tesis

Dra. María Andrade Rodríguez

Cuernavaca, Morelos, noviembre de 2021.



FACULTAD DE CIENCIAS  
AGROPECUARIAS

EVALUACIÓN Y DETERMINACIÓN DE TÉCNICAS DE CULTIVO *IN VITRO* PARA  
LA PROPAGACIÓN DE FILODENDRO XANADU (*Philodendron xanadu*)

Tesis realizada por **M. C. Moises Lara Ascencio** bajo la dirección del Comité Revisor indicado, aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

**DOCTOR EN CIENCIAS AGROPECUARIAS Y DESARROLLO RURAL**

COMITÉ REVISOR

Director de tesis: \_\_\_\_\_

Dra. María Andrade Rodríguez

Revisor: \_\_\_\_\_

Dr. Oscar Gabriel Villegas Torres

Revisor: \_\_\_\_\_

Dr. José Luis Viveros Ceballos

Revisor: \_\_\_\_\_

Dr. Héctor Sotelo Nava

Revisor: \_\_\_\_\_

Dr. Porfirio Juárez López

Revisor: \_\_\_\_\_

Dra. Teresa de Jesús Rodríguez Rojas

Revisor: \_\_\_\_\_

Dr. Dagoberto Guillén Sánchez†

Cuernavaca, Morelos, noviembre de 2021.

## **AGRADECIMIENTOS**

Gracias a Dios por prestarme vida y salud, darme oportunidades infinitas y llenarme de logros para crecer en la vida profesional y personal.

En primera instancia agradezco a mis formadores Dra. María Andrade Rodríguez, Dr. Oscar Gabriel Villegas Torres, Dr. Héctor Sotelo Nava, Dr. José Luis Viveros Ceballos, Dr. Porfirio Juárez López, Dra. Teresa de Jesús Rodríguez Rojas, Dr. Dagoberto Guillén Sánchez<sup>†</sup>, quienes son personas de gran sabiduría y compromiso, quienes se han esforzado por apoyarme hasta llegar al punto en que me encuentro profesionalmente, gracias a sus ganas de transmitirme sus conocimientos y dedicación que los ha regido, he logrado culminar exitosamente este proyecto.

A mi director de tesis Dra. María Andrade Rodríguez reitero mi gratitud por todo su incondicional apoyo, seguimiento puntual, tiempo y amistad durante mi formación en el posgrado. Le reconozco ampliamente su profesionalismo, organización y conocimientos que la distinguen como una excelente profesora.

Agradezco también a la Facultad de Ciencias Agropecuarias por darme la oportunidad de cursar los estudios de posgrado en sus instalaciones, a sus excelentes profesores por los conocimientos adquiridos y al incondicional apoyo y seguimiento administrativo de los Maestros Vladimir Lezama y Vicente Pineda.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por proporcionarme la beca de doctorado número 702278/584433.

## DEDICATORIA

A mis padres Moises y Clara por haberme forjado como la persona que soy en la actualidad; muchos de mis logros se los debo a ustedes entre los que se incluyen este. Me formaron con reglas y con algunas libertades, pero al final de cuentas me motivaron constantemente para alcanzar mis anhelos.

A mis hermanos Gamaliel y Montserrat, a mi tío Emilio Lara, por todo su apoyo, amor y confianza siempre.

A mis amigos, amistades, compañeros del trabajo y productores por todos los ánimos, felicitaciones, apoyo laboral y a todas las personas que me haya faltado mencionar y que de manera muy especial me han acompañado durante esta etapa.

## ÍNDICE GENERAL

|  | Página |
|--|--------|
| ÍNDICE DE CUADROS  | i      |
| ÍNDICE DE FIGURAS  | iv     |
| RESUMEN GENERAL  | vii    |
| GENERAL SUMMARY  | ix     |
| INTRODUCCIÓN GENERAL   | 1      |
| OBJETIVOS  | 3      |
| HIPÓTESIS  | 4      |
| CAPÍTULO 1. ESTABLECIMIENTO DEL CULTIVO ASÉPTICO <i>IN VITRO</i> DE FILODENDRO XANADU.....   | 5      |
| CAPÍTULO 2. EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE BENCILADENINA EN LA MULTIPLICACIÓN <i>IN VITRO</i> DE FILODENDRO XANADU.....                         | 27     |
| CAPÍTULO 3. CRECIMIENTO <i>IN VITRO</i> DE FILODENDRO XANADU POR EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN Y RELACIÓN NUTRIMENTAL EN EL MEDIO DE CULTIVO..... | 41     |
| CAPÍTULO 4. AGENTES GELIFICANTES ALTERNATIVOS AL AGAR PARA EL CRECIMIENTO <i>IN VITRO</i> DE FILODENDRO XANADU.....                            | 64     |
| CAPÍTULO 5. ENRAIZAMIENTO <i>IN VITRO</i> DE FILODENDRO XANADU...  | 82     |
| CAPÍTULO 6. MEZCLAS DE SUSTRATOS PARA LA ACLIMATACIÓN DE PLÁNTULAS DE FILODENDRO XANADU EN INVERNADERO.....                                    | 93     |

## ÍNDICE DE CUADROS

|  | Página |
|--|--------|
| CAPÍTULO 1   |        |
| Cuadro 1. Composición de los tratamientos para el establecimiento del cultivo aséptico de explantes de filodendro.....   | 9      |
| Cuadro 2. Efecto de la aplicación de productos sanitizantes a plantas madre y uso de NPsAg en el cultivo aséptico de filodendro.....   | 19     |
| CAPÍTULO 2   |        |
| Cuadro 1. Cuadrados medios y parámetros estadísticos del ANOVA para multiplicación de brotes y variables del crecimiento de filodendro xanadu por efecto de Benciladenina..... | 32     |
| Cuadro 2. Respuesta de explantes de filodendro xanadu establecidos en medio de cultivo MS, suplementado con Benciladenina en el primer experimento.....                        | 33     |
| Cuadro 3. Respuesta de explantes de filodendro xanadu establecidos en medio de cultivo MS, suplementado con Benciladenina en el segundo experimento.....                       | 35     |
| CAPÍTULO 3   |        |
| Cuadro 1. Composición química de los medios de cultivo, para crecimiento de filodendro xanadu.....   | 46     |
| Cuadro 2. Concentración nutrimental (mg L <sup>-1</sup> ) de once medios de cultivo para el crecimiento <i>in vitro</i> de filodendro xanadu.....                              | 47     |
| Cuadro 3. PO, CE y pH de once medios de cultivo, evaluados en el crecimiento de filodendro xanadu.....   | 50     |

|  |     |
|--|-----|
| Cuadro 4. Efecto de la composición del medio de cultivo en el crecimiento de plantas de filodendro xanadu.....   | 53  |
| Cuadro 5. Efecto de medio de cultivo en la producción de pigmentos en plantas de filodendro xanadu.....  | 58  |
| CAPÍTULO 4   |     |
| Cuadro 1. Productos gelificantes, alternativos al agar para el crecimiento <i>in vitro</i> de brotes de filodendro xanadu.....   | 68  |
| Cuadro 2. Características físicas de nueve medios de cultivo MS.....   | 71  |
| Cuadro 3. Efecto del agente gelificante del medio de cultivo en el crecimiento y contenido relativo de clorofila de filodendro xanadu.....   | 73  |
| Cuadro 4. Correlaciones entre variables de crecimiento de filodendro xanadu con contenido de humedad y dureza del medio de cultivo.....  | 75  |
| CAPÍTULO 5   |     |
| Cuadro 1. Cuadrados medios y parámetros estadísticos del ANOVA para variables del crecimiento de filodendro xanadu durante el enraizamiento de brotes por efecto de auxinas.....   | 87  |
| Cuadro 2. Características morfológicas de brotes de filodendro xanadu <i>in vitro</i> evaluados en medios de cultivo MS con dos tipos de auxinas.....                              | 88  |
| CAPÍTULO 6   |     |
| Cuadro 1. Composición de mezclas de sustratos para la aclimatación de plántulas de filodendro xanadu en condiciones de invernadero.....  | 97  |
| Cuadro 2. Características físicas y químicas de mezclas de sustratos para la aclimatación de filodendro xanadu en condiciones de invernadero.....                                  | 98  |
| Cuadro 3. Cuadrados medios y parámetros estadísticos del ANOVA para variables de crecimiento de filodendro xanadu, por efecto de mezclas de sustratos durante la aclimatación..... | 103 |

|  |     |
|--|-----|
| Cuadro 4. Efecto de la composición de mezclas de sustratos en el crecimiento de plantas de filodendro xanadu durante el periodo de aclimatación.....     | 105 |
| Cuadro 5. Correlaciones entre variables de crecimiento de filodendro xanadu con características de sustratos utilizados en la etapa de aclimatación..... | 108 |



## ÍNDICE DE FIGURAS

|   | Página |
|---|--------|
| CAPÍTULO 1  |        |
| Figura 1. Plantas madre de filodendro xanadu tratadas con productos sanitizantes para el establecimiento del cultivo aséptico <i>in vitro</i> .....   | 10     |
| Figura 2. Brotes axilares de filodendro xanadu listos para el establecimiento <i>in vitro</i> .....   | 10     |
| Figura 3. Agentes contaminantes creciendo en explantes de filodendro xanadu establecidos <i>in vitro</i> .....  | 14     |
| Figura 4. Asepsia de explantes de filodendro por efecto de la aplicación de productos sanitizantes a plantas madre. C1+P: Cuprimicin 100 <sup>®</sup> + Prozyca <sup>®</sup> , C1+T: Cuprimicin 100 <sup>®</sup> + Tokat <sup>®</sup> , AG + P: Agry-Gent Plus <sup>®</sup> + Prozyca <sup>®</sup> , AG + T: Agry-Gent Plus <sup>®</sup> + Tokat <sup>®</sup> ; C5+P: Cuprimicin 500 <sup>®</sup> + Prozyca <sup>®</sup> , C5+T: Cuprimicin 500 <sup>®</sup> + Tokat <sup>®</sup> , AGP+P: Agry Gent Plus 5000 <sup>®</sup> + Prozyca <sup>®</sup> , AGP+T: Agry Gent Plus 5000 <sup>®</sup> + Tokat <sup>®</sup> .....   | 14     |
| Figura 5. Tipo de agente contaminante de explantes de filodendro en el establecimiento de cultivo aséptico por efecto de la aplicación de productos sanitizantes a plantas madre. C1+P: Cuprimicin 100 <sup>®</sup> + Prozyca <sup>®</sup> , C1+T: Cuprimicin 100 <sup>®</sup> + Tokat <sup>®</sup> , AG + P: Agry-Gent Plus <sup>®</sup> + Prozyca <sup>®</sup> , AG + T: Agry-Gent Plus <sup>®</sup> + Tokat <sup>®</sup> ; C5+P: Cuprimicin 500 <sup>®</sup> + Prozyca <sup>®</sup> , C5+T: Cuprimicin 500 <sup>®</sup> + Tokat <sup>®</sup> , AGP+P: Agry Gent Plus 5000 <sup>®</sup> + Prozyca <sup>®</sup> , AGP+T: Agry Gent Plus 5000 <sup>®</sup> + Tokat <sup>®</sup> . Medias con letras iguales dentro de cada agente contaminante no son estadísticamente diferentes (DMS = 3.06), (DMS = 2.77)..... | 15     |
| Figura 6. A1: <i>Aspergillus</i> sp. en medio PDA, A2: hifas y conidióforos con cabeza en forma radial característico de <i>Aspergillus</i> sp. (40X), B1: <i>Penicillium</i> sp. en medio PDA, B2: conidióforos en forma de pincel característicos de <i>Penicillium</i> sp. 40X.....  | 21     |
| CAPÍTULO 2  |        |

|   |    |
|---|----|
| Figura 1. Producción de brotes por explante por efecto de la concentración de Benciladenina. DMS=0.08.....  | 35 |
| Figura 2. Multiplicación de brotes de filodendro xanadu en medio de cultivo MS suplementado con benciladenina. a) 2, b) 2.5, c) 3 y d) 3.5 mg L <sup>-1</sup> .....   | 37 |
| <b>CAPÍTULO 3</b>   |    |
| Figura 1. Plántula de filodendro xanadu cultivada en medio de cultivo elaborado con fertilizantes comerciales grado no reactivo.....  | 54 |
| Figura 2: Efecto de medio de cultivo en la acumulación de materia seca de plantas de filodendro xanadu. Medias con letras iguales entre barras no son estadísticamente diferentes de acuerdo con la prueba LSD ( $P \leq 0.05$ ), (DMS= 0.03).....  | 56 |
| <b>CAPÍTULO 4</b>   |    |
| Figura 1. Evaluación de dureza (N) del gel del medio de cultivo MS solidificado con: a) phytigel, b) agar.....  | 69 |
| Figura 2. Altura de brotes de filodendro xanadu por efecto del tipo y cantidad de gelificante, DMSH= 1.32.....  | 72 |
| Figura 3. Plántula cultivada en medio de cultivo MS gelificado con 1.5 g L <sup>-1</sup> de phytigel.....   | 76 |
| <b>CAPÍTULO 5</b>   |    |
| Figura 1. Enraizamiento de brotes de filodendro xanadu. a) Formación múltiple de raíces adventicias en brotes por efecto de AIB, b) Plántula completa con raíces bien diferenciadas por efecto del AIB, c) Raíces en brotes cultivados con AIA, d) Plántula cultivada en medio con AIA..... | 89 |
| <b>CAPÍTULO 6</b>   |    |
| Figura 1. Plántulas de filodendro xanadu al momento de iniciar el periodo de aclimatación .....   | 98 |

|   |     |
|---|-----|
| Figura 2. Respuesta de inicio de crecimiento y porcentaje de aclimatación de plántulas de fiodendro xanadu en nueve mezclas de sustratos en condiciones de invernadero.....                       | 100 |
| Figura 3. Aclimatación exitosa de plántulas de filodendro xanadu a los nueve días después del trasplante.....   | 101 |
| Figura 4. Plantas de filodendro xanadu a los 52 días después del trasplante, cultivadas en la mezcla de sustrato 5 (Ocochal molido, 70 %: Polvo de coco, 10 %: Turba, 10 %: Agrolita, 10 %)...... | 102 |
| Figura 5. Altura de planta de filodendro xanadu por efecto de la mezcla de sustrato durante la aclimatación. DMS=1.94.....  | 104 |
| Figura 6. Raíces por planta de filodendro xanadu, por efecto de la mezcla de sustrato durante la aclimatación. DMS=1.08.....  | 106 |

## RESUMEN GENERAL

La producción de ornamentales en Morelos se estima en 3000 ha con un valor de la producción de 61,538 dólares por ha/año; el filodendro es una de las especies que figuran dentro de las más importantes; el precio de venta varia de 0.44 a 0.56 dólares en etapa de plántula en contenedores de 72, 98 y 128 cavidades; mientras que en maceta oscila entre los 1.8 a 6.2 dólares, de acuerdo a los puntos de venta y tamaño de la planta. La mayoría de plantas del género filodendro comercializadas, son propagadas mediante cultivo de tejidos *in vitro*. El cultivo *in vitro* es una técnica de reproducción asexual en condiciones asépticas, que utiliza la capacidad de cada célula vegetal para generar individuos genéticamente iguales. La producción de plantas ornamentales ha empleado esta técnica para multiplicar plantas con alto grado de uniformidad y sanidad. El objetivo general de la presente investigación fue establecer el protocolo de propagación *in vitro* de filodendro xanadu, durante las diferentes fases del cultivo *in vitro*, desde el establecimiento del cultivo aséptico con el empleo de productos sanitizantes, composición del medio de cultivo, reguladores del crecimiento, agentes gelificantes y mezclas de sustratos durante la aclimatación. Para cumplir con el objetivo general y lograr la micropropagación exitosa y rentable de filodendro xanadu, fueron desarrollados protocolos para las diferentes fases del cultivo *in vitro*: el establecimiento del cultivo aséptico, mediante el tratamiento fitosanitario de plantas madre donantes de explantes; fase de mutiplicación de brotes, donde se estudiaron medios de cultivo suplementados con ocho concentraciones de benciladenina; para el crecimiento de brotes se evaluaron medios de cultivo modificados en relación y concentración nutrimental; también se estudió el empleo de agentes gelificantes alternativos al agar; se estudio el enraizamiento de brotes con ácido 3-indolbutírico y ácido 3-indolacético; finalmente, se estudiaron nueve mezclas de sustratos durante el periodo de aclimatación. Como material vegetal se utilizaron plántulas de filodendro xanadu obtenidas por cultivo de tejidos. El medio de cultivo empleado fue el Murashige y Skoog (MS:1962). El establecimiento *in vitro* se logró en forma exitosa con la acción conjunta de los productos sanitizantes en el tratamiento de plantas madre y la adición

de nanopartículas de plata al medio de cultivo por siete días, generando el 100 % de explantes asépticos. Durante la fase de multiplicación, la tasa de multiplicación más alta fue de 4 brotes a los 63 días y se obtuvo en el medio de cultivo suplementado con 3 mg L<sup>-1</sup> de benciladenina. Durante la fase de crecimiento de brotes, el medio de cultivo 7 preparado con fertilizantes comerciales grado no reactivo (14, 0.75, 5.25, 8.27, 7 y 4.73 me L<sup>-1</sup>) y medio 2 (10, 1.25, 8.75, 7, 9 y 4 me L<sup>-1</sup>) de NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub><sup>-</sup>, SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>, K<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup> y Mg<sup>2+</sup>, microelementos Fe, 5; B, 0.5; Mn, 0.5; Zn, 0.05; Cu, 0.045 y Mo, 0.01 me L<sup>-1</sup>, y vitaminas del medio MS, permitieron el crecimiento *in vitro* con la misma o mayor eficiencia que el medio de cultivo convencional MS (1962). Durante la evaluación de agentes gelificantes, el medio de cultivo solidificado con Phytigel a 1.5 g L<sup>-1</sup> tuvo mayor efecto positivo en el crecimiento de las plantas, donde se obtuvieron en promedio plantas con altura de 3.3 cm, con 7.6 hojas, 1.2 raíces con 12.4 cm de longitud y con más clorofila (40.6 unidades spad), por consiguiente, se consideró como el producto más apropiado para sustituir del agar y además es de menor costo (\$ 0.9 por litro de medio de cultivo). En la fase de enraizamiento, se observó que el óptimo enraizamiento ocurrió a los 17 días en el medio de cultivo suplementado con 0.5 mg L<sup>-1</sup> de ácido 3-indolbutírico, donde se obtuvieron 6.6 raíces con 6 cm de longitud, así como plantas de 4.1 cm con 9.8 hojas y con más clorofila (36.6 unidades spad). Finalmente, durante la aclimatación de brotes, las plantas fueron aclimatadas en forma exitosa al 100 % en condiciones de invernadero en una mezcla de sustratos compuesta por ocochal molido 70 %, polvo de coco 10 %, turba 10 % y agrolita 10 %, donde esta mezcla presentó mejores cualidades para la aclimatación al promover una respuesta de inicio de crecimiento más rápida y generar plantas de mayor altura, número de hojas, diámetro de tallo, contenido relativo de clorofila y número de raíces.

**Palabras clave:** filodendro xanadu, propagación *in vitro*, reguladores de crecimiento, nutrición vegetal *in vitro*, aclimatación.

## GENERAL SUMMARY

The production of ornamentals in Morelos is estimated at 3,000 ha with a production value of \$ 61,538 per ha / year; the philodendron is one of the species that appears within the most important; the sale price varies from 0.44 to 0.56 dollars at the seedling stage in containers of 72, 98 and 128 cavities; while in pot it ranges from 1.8 to 6.2 dollars, according to the points of sale and size of the plant. Most of the commercialized philodendron plants are propagated by *in vitro* tissue culture. *In vitro* culture is an asexual reproduction technique under aseptic conditions, which exploits the capacity of each plant cell to generate genetically identical individuals. The production of ornamental plants has used this technique to multiply plants with a high degree of uniformity and health. The general objective of this research was to establish the *in vitro* propagation protocol of philodendron xanadu, during the different phases of *in vitro* culture, from the establishment of aseptic culture with the use of sanitizing products, composition of the culture medium, growth regulators, gelling agents and substrate mixtures during acclimatization. To meet the general objective and achieve the successful and profitable micropropagation of philodendron xanadu, protocols were developed for the different phases of *in vitro* culture, such as the establishment of aseptic culture, through the phytosanitary treatment of explant donor mother plants; shoot multiplication phase where culture media supplemented with eight concentrations of benzyladenine were studied; for the growth of shoots, modified culture media were evaluated in relation and nutrient concentration; the use of alternative gelling agents to agar was also studied; likewise, the rooting of shoots was studied with 3-indolebutyric acid and 3-indoleacetic acid; finally, nine substrate mixtures were studied during the acclimatization period. Philodendron xanadu seedlings obtained by tissue culture were used as plant material. The culture medium used was Murashige and Skoog (MS: 1962). The *in vitro* establishment was successfully achieved with the joint action of sanitizing products in the treatment of mother plants and the addition of silver nanoparticles to the culture medium for seven days, generating 100% aseptic explants. During the multiplication phase, the highest

multiplication rate was 4 shoots at 63 days and was obtained in the culture medium supplemented with 3 mg L<sup>-1</sup> of benzyladenine. During the shoot growth phase, culture medium 7 prepared with commercial grade non-reactive fertilizers (14, 0.75, 5.25, 8.27, 7 and 4.73 me L<sup>-1</sup>) and medium 2 (10, 1.25, 8.75, 7, 9 and 4 me L<sup>-1</sup>) of NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub><sup>-</sup>, SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>, K<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup> y Mg<sup>2+</sup>, microelements Fe, 5; B, 0.5; Mn, 0.5; Zn, 0.05; Cu, 0.045 y Mo, 0.01 me L<sup>-1</sup>, and vitamins of the MS medium allowed *in vitro* growth with the same or greater efficiency than the conventional MS culture medium (1962). During the evaluation of gelling agents, the culture medium solidified with Phytigel at 1.5 g L<sup>-1</sup> had a greater positive effect on plant growth, where plants with a height of 3.3 cm with 7.6 leaves, 1.2 roots with 12.4 cm in length were obtained and with more chlorophyll (40.6 spad units), as well as the lower cost of the gelling product (\$ 0.9 per liter of culture medium), consequently, it was considered the most appropriate product to replace agar and is also less costly. In the rooting phase, it was observed that optimal rooting occurred at 17 days in the culture medium supplemented with 0.5 mg L<sup>-1</sup> of 3-indole butyric acid, where 6.6 roots were obtained with 6 cm in length, as well as plants of 4.1 cm with 9.8 leaves and more chlorophyll (36.6 spad units). Finally, during the acclimatization of shoots, the plants were successfully acclimatized to 100% in greenhouse conditions in a mixture of substrates composed of 70 % ground ochochal, 10 % coconut powder, 10 % peat and 10 % agrolite, where it is the mixture presented better qualities for acclimatization by promoting a faster growth initiation response and generating taller plants, number of leaves, stem diameter, relative chlorophyll content and number of roots.

**Key words:** philodendron xanadu, *in vitro* propagation, growth regulators, *in vitro* plant nutrition, acclimatization.

## INTRODUCCIÓN GENERAL

*Philodendron* es el segundo género más grande de la familia Araceae, con 480 especies, exclusivamente neotropicales. La variabilidad morfológica que existe entre las distintas especies, los cultivares recientemente desarrollados y su hábito de crecimiento hace que los cultivares de filodendro sean utilizados como plantas ornamentales para escritorio, cestas colgantes, tótems o plantas de piso. El filodendro es una planta con alto precio de venta; sin embargo, en México no se dispone de suficiente material vegetal para los productores de esta planta ornamental.

El filodendro es una de las especies ornamentales más importantes cultivadas en el estado de Morelos, donde se produce una amplia variedad de ésta. La propagación de plantas para cultivo en vivero generalmente se realiza mediante semillas, esquejes, estacas, hijuelos, entre otros; sin embargo, para la propagación de filodendro xanadu estos métodos de propagación resultan lentos e inconsistentes. El filodendro xanadu se propaga *in vitro* con éxito, al igual que otras especies de este género. Además, esta técnica de propagación vegetal ofrece provisión de plantas de alta calidad y sanidad con la periodicidad deseable.

Para iniciar los cultivos *in vitro* existe un problema serio con agentes contaminantes, pues éstos compiten ventajosamente con las plantas por los nutrimentos del medio de cultivo y terminan por matar los tejidos. Por lo tanto, resulta necesario desarrollar protocolos eficientes de desinfección de explantes que eliminen los microorganismos exógenos.

Actualmente se han propuesto distintos protocolos para la micropropagación de algunas especies del género *Philodendron*, que incluyen desde el establecimiento del cultivo aséptico, multiplicación y enraizamiento, donde el medio de cultivo más utilizado es el MS (Murashige & Skoog, 1962), por los buenos resultados que ha presentado en la micropropagación de diversas especies, no obstante, para algunas especies el medio MS se ha considerado inadecuado.



La formulación del medio de cultivo adecuada es esencial para el éxito en la propagación *in vitro* dado que éste suministra los nutrientes necesarios (minerales, vitaminas, reguladores del crecimiento, entre otros) para el desarrollo apropiado de la planta; por lo que el medio debe prepararse con la cantidad de nutrientes necesaria para satisfacer los requerimientos de cada especie. La formulación nutrimental propuesta por Steiner (1984) señala que las características químicas de una solución nutritiva, tales como: la relación mutua de cationes, la relación mutua de aniones, la concentración iónica total, la conductividad eléctrica y el pH, tienen alto efecto en el crecimiento, rendimiento y calidad de las plantas. Estas características también se presentan en los medios de cultivo que se preparan para la propagación *in vitro*, que podría considerarse también como una modalidad de hidroponía, pero en condiciones asépticas.

Los medios de cultivo aportan los compuestos nutricionales necesarios para promover el crecimiento de los tejidos vegetales establecidos *in vitro*, así como, dar sostén a los explantes, por lo que la respuesta morfogénica depende sustancialmente de la composición del medio de cultivo y el agente gelificante empleado. Se conocen como agentes gelificantes a los componentes del medio de cultivo que se utilizan para que éste permanezca en un estado semisólido y proporcione sostén al explante. Uno de estos es el agar, el agente gelificante más utilizado en el cultivo *in vitro* debido a sus propiedades físico-químicas, pero es el componente más caro en la preparación del medio de cultivo, ya que representa un 70% del costo total del medio, elevando así los precios. La propagación *in vitro* de filodendro se realiza utilizando preferentemente agar bacteriológico y pocas veces se usa otro tipo de compuestos como phytigel y carragenos.

Las plantas obtenidas por micropropagación deben pasar por una etapa de aclimatación antes de ser establecidas en un sitio definitivo, esta etapa es considerada crítica por el estrés al que se someten las plantas debido a diversos factores. El sustrato es considerado uno de los factores más importantes en el establecimiento y crecimiento de plántulas, por lo que es importante definir en la mayoría de los casos una mezcla de componentes que satisfagan este criterio.

Con base en la importancia del filodendro, esta investigación se realizó con el objetivo de generar un protocolo de propagación desde la preparación del material madre hasta la obtención de plántulas aclimatadas, así como emplear técnicas e insumos que disminuyan los costos de producción y hagan más eficiente esta técnica de propagación.

## **OBJETIVO GENERAL**

Establecer el protocolo de propagación *in vitro* de filodendro xanadu, durante las diferentes fases del cultivo *in vitro*: desde el establecimiento del cultivo aséptico con el empleo de productos sanitizantes, composición del medio de cultivo, reguladores del crecimiento, agentes gelificantes y mezclas de sustratos durante la aclimatación.

## **OBJETIVOS PARTICULARES**

1. Evaluar el efecto de seis productos comerciales para el pretratamiento de plantas madre que permitan el establecimiento aséptico de los explantes aislados *in vitro*.
2. Evaluar el efecto de nueve concentraciones de 6-benciladenina para promover la multiplicación de brotes.
3. Determinar el efecto de la relación de nutrimentos y concentración de la solución nutrimental en el medio de cultivo sobre el crecimiento de brotes.
4. Evaluar medios de soporte alternativos al agar en el crecimiento de filodendro xanadu.
5. Evaluar la concentración de dos auxinas para determinar la más adecuada para el enraizamiento de brotes.
6. Evaluar durante el periodo de aclimatación el efecto de cinco mezclas de sustratos en el crecimiento de plantas de filodendro xanadu obtenidas mediante propagación *in vitro*.

## HIPÓTESIS

1. El pretratamiento de plantas madre con la aplicación de Cuprimicin 100® y Prozycar® generará el mejor resultado en el establecimiento del cultivo aséptico.
2. La concentración óptima de benciladenina para la multiplicación de brotes será de 3 mg L<sup>-1</sup>.
3. Al menos una relación y concentración de nutrimentos en el medio de cultivo producirá igual o mejor crecimiento de brotes que el medio de cultivo MS (1962).
4. Al menos un agente gelificante será una buena alternativa para el crecimiento de brotes de filodendro y tendrá un menor costo.
5. El ácido 3-indolbutírico (AIB) en concentración de 0.5 mg L<sup>-1</sup> generará mejores resultados de enraizamiento de brotes.
6. La mezcla de sustratos compuesta por ocochal molido, polvo de coco, turba y vermiculita en proporción 7:1:1:1, será la más adecuada para el crecimiento de plantas de filodendro xanadu durante la aclimatación

Para cumplir con el objetivo general y objetivos particulares anteriores, se desarrolló la presente investigación, misma que se organizó en los seis capítulos siguientes:

## CAPÍTULO 1. ESTABLECIMIENTO DEL CULTIVO ASÉPTICO *IN VITRO* DE FILODENDRO XANADU

Moisés Lara-Ascencio<sup>1</sup>, María Andrade-Rodríguez<sup>1\*</sup>, Héctor Sotelo-Nava<sup>1</sup>, Oscar Gabriel Villegas-Torres<sup>1</sup>, Dagoberto Guillén-Sánchez<sup>1</sup>, Porfirio Juárez-López<sup>1</sup>, Teresa de Jesús Rodríguez-Rojas<sup>1</sup>, José Luis Viveros-Ceballos<sup>2</sup>.

<sup>1</sup>Posgrado en Ciencias Agropecuarias y Desarrollo Rural. Facultad de Ciencias Agropecuarias. <sup>2</sup>Centro de Investigaciones Químicas. Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Av. Universidad 1001. 62209. Col. Chamilpa, Cuernavaca, Morelos. México.

\*Autor para correspondencia: maria.andrade@uaem.mx

### RESUMEN

El filodendro es una planta con alto precio de venta; sin embargo, en México no se dispone de suficiente material vegetal para los productores de este ornamental. Por lo tanto, el objetivo de esta investigación fue establecer el cultivo aséptico *in vitro* de filodendro; para ello, se evaluó el efecto de productos fungicidas y bactericidas aplicados a partir del trasplante de plantas madre hasta la producción y cosecha de explantes (brotes axilares) para el establecimiento *in vitro*. Se efectuaron dos experimentos utilizando el medio de cultivo Murashige y Skoog (MS, 1962), en el segundo se adicionaron nanopartículas de plata (NPsAg) al medio de cultivo. Ambos experimentos se establecieron en un diseño experimental completamente al azar. Se observó que con la acción conjunta de los productos sanitizantes en el tratamiento de plantas madre y en el proceso de desinfección, así como la adición de NPsAg al medio de cultivo se logró establecer el cultivo aséptico de filodendro. El Agry-Gent Plus 5000<sup>®</sup> 2 g L<sup>-1</sup> más Prozyca<sup>®</sup> 2 g L<sup>-1</sup>, en el tratamiento de plantas madre, fueron los que generaron la mayor asepsia de explantes (25.71 %) en el primer establecimiento *in vitro*; mientras que, en el segundo experimento, los mismos productos más la adición de NPsAg al medio de cultivo por siete días, generaron el 100 %

de explantes asépticos. Los agentes contaminantes identificados fueron levaduras, *Aspergillus* sp. y *Penicillium* sp.

**Palabras clave:** *Philodendron*, sanitizantes, *in vitro* patógenos, asepsia, micropropagación.

## SUMMARY

The philodendro is a plant with a high sale price, however, in Mexico there is not enough plant material available for the producers of this ornamental. Therefore, the objective of this research was to establish the *in vitro* aseptic culture of philodendro; for this the effect of fungicides and bactericides applied from the transplantation of mother plants to the production and harvest of explants (axillary shoots) for *in vitro* establishment was evaluated. Two experiments were carried out using the culture medium Murashige and Skoog (MS, 1962), in the second, silver nanoparticles (AgNPs) were added to the culture medium. Both experiments were established in a completely randomized experimental design. It was observed that with the joint action of the sanitizing products in the treatment of mother plants and in the disinfection process, as well as the addition of AgNPs to the culture medium, it was possible to establish the aseptic culture of philodendro. The Agry-Gent Plus 5000<sup>®</sup> 2 g L<sup>-1</sup> plus Prozycar<sup>®</sup> 2 g L<sup>-1</sup> in the treatment of mother plants were those that generated the highest aseptic explants (25.71 %) in the first *in vitro* establishment; while, in the second experiment, the same products plus the addition of AgNPs to the culture medium for seven days generated 100 % aseptic explants. The pollutants identified were yeasts, *Aspergillus* sp. and *Penicillium* sp.

**Key words:** *Philodendron*, sanitizers, *in vitro* pathogens, asepsis, micropropagation.

## INTRODUCCIÓN

*Philodendron* es el segundo género más grande de la familia Araceae, con 480 especies, exclusivamente neotropicales (Boyce y Croat, 2014). La variabilidad morfológica que existe entre las distintas especies, los cultivares recientemente

desarrollados y su hábito de crecimiento hace que los cultivares de filodendro sean utilizados como plantas ornamentales para escritorio, cestas colgantes, tótems o plantas de piso (McConnell *et al.*, 2003). En México se han registrado siete especies endémicas distribuidas en las zonas tropicales de los estados de Veracruz, Chiapas y Oaxaca (Acebey y Krömer, 2008).

La producción de ornamentales en Morelos se estima en 3000 ha con un valor de la producción de 61,538 dólares por ha/año; el filodendro es una de las especies que figuran dentro de las más importantes (Ramírez-Rojas *et al.*, 2016); el precio de venta varía de 0.44 a 0.56 dólares en etapa de plántula en contenedores de 72, 98 y 128 cavidades; mientras que en maceta oscila entre los 1.8 a 6.2 dólares, de acuerdo a los puntos de venta y tamaño de la planta.

El cultivo *in vitro* es una técnica de reproducción asexual en condiciones asépticas, que utiliza la capacidad de cada célula vegetal para generar individuos genéticamente iguales (clones), con alto grado de uniformidad y sanidad (Rout *et al.*, 2006; Ramírez-Rojas *et al.*, 2016). La mayoría de plantas del género filodendro comercializadas, son propagadas mediante cultivo de tejidos *in vitro* (McConnell *et al.*, 2003).

El cultivo *in vitro* presenta un problema serio con agentes contaminantes, pues éstos compiten ventajosamente con las plantas por los nutrientes del medio de cultivo y terminan por matar los tejidos (Azofeifa-Bolaños *et al.*, 2019). Por lo tanto, resulta necesario desarrollar protocolos eficientes de desinfección de explantes que eliminen los microorganismos exógenos.

En este sentido, el tratamiento de plantas madre con productos fungicidas y bactericidas antes del establecimiento *in vitro* y durante el proceso de desinfección de explantes de filodendro resulta efectivo para lograr la asepsia, pues se previenen y eliminan patógenos que se hospedan en los órganos vegetales. Chen *et al.* (2012), establecieron el cultivo aséptico de tres cultivares de filodendro asperjando las plantas madre con Ridomil MZ® y Mancozeb®, una semana previa a la escisión de explantes y los desinfectaron con etanol al 70 % por un min seguido de una solución de hipoclorito de sodio a 1 % durante 20 min. También Mariani *et al.* (2011), lograron el

establecimiento aséptico de *Aglaonema* sp. empleando Antracol® en inmersión durante 30 min, etanol al 70 % durante dos min y Clorox® al 20 y 50 % por diez min.

Recientemente, la adición de nanopartículas de plata (NPsAg) en el cultivo de tejidos vegetales ha incrementado debido a su capacidad para eliminar los microorganismos que afectan a los cultivos *in vitro*, permitiendo explantes con buenos resultados de asepsia (Abdi *et al.*, 2016; Villamizar-Gallardo *et al.*, 2016).

Dada la importancia económica del filodendro y la necesidad de disponer de suficiente material micropropagado para los productores de esta planta, el objetivo de la investigación fue generar un protocolo para el establecimiento del cultivo aséptico *in vitro* de filodendro para iniciar la propagación masiva y atender la demanda que se tiene de esta especie.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Tratamiento de plantas madre con sanitizantes

Plántulas de filodendro de 8 cm de altura, obtenidas de cultivo *in vitro* y aclimatadas fueron establecidas en macetas de 6 pulgadas que contenían tezontle (roca ígnea roja de origen volcánico) con granulometría de 5 mm como sustrato. A partir del trasplante las plantas fueron asperjadas con productos sanitizantes (Cuadro 1). Éstas estuvieron en cultivo bajo cubierta plástica (condiciones de invernadero). Las aspersiones se aplicaron cada catorce días durante 11 meses, junto con la fertilización; la nutrición se aplicó en el agua de acuerdo con la formulación de Steiner (1984), y se le adicionó 1 mL L<sup>-1</sup> de ANIBAC 580® (cuaternario de amonio), para prevenir la presencia de patógenos en el sustrato. Fueron utilizadas diez plantas por tratamiento.

**Cuadro 1. Composición de los tratamientos para el establecimiento del cultivo aséptico de explantes de filodendro.**

| Tratamiento | Clave de tratamiento | Bactericida (g L <sup>-1</sup> )     |   | Fungicida (g L <sup>-1</sup> ) |
|-------------|----------------------|--------------------------------------|---|--------------------------------|
| 1           | C1+P                 | Cuprimicin 100 <sup>®</sup> (2)      | + | Prozycar <sup>®</sup> (2)      |
| 2           | C1+T                 | Cuprimicin 100 <sup>®</sup> (2)      | + | Tokat <sup>®</sup> (1)         |
| 3           | AG + P               | Agry-Gent Plus <sup>®</sup> (2)      | + | Prozycar <sup>®</sup> (2)      |
| 4           | AG + T               | Agry-Gent Plus <sup>®</sup> (2)      | + | Tokat <sup>®</sup> (1)         |
| 5           | C5+P                 | Cuprimicin 500 <sup>®</sup> (3)      | + | Prozycar <sup>®</sup> (2)      |
| 6           | C5+T                 | Cuprimicin 500 <sup>®</sup> (3)      | + | Tokat <sup>®</sup> (1)         |
| 7           | AGP+P                | Agry-Gent Plus 5000 <sup>®</sup> (2) | + | Prozycar <sup>®</sup> (2)      |
| 8           | AGP+T                | Agry-Gent Plus 5000 <sup>®</sup> (2) | + | Tokat <sup>®</sup> (1)         |

Se usó el medio de cultivo MS (Murashige & Skoog, 1962) suplementado con 3 % de sacarosa, 80 mg L<sup>-1</sup> de sulfato de adenina, tiamina, glicina, piridoxina, ácido nicotínico (0.5 mg L<sup>-1</sup>), e inositol (100 mg L<sup>-1</sup>); el pH se ajustó a 5.7; como agente gelificante se usó 0.75 % de agar Merck<sup>®</sup>. Se utilizaron frascos de 100 mL de capacidad con 20 mL de medio de cultivo. El medio de cultivo se esterilizó durante 18 min en autoclave vertical a 1.2 kg cm<sup>-2</sup> y 120 °C.

Para el establecimiento *in vitro* se usaron las plantas tratadas con los sanitizantes y cultivadas durante 185 días después del trasplante (Figura 1). Se tomaron brotes axilares de 3 a 5 cm (Figura 2) y se colocaron por separado en función del tratamiento (Cuadro 1). Se eliminaron las hojas y peciolo de cada brote y se lavaron con abundante agua y jabón; posteriormente, los brotes se sumergieron durante 30 min en una solución preparada con el fungicida Tokat<sup>®</sup> (1 mL L<sup>-1</sup>) y el bactericida Agry-Gent Plus 5000<sup>®</sup> (2 g L<sup>-1</sup>). Pasados los 30 min, en condiciones de asepsia, los explantes se sumergieron en etanol al 70 % por 1 min, se eliminó el alcohol y se agregó una solución de hipoclorito de sodio (Cloralex<sup>®</sup>) al 3 %, se agitaron por 5 min y posteriormente se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril. Los explantes fueron disectados eliminando hojas





Figura 1. Plantas madre de filodendro xanadu tratadas con productos sanitizantes para el establecimiento del cultivo aséptico *in vitro*.



Figura 2. Brotes axilares de filodendro xanadu listos para el establecimiento *in vitro*.

hasta dejar ápices de 3 mm de base y altura; se establecieron cinco explantes por frasco de cultivo y se incubaron a  $28 \pm 2$  °C, con fotoperiodo de 16 h luz y 8 h de oscuridad, intensidad luminosa de  $32 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ .

Se estudiaron ocho tratamientos (Cuadro 1) con siete repeticiones en un diseño experimental completamente al azar. La unidad experimental fue un frasco de 100 mL con 20 mL de medio de cultivo y cinco explantes por frasco.

Siete días después del establecimiento *in vitro*, se evaluó la asepsia del cultivo (explantes libres de bacterias y hongos) y se determinó el porcentaje de contaminación, así como el tipo de agente contaminante.

### **Tratamiento de plantas madre con sanitizantes y uso de nanopartículas de plata (NPsAg)**

Se preparó medio de cultivo MS (1962) en estado líquido, suplementado con 3 % de sacarosa, 80 mg L<sup>-1</sup> de sulfato de adenina, tiamina, glicina, piridoxina, ácido nicotínico (0.5 mg L<sup>-1</sup>) e inositol (100 mg L<sup>-1</sup>); el pH se ajustó a 5.7. El medio de cultivo se esterilizó durante 18 min en autoclave vertical a 1.2 kg cm<sup>-2</sup> y 120 °C. A todo el medio se adicionaron NPsAg en dosis de 200 mg L<sup>-1</sup>, cuando éste tuvo una temperatura aproximada de 38 °C. Se usaron frascos estériles de 100 mL y en cada uno se agregaron 20 mL de medio de cultivo líquido.

Por separado, se preparó el mismo medio descrito con anterioridad al cual se adicionó 0.75 % de agar Merck® para solidificar el medio; se esterilizó igual que el medio anterior. Se usaron frascos estériles de 100 mL y en cada uno se adicionaron 20 mL de medio de cultivo.

Para este segundo establecimiento de desinfección de explantes, se usaron las plantas madre tratadas con los agentes sanitizantes indicados en el Cuadro 1, después de 330 días del trasplante. El proceso de preparación y desinfección de explantes fue el mismo que en el experimento anterior.

Realizada la desinfección, los explantes se establecieron en el medio de cultivo líquido con NPsAg y se colocaron en un agitador orbital por siete días. Posteriormente, los explantes asépticos se subcultivaron pasándolos al medio de cultivo semisólido. Los explantes se incubaron a 28 ± 2 °C, con fotoperiodo de 16 h luz y 8 h de oscuridad, intensidad luminosa de 32 µE·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup>.

Se estudiaron ocho tratamientos (Cuadro 1) con cinco repeticiones en un diseño experimental completamente al azar. La unidad experimental fue un frasco de 100 ml con 20 mL de medio de cultivo y cinco explantes por frasco.

La asepsia de explantes se evaluó a los siete días después de realizar el subcultivo a medio semisólido (explantes libres de bacterias y hongos), se evaluó el porcentaje de contaminación, así como el tipo de agente contaminante.

Los datos de los dos experimentos se estudiaron mediante análisis de varianza (ANOVA) y se realizó la prueba de comparación de medias (DMS,  $P \leq 0.05$ ), con en el paquete estadístico SAS System versión 9.0. Las variables evaluadas se transformaron con la función raíz cuadrada, previo al análisis estadístico.

### **Identificación de agentes contaminantes**

Para hacer la identificación de los agentes contaminantes que crecieron durante el establecimiento del cultivo aséptico de filodendro, se usó una aguja de disección estéril y se tomó una muestra de cada explante contaminado; se obtuvieron 12 aislamientos fúngicos y uno bacteriano. Cada muestra se colocó en una caja Petri con agar papa dextrosa (PDA) y se incubaron a temperatura ambiente por 72 horas. Los agentes contaminantes se reaislaron nuevamente en PDA para obtener cultivos puros. El micelio del hongo se montó en portaobjetos con azul de lactofenol. Las estructuras morfológicas del agente contaminante se observaron con un microscopio compuesto a 40x.

El aislamiento puro identificado visualmente como bacteriano se inoculó en medio PDA con 2 mL L<sup>-1</sup> de ácido láctico al 25 % y medio de cultivo con agar eosina y azul de metileno (EMB) y se incubó durante 24 a 48 h. También se realizaron aislamientos en rodajas de papa en cámaras húmedas, utilizando papel toalla, agua y cajas Petri estériles, se realizó un rayado con una aguja de disección esterilizada e inoculada con el cultivo puro.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Tratamiento de plantas madre con sanitizantes

Tanto el análisis de varianza como la prueba de comparación de medias indicaron que no hubo diferencias en asepsia por efecto de los tratamientos de las plantas madre con productos sanitizantes. No obstante, es importante señalar que no se observó la presencia de bacterias, lo que indica una buena eficiencia de los bactericidas empleados en los tratamientos. En la mayoría de los casos las bacterias son los microorganismos más difíciles de eliminar durante el proceso de desinfección y establecimiento *in vitro*, y son las causantes del mayor porcentaje de contaminación en el cultivo de tejidos vegetales (Capó, 2000; Sánchez *et al.*, 2015; Ramírez-Rojas *et al.*, 2016), lo que indica que, los tratamientos usados en esta investigación generaron buen resultado para la eliminación de bacterias.

En los ocho tratamientos con productos sanitizantes se observó crecimiento de hongos y levaduras junto con los explantes establecidos *in vitro* (Figura 3). El tratamiento con Agry-Gent Plus 5000<sup>®</sup> más Prozycar<sup>®</sup> aplicado a las plantas madre durante su crecimiento fue la combinación que generó mayor asepsia de explantes (25.71 %), esto puede atribuirse al efecto sinérgico del bactericida Agry-Gent Plus 5000<sup>®</sup> y del fungicida Prozycar<sup>®</sup> para reducir la cantidad de agentes contaminantes, ya que la combinación de este bactericida con el fungicida Tokat<sup>®</sup> generó sólo 5.71 % de explantes asépticos. Tanto la combinación de Cuprimicin 100<sup>®</sup> + Tokat<sup>®</sup> y Cuprimicin 500<sup>®</sup> + Prozycar<sup>®</sup> generaron 44.5 % menos asepsia que la aplicación del tratamiento con Agry-Gent plus 5000<sup>®</sup> + Prozycar<sup>®</sup> (Figura 4).



Figura 3. Agentes contaminantes creciendo en explantes de filodendro xanadu establecidos *in vitro*.

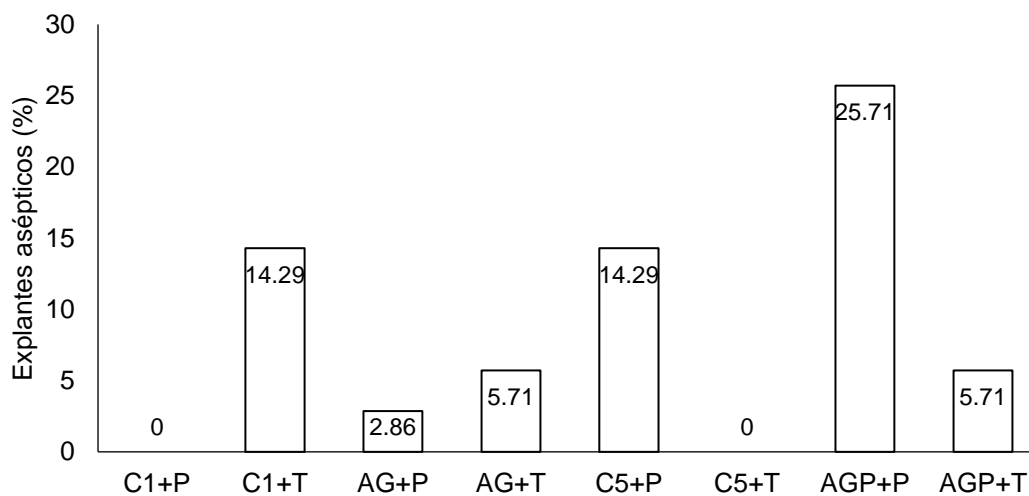


Figura 4. Asepsia de explantes de filodendro por efecto de la aplicación de productos sanitizantes a plantas madre. C1+P: Cuprimicin 100<sup>®</sup> + Prozycar<sup>®</sup>, C1+T: Cuprimicin 100<sup>®</sup> + Tokat<sup>®</sup>, AG + P: Agry-Gent Plus<sup>®</sup> + Prozycar<sup>®</sup>, AG + T: Agry-Gent Plus<sup>®</sup> + Tokat<sup>®</sup>; C5+P: Cuprimicin 500<sup>®</sup> + Prozycar<sup>®</sup>, C5+T: Cuprimicin 500<sup>®</sup> + Tokat<sup>®</sup>, AGP+P: Agry Gent Plus 5000<sup>®</sup> + Prozycar<sup>®</sup>, AGP+T: Agry Gent Plus 5000<sup>®</sup> + Tokat<sup>®</sup>.

El análisis de varianza para cada tipo de agente contaminante indicó que la aplicación de sanitizantes a las plantas madre tuvo un efecto significativo en la contaminación de explantes por hongos y levaduras. La presencia de levaduras fue mayor que la de hongos, aunque éstas no afectaron el crecimiento de los explantes, pues éstos tuvieron un crecimiento normal. En la mayoría de los casos, las plantas tratadas con cualquiera de los cuatro bactericidas en combinación con Tokat® presentaron menor contaminación por levaduras (60, 60, 85.7 y 42.8 %) con respecto a las plantas tratadas con Prozycar® (94.2, 80, 85.7 y 48.6 %) (Figura 5), lo que indica que el Tokat® tiene mejor efecto en el control de levaduras contaminantes de plantas madre de filodendro.

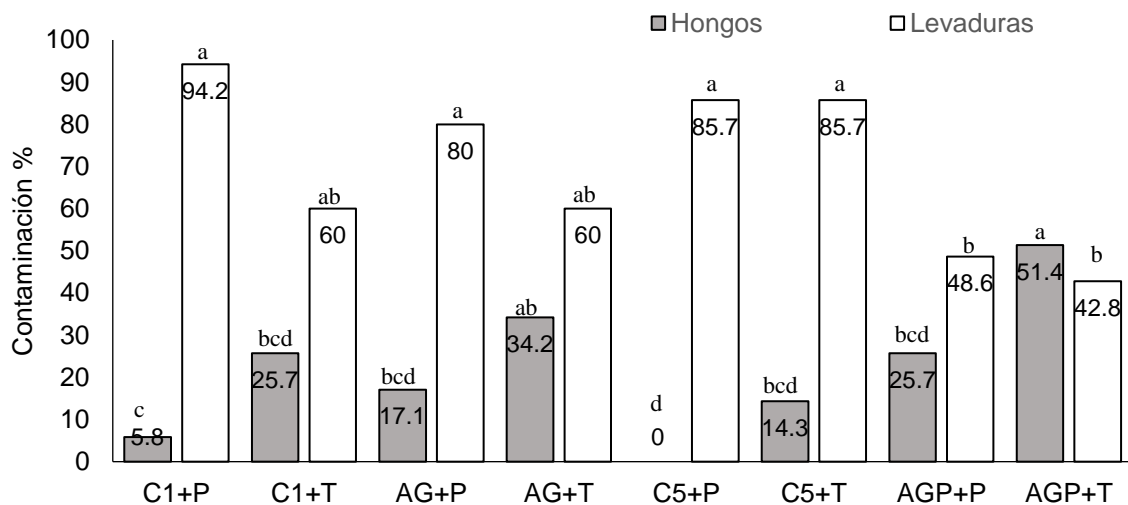


Figura 5. Tipo de agente contaminante de explantes de filodendro en el establecimiento de cultivo aséptico por efecto de la aplicación de productos sanitizantes a plantas madre. C1+P: Cuprimicin 100® + Prozycar®, C1+T: Cuprimicin 100® + Tokat®, AG + P: Agry-Gent Plus® + Prozycar®, AG + T: Agry-Gent Plus® + Tokat®, C5+P: Cuprimicin 500® + Prozycar®, C5+T: Cuprimicin 500® + Tokat®, AGP+P: Agry Gent Plus 5000® + Prozycar®, AGP+T: Agry Gent Plus 5000® + Tokat®. Medias con letras iguales dentro de cada agente contaminante no son estadísticamente diferentes (DMS = 3.06), (DMS = 2.77).

Con relación a la contaminación por hongos, el tratamiento de plantas donantes de explantes con el fungicida Prozycar® dio lugar a menor contaminación fungosa (5.8, 17.1, 0.0 y 25.7 %) en comparación con la aplicación del fungicida Tokat® en donde la contaminación fue 50 % mayor (25.7, 34.2, 14.3 y 51.4 %). Con base en los resultados obtenidos en este estudio, se puede decir que ambos fungicidas controlan tanto hongos filamentosos como levaduras, siendo Prozycar® más efectivo para el control de hongos y Tokat® para controlar levaduras.

En el análisis global de los resultados obtenidos por la aplicación de sanitizantes a plantas madre para disminuir la contaminación total, se observó que de acuerdo al tipo de microorganismos que controla cada sanitizante, el mayor porcentaje de asepsia se atribuye a la combinación de Agry-Gent Plus 5000® más Prozycar® (Figura 4), seguido del tratamiento de los explantes con Tokat® y Agry-Gent Plus 5000® por 30 min previo al proceso de desinfección de los explantes con etanol e hipoclorito de sodio. La concentración y tiempo de exposición a los sanitizantes utilizados en esta investigación durante el proceso de desinfección, no afectó negativamente el crecimiento o causó alguna anomalía en el explante ya establecido, como ha sido reportado por otros autores (Amisshah *et al.*, 2016).

El pre tratamiento a plantas madre y tratamiento de explantes con productos fungicidas y bactericidas previo al proceso de desinfección resultó poco adecuado para establecer el cultivo aséptico *in vitro* de filodendro, pues la máxima asepsia fue de 25.7 %. Chen *et al.* (2012) observaron resultados similares al establecer el cultivo aséptico de hojas, peciolos y segmentos nodales de plantas de tres cultivares de filodendro que fueron asperjadas con los fungicidas Ridomil MZ® y Mancozeb®. Una semana previa al corte de explantes, los desinfectaron con etanol al 70 % por un min seguido de una solución de hipoclorito de sodio a 1 % durante 20 min. En contraste, Blanco y Valverde (2004) obtuvieron 90 % de asepsia en explantes *in vitro* de *Philodendron* sp. al aplicar el procedimiento de desinfección siguiente: inmersión en una solución con Benlate® y Agrimicin® por 30 min, enjuague, aplicación de etanol al 95 % por un min, seguido de hipoclorito de sodio al 3.5 % por 10 min, dos enjuagues con agua estéril y después aplicaron hipoclorito de sodio al 1 % durante 15 min.

Los protocolos de desinfección de explantes con productos sanitizantes han sido evaluados en otras Aráceas de interés ornamental, Mariani *et al.* (2011) establecieron el cultivo aséptico de *Aglaonema* sp., los explantes se colocaron en inmersión por 30 min en una solución de Antracol<sup>®</sup>, con etanol al 70 % durante dos min y Clorox<sup>®</sup> al 20 y 50 % durante diez min. Bandyopadhyay *et al.* (2011) obtuvieron 53 % de asepsia en el establecimiento *in vitro* de *Spathyphyllum* sp. desinfectaron con Teepol<sup>®</sup> 1 % (v/v), Bavistin<sup>®</sup> 0.2 % (p/v) y sulfato de estreptomicina 0.05 % (v/v), seguido de la desinfección con etanol al 90 % por un min y luego una solución con 0.1 % de cloruro de mercurio y 0.5 % de hipoclorito de sodio más tres gotas de Tween-20 por 5 min.

De acuerdo con los resultados obtenidos, para que exista una buena disminución de la carga patogénica mediante el empleo de productos sanitizantes en tratamiento a planta madre o directamente a explantes, se debe elegir el sanitizante adecuado y el mejor momento para su aplicación; así como, conocer el origen del explante y los microorganismos asociados a éste. Además, las plantas cultivadas en contenedores bajo cubierta no están directamente expuestas a contaminantes del suelo, aire o lluvia y es posible realizar tratamientos fitosanitarios más efectivos. El tamaño del explante usado en esta investigación fue adecuado, pues los brotes tuvieron buen desarrollo; cuando éste es muy pequeño se necrosa con facilidad, en tanto que, los de mayor tamaño generan elevada contaminación (Blanco y Valverde, 2004).

Se consideró que el pre tratamiento a plantas madre y tratamiento de explantes con los fungicidas y bactericidas previo al proceso de desinfección no resultó adecuado para establecer el cultivo aséptico *in vitro* de filodendro pues sólo se obtuvo 25.7 % de asepsia, y se esperaba obtener al menos 50 % de explantes libres de contaminantes. La eficiencia del método desinfección varía en función de la especie y del criterio de los investigadores, lo que alguien considera adecuado, puede no serlo para el otro; al respecto, Chen & Yeh (2007) consideraron como adecuado 66.7 % de asepsia de *Aglaonema* 'White Tip', en tanto que Turina y Bima (2017) indican que el 78 % de asepsia y 44 % de sobrevivencia fueron convenientes para el establecimiento *in vitro* de *Olea europea*. Dados los resultados obtenidos en esta investigación, se buscó otra alternativa, de la cual se presentan los resultados siguientes.



## **Tratamiento a plantas madre con sanitizantes y uso de nanopartículas de plata (NPsAg)**

El análisis de varianza de los resultados indicó que la adición de NPsAg al medio de cultivo tuvo efecto altamente significativo ( $P \leq 0.01$ ) para disminuir la presencia de agentes contaminantes en los explantes, pues hubo tratamientos en los cuales no se observó la presencia de microorganismos aún después de haber realizado el subcultivo al medio semisólido. Es importante mencionar que en este experimento no hubo contaminación por hongos pluricelulares, los explantes contaminados tuvieron sólo crecimiento de levaduras. Esto indica la importancia que tiene el tratamiento de plantas donantes de explantes con productos específicos de efecto bactericida y fungicida, así como los agentes desinfectantes usados durante el establecimiento del cultivo aséptico para lograr eliminar los contaminantes, con los cuales conviven las plantas durante el cultivo, en este caso el uso de NPsAg tuvo un efecto muy importante en la asepsia de explantes de filodendro.

La asepsia de los explantes establecidos *in vitro* varió de 0 a 80 % en función de las combinaciones de productos sanitizantes aplicados a las plantas madre. Al igual que en el establecimiento *in vitro* de explantes descrito en el experimento anterior, el tratamiento a plantas madre compuesto por el bactericida Agry-Gent Plus 5000<sup>®</sup> 2 g L<sup>-1</sup> más el fungicida Prozyca<sup>®</sup> 2 g L<sup>-1</sup> generó la mayor asepsia de explantes, que en este caso fue de 100 %. Como ya se mencionó, este efecto se atribuye a la sinergia generada entre los dos productos sanitizantes para eliminar hongos y bacterias, así como también al efecto antimicrobiano de las NPsAg. El tratamiento compuesto por Agry-Gent Plus<sup>®</sup> y Prozyca<sup>®</sup> generó el 80 % de asepsia de explantes, este tratamiento también se considera adecuado para iniciar el cultivo *in vitro* de filodendro, pues supera el 50 % mínimo esperado. Los tratamientos donde se usó Cuprimicin 100<sup>®</sup> + Prozyca<sup>®</sup>, Cuprimicin 500<sup>®</sup> + Tokat<sup>®</sup> y Agry-Gent Plus 5000<sup>®</sup> + Tokat<sup>®</sup> generaron el 40 % de asepsia; con los otros tres tratamientos se tuvo contaminación por levaduras en todos los explantes (Cuadro 2).

Lo anterior indica, que el uso de las NPsAg ayudó significativamente a mejorar la asepsia pues se pudo tener 40, 80 y 100 % de explantes libres de microorganismos,

en tanto que en el experimento anterior donde no se usó este germicida, la mayor asepsia fue de 25.7 %; sin embargo, la asepsia dependió también en gran medida de los bactericidas y fungicidas con que fueron tratadas las plantas madre durante su cultivo.

**Cuadro 2. Efecto de la aplicación de productos sanitizantes a plantas madre y uso de NPsAg en el cultivo aséptico de filodendro.**

| Tratamiento<br>Bactericida + Fungicida                     | Explantos<br>asépticos<br>(%) | Contaminación por<br>levaduras<br>(%) |
|--|-------------------------------|---------------------------------------|
| 1: Cuprimicin 100 <sup>®</sup> + Prozyca <sup>®</sup>      | 40 bc                         | 60 ab                                 |
| 2: Cuprimicin 100 <sup>®</sup> + Tokat <sup>®</sup>        | 0 c                           | 100 a                                 |
| 3: Agry-Gent Plus <sup>®</sup> + Prozyca <sup>®</sup>      | 80 ab                         | 20 bc                                 |
| 4: Agry-Gent Plus <sup>®</sup> + Tokat <sup>®</sup>        | 0 c                           | 100 a                                 |
| 5: Cuprimicin 500 <sup>®</sup> + Prozyca <sup>®</sup>      | 0 c                           | 100 a                                 |
| 6: Cuprimicin 500 <sup>®</sup> + Tokat <sup>®</sup>        | 40 bc                         | 60 ab                                 |
| 7: Agry Gent Plus 5000 <sup>®</sup> + Prozyca <sup>®</sup> | 100 a                         | 0 c                                   |
| 8: Agry Gent Plus 5000 <sup>®</sup> + Tokat <sup>®</sup>   | 40 bc                         | 60 ab                                 |
| DMS (P ≤ 0.05)   | 4.45                          | 4.45                                  |

DMS: diferencia mínima significativa. Medias con letras iguales en una columna, no son estadísticamente diferentes.

De acuerdo con Amisshah *et al.* (2016), los explantes contaminados mueren debido a que los agentes contaminantes utilizan el medio rico en nutrientes para su crecimiento y finalmente superan a los explantes por nutrientes y oxígeno, además de secretar fitotoxinas que tienen efectos nocivos (Capó, 2000; Mng'omba *et al.*, 2012). En esta investigación, las levaduras que se observaron creciendo junto con los explantes no afectaron, a simple vista, el crecimiento de los explantes ya que éstos crecieron y formaron brotes como los no contaminados; sin embargo, en el cultivo *in vitro* se debe

tener asepsia total en los explantes porque se puede confundir el crecimiento de levaduras con la incidencia de bacterias.

Los resultados del establecimiento *in vitro* de filodendro de este trabajo concuerdan parcialmente con lo reportado por algunos autores, sobre el efecto positivo que tiene el empleo de NPsAg en el cultivo *in vitro* de tejidos vegetales. No fue posible tener asepsia total en todos los tratamientos, en esta investigación debido a que las NPsAg se aplicaron sólo durante siete días y no durante todo el periodo de cultivo como se reporta en las investigaciones consultadas.

Spinoso-Castillo *et al.* (2017) reportan el uso de NPsAg como agente antimicrobiano y su respuesta hormética en plántulas de vainilla en sistema de inmersión temporal e indican que la contaminación bacteriana se redujo a 0 % con 50; 100 y 200 mg L<sup>-1</sup> de NPsAg y la estimulación del crecimiento sucedió con 25 y 50 mg L<sup>-1</sup> de NPsAg, mientras que la inhibición significativa del crecimiento se observó a 100 y 200 mg L<sup>-1</sup> de NPsAg, por lo que 50 mg de NPsAg por litro de medio de cultivo fue la más adecuada para reducir la contaminación bacteriana e inducir una respuesta hormética; no usar este desinfectante generó 16.6 % de contaminación. Los estudios de Kumar *et al.* (2014) reportan que el empleo de NPsAg durante la germinación de semillas de tres especies de Fabaceas, inhibió la contaminación microbiana, pues las semillas no tratadas con NPsAg mostraron un rico crecimiento de bacterias y hongos.

La cantidad de NPsAg requerida para lograr la asepsia varía en función de la especie y de las condiciones de cultivo de las plantas donadoras de explantes. La modificación del medio de cultivo con la adición de sustancias de efecto bactericida o fungicida genera buenos resultados de asepsia de explantes; sin embargo, la presencia de estos compuestos en el medio de cultivo puede causar toxicidad, malformaciones, inhibición significativa del crecimiento e incluso la muerte del explante (Abreu *et al.*, 2016; Amissah *et al.*, 2016). De acuerdo con los resultados obtenidos y lo mencionado por Kumar *et al.* (2014); Spinoso-Castillo *et al.* (2017), el empleo de NPsAg en el cultivo *in vitro* de tejidos vegetales ejerce un efecto antimicrobiano y estimulador del crecimiento, sin representar algún riesgo nocivo.

## Identificación de agentes contaminantes

Los agentes fúngicos que se observaron invadiendo los explantes de filodendro en el primer experimento reportado en esta investigación fueron *Aspergillus* sp. y *Penicillium* sp. (Figura 6). Éstos son hongos filamentosos importantes por su adaptabilidad a diversos hábitats como suelos, agua, materia orgánica, tejidos de plantas, productos vegetales en poscosecha en fresco y seco. Además, estos microorganismos se han reportado como contaminantes frecuentes en el cultivo de tejidos *in vitro* y les han llamado vitro patógenos (Capó, 2000; Pedroza-Manrique y Montes-Villegas, 2008), cuyo crecimiento es indeseable por cubrir por completo los explantes y causar su muerte.

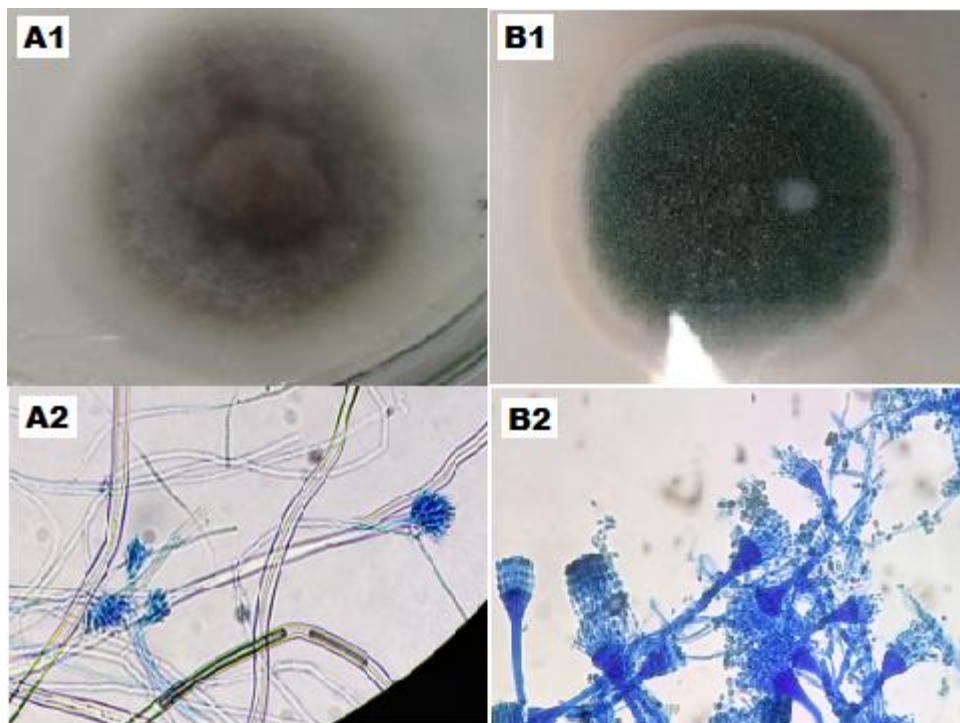


Figura 6. A1: *Aspergillus* sp. en medio PDA, A2: hifas y conidióforos con cabeza en forma radial característico de *Aspergillus* sp. (40X), B1: *Penicillium* sp. en medio PDA, B2: conidióforos en forma de pincel característicos de *Penicillium* sp. 40X.

Como resultado de la siembra del cultivo puro inicialmente identificado como bacteriano en los medios PDA, PDA con ácido láctico y EMB, a las 24; 48 y 72 horas,

se observó que todos formaron colonias con morfología similar, de color blanquecino mate, aspecto cremoso y de consistencia mucosa, idéntico al cultivo puro inicial. Las rodajas de papa inoculadas no presentaron diferencia alguna con el testigo (sin inocular), únicamente se observó la oxidación del tejido donde se realizó el rayado, aún después de siete días de inoculación. La interpretación de los resultados indica que los agentes contaminantes correspondieron a levaduras. Estos resultados concuerdan con Guevara-Vázquez *et al.* (2009), quienes obtuvieron colonias con características semejantes en medio PDA, al realizar aislamientos e identificación de levaduras asociadas al huitlacoche (*U. maydis*) en mazorcas de maíz que fueron observadas ejerciendo antagonismo sobre el fitopatógeno e identificadas como *Pichia* sp. y *Candida* sp.

Además de ser catalogados como *in vitro* patógenos principales, las levaduras en conjunto con hongos y bacterias, habitan diferentes nichos como, suelo, agua, ambientes cerrados y abiertos, raíces, tallos, hojas, flores, frutos, insectos y algunos están directamente relacionadas con los humanos; esto explica ampliamente la alta probabilidad de la presencia de levaduras en los cultivos *in vitro*, principalmente cuando se realiza el establecimiento del cultivo aséptico (Capó, 2000; Mng'omba *et al.*, 2012). La presencia de levaduras en los medios de cultivo no afectó el crecimiento de los explantes de filodendro, pues se observó un crecimiento vigoroso con formación de brotes.

Los hongos filamentosos no dañaron el tejido vegetal directamente, pero al estar presentes dentro del recipiente de cultivo invadieron por completo el medio de cultivo y los explantes. Algunas investigaciones reportan el desarrollo de enfermedades en plantas de la familia Araceae en distintas etapas de crecimiento cuyos agentes causales han sido bacterias principalmente (Moya-Hernández *et al.*, 2015; Sánchez *et al.*, 2015; Ramírez-Rojas *et al.*, 2016), lo cual puede explicar la frecuencia con que se les encuentra creciendo *in vitro*; no obstante, en esta investigación las bacterias no fueron contaminantes probablemente por la eficiencia de la aplicación de los bactericidas a las plantas madre donadoras de explantes.

## CONCLUSIONES

La aplicación de bactericidas y fungicidas como pretratamiento a las plantas madre no fue suficiente para obtener el cultivo *in vitro* aséptico de filodendro al 100%, se tuvo contaminación por *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp. y por levaduras; sin embargo, controlaron totalmente la incidencia de bacterias.

El tratamiento de plantas madre de filodendro con Agry Gent Plus 5000<sup>®</sup> + Prozyca<sup>®</sup> y la adición de NPsAg al medio de cultivo durante siete días, permitió obtener explantes totalmente libres de contaminantes; así mismo, permitió generar un protocolo para el establecimiento del cultivo aséptico de esta especie. El uso de NPsAg evitó la contaminación de explantes de filodendro con hongos.

## LITERATURA CITADA

- Abdi, G.; H. Salehi; M. Khosh-Khui. 2008. Nanosilver: A novel nanomaterial for removal of bacterial contaminants in valerian (*Valeriana officinalis* L.) tissue culture. *Acta Physiologiae Plantarum* 30: 709-714.
- Abreu, E.; M. Sosa C.; G. Ascunce S.; G. González. 2016. Efecto de antibióticos en la propagación *in vitro* de *Agave fourcroydes* Lem. *Bioteología Vegetal* 16: 31-36.
- Acebey, A. y T. Krömer. 2008. Diversidad y distribución de *Araceae* de la Reserva de la Biosfera de los Tuxtlas Veracruz, México. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 79: 465-471.
- Amissah, S.; P. Coleman; H. Sintim; R. Akromah. 2016. *In vitro* control of microbial contamination of sweet potatoes cultured with nodal explants. *Annual Research & Review in Biology* 9: 1-8.
- Azofeifa-Bolaños, J. B.; G. Rivera-Coto; A. Paniagua-Vásquez; R. Cordero-Solórzano; E. Salas-Alvarado. 2019. Efecto de la desinfección de segmentos nodales sobre

el rendimiento morfogénico de vitroplantas de *Vanilla planifolia* Andrews. *Agronomía Mesoamericana* 30: 1-17.

Bandyopadhyay, T. K.; M. Bandyopadhyay; J. A. Teixeira da S.; Santanu P.; Anandamoy D.; P. D. Ghosh. 2011. An efficient micropropagation protocol to control abnormality in long-term shoot cultures of *Spathiphyllum floribundum* (L.) 'Petite'. *Floriculture and Ornamental Biotechnology* 5: 57-63.

Blanco, M. y R. Valverde 2004. Micropropagación de *Philodendron* sp. (Posiblemente *P. corcovadense*). *Agronomía Costarricense* 28: 39-46.

Boyce, P. C. and T. B. Croat. 2014. The Überlist of Araceae: totals for published and estimated number of species in aroid genera. <http://www.aroid.org/genera/140601uberlist.pdf>. Fecha de acceso: 20-noviembre-2017.

Capó, Y. A. 2000. Control y prevención de la contaminación microbiana en la micropropagación de plantas. *Revista CENIC Ciencias Biológicas* 31: 87-91.

Chen, W. L. and D. M. Yeh. 2007. Elimination of *in vitro* contamination, shoot multiplication, and *ex vitro* rooting of *Aglaonema*. *HortScience* 42: 629-632.

Chen, F. C.; C. Y. Wang; J. Y. Fang. 2012. Micropropagation of self-heading *Philodendron* via direct shoot regeneration. *Scientia Horticulturae* 141: 23-29.

Guevara-Vázquez, E.; E. Valadez-Moctezuma; M. Acosta-Ramos; T. Espinosa-Solares; C. Villanueva-Verduzco. 2009. Identificación de levaduras asociadas al huitlacoche. *Revista Chapingo Serie Horticultura* 15: 225-230.

Kumar, S. S.; Melchias G.; Ravikumar P.; Kumaravel P.; Chandrasekar R. 2014. Biogenic silver nanoparticles synthesized with mediation by *Euphorbia hirta* enhance seed germination and eliminate microbial contamination. *World journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* 3: 784-794.

Mariani, T. S.; A. Fitriani; J. A. Teixeira da S.; A. Wicaksono; T. Fatt C. 2011. Micropropagation of *Aglaonema* using axillary shoot explants. *International Journal of Basic & Applied Sciences* 11: 46-53.

- McConnell, D. B.; Chen J.; K. C. Everitt. 2003. Cultural Guidelines for Commercial Production of Interiorscape *Philodendron*. University of Florida. <http://edis.ifas.ufl.edu>. Fecha de acceso: 15-enero-2018.
- Mng'omba, S. A.; G. Sileshi; E. S. du Toit; F. K. Akinnifesi. 2012. Efficacy and Utilization of fungicides and other antibiotics for aseptic plant cultures. pp. 245-254. *In*: Thajuddin, N. y Annamalai, P. S. (Eds.) Fungicides for plant and animal diseases. InTech, Rijeka.
- Moya-Hernández, S. L.; M. L. Rodríguez-Mejía; M. Espinosa-Mendoza. 2015. *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* causante de manchas foliares del filodendro (*Philodendron scadens* subsp. *oxycardium*) en Cuautla, Morelos, México. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 6: 391-397.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473-497.
- Pedroza-Manrique, J. A. y M. V. Montes-Villegas. 2008. Micropropagación de *Hypericum goyanesii*, una especie en vía de extinción. *Revista Científica* 10: 109-118.
- Ramírez-Rojas, S.; F. J. Osuna-Canizalez; F. García-Pérez; J. Canul-Ku; A. Palacios-Talavera. 2016. Identificación molecular de bacterias asociadas a plantas ornamentales producidas *in vitro*. *Revista Mexicana de Fitopatología* 34: 173-183.
- Rout, G. R.; A. Mohapatra; S. M. Jain. 2006. Tissue culture of ornamental pot plant: A critical review on present scenario and future prospects. *Biotechnology Advances* 24: 531-560.
- Sánchez, G. Y.; T. Yadenys; A. Robaina; M. Bauta; A. Rayas; A. Santos; M. Basail; J. López; V. Mederos; Y. Beovides; D. Rodríguez. 2015. Incidencia de contaminantes microbianos en la propagación *in vitro* de *Xathosoma* spp. clon 'INIVIT MX-2007' y *Colocasia esculenta* (L.) Schott. clon 'INIVIT MC-2012'. *Bioteconología Vegetal* 15: 57-61.



- Spinoso-Castillo, J. L.; R. A. Chavez-Santoscoy; N. Bogdanchikova; J. A. Pérez-Sato; V. Morales-Ramos; J. J. Bello-Bello. 2017. Antimicrobial and hormetic effects of silver nanoparticles on *in vitro* regeneration of vanilla (*Vanilla planifolia* Jacks. Ex Andrews) using a temporary immersion system. *Plant Cell Tissue Organ Culture* 129: 195–207.
- Steiner, A. A. 1984. The universal nutrient solution. International Congress on Soilless Culture. Lunteren. 633-649.
- Turina, C. A. y Bima, 2017. Establecimiento *in vitro* de cuatro variedades de olivo cultivadas a campo (*Olea europea* L.). *Agriscientia* 34: 59-68.
- Villamizar-Gallardo, R.; F. O. Cruz J.; O. O. Ortiz-Rodríguez. 2016. Fungicidal effect of silver nanoparticles on toxigenic fungi in cocoa. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira* 51: 1929-1936.

## **CAPÍTULO 2. EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE BENCILADENINA EN LA MULTIPLICACIÓN *IN VITRO* DE FILODENDRO XANADU**

Moisés Lara-Ascencio<sup>1</sup>, María Andrade-Rodríguez<sup>1\*</sup>, Héctor Sotelo-Nava<sup>1</sup>, Oscar Gabriel Villegas-Torres<sup>1</sup>, Dagoberto Guillén-Sánchez<sup>1</sup>, Porfirio Juárez-López<sup>1</sup>, Teresa de Jesús Rodríguez-Rojas<sup>1</sup>, José Luis Viveros-Ceballos<sup>2</sup>.

<sup>1</sup>Posgrado en Ciencias Agropecuarias y Desarrollo Rural. Facultad de Ciencias Agropecuarias. <sup>2</sup>Centro de Investigaciones Químicas. Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Av. Universidad 1001. 62209. Col. Chamilpa, Cuernavaca, Morelos. México.

\*Autor para correspondencia: maria.andrade@uaem.mx

### **RESUMEN**

La propagación convencional de filodendros resulta incosteable para satisfacer la alta demanda de estas especies, por lo que resulta necesario implementar otros métodos de propagación más eficientes como el cultivo *in vitro*, ya que mediante esta técnica es posible obtener altos volúmenes de plantas en periodos de tiempo cortos. Para inducir la multiplicación de las plantas *in vitro* es necesario adicionar al medio de cultivo citocininas como la 6-benciladenina (BA) las cuales inducen la formación de yemas y la multiplicación celular. La investigación tuvo como objetivo evaluar el efecto de la concentración de la (BA) para promover la multiplicación de brotes de filodendro xanadu a partir de explantes de meristemas apicales. Para este estudio se montaron dos experimentos independientes y en condiciones semejantes, el segundo experimento se estableció una vez concluido el primero. Se utilizaron plántulas de filodendro xanadu en condiciones *in vitro*, para el segundo establecimiento se utilizaron plantas con una base del tallo mayor. Se evaluaron ocho concentraciones de (BA) para propiciar la brotación de los explantes en el medio de cultivo Murashige y Skoog (1962) bajo un diseño completamente al azar. Al comparar la eficacia de las concentraciones

de BA (63 días) y contrastar los resultados de los experimentos, la concentración de 3 mg L<sup>-1</sup> de BA resultó la más apropiada para la regeneración directa de brotes pues en ambos casos generó un 100 % de brotación, con brotes de tamaño uniforme y bien diferenciados respecto de las demás concentraciones de BA utilizadas. Los explantes de filodendro xanadu con mayor grosor de tallo producen brotes de mejores características y en mayor cantidad en la etapa de multiplicación.

**Palabras clave:** Multiplicación, citocininas, organogénesis.

### SUMMARY

The conventional propagation of philodendrons is unaffordable to satisfy the high demand for these species, so it is necessary to implement other more efficient propagation methods such as *in vitro* culture, since through this technique it is possible to obtain high volumes of plants in periods of time short. To induce the multiplication of plants *in vitro*, it is necessary to add cytokinins such as 6-benzyladenine (BA) to the culture medium, which induce bud formation and cell multiplication. The objective of the research was to evaluate the effect of the concentration of the (BA) to promote the multiplication of shoots of philodendron xanadu from explants of apical meristems. For this study, two independent experiments were set up and under similar conditions, the second experiment was established after the first one was completed. Philodendron xanadu seedlings were used under *in vitro* conditions, for the second establishment plants with a larger stem base were used. Eight concentrations of (BA) were evaluated to promote the sprouting of the explants in culture medium Murashige and Skoog (1962) under a completely random design. When comparing the efficacy of the BA concentrations (63 days) and contrasting the results of the experiments, the concentration of 3 mg L<sup>-1</sup> of BA was the most appropriate for the direct regeneration of shoots since in both cases it generated 100 % of sprouting with shoots of uniform size and well differentiated from the other concentrations of BA used. Philodendron xanadu

explants with greater stem thickness produce shoots with better characteristics and in greater quantity in the multiplication stage.

**Key words:** Multiplication, cytokinins, organogénesis.

## INTRODUCCIÓN

El filodendro xanadu, es una de las especies ornamentales de follaje más importantes. El precio de venta en México varió de 0.44 a 0.56 dólares en etapa de plántula en contenedores de 72, 98 y 128 cavidades; mientras que la planta en maceta oscila entre los 1.8 a 6.2 dólares, de acuerdo con los puntos de venta y tamaño de la planta (AKIKO, 2020; FLORAMUNDO, 2020).

La propagación convencional de filodendros mediante esquejes de tallos y semillas es lenta, inconsistente e insuficiente para satisfacer la demanda que exige el mercado de plantas de este género. Lo anterior se debe al corto tiempo de vida de las semillas, lento crecimiento de las plantas, entrenudos cortos, tallos y hojas grandes característicos de la mayoría de las especies de este género (Safwat *et al.*, 2014). Con base en esto, es necesario buscar métodos de multiplicación alternativos que permitan producir la cantidad de plantas que el mercado necesita. La propagación *in vitro* es un método de propagación ampliamente utilizado para la propagación de varias ornamentales incluidas los filodendros, ya que facilita la generación masiva de alta calidad y homogeneidad de los materiales durante períodos de tiempo relativamente cortos (Alawaadh *et al.*, 2020).

Para inducir la multiplicación de plantas *in vitro* se han usado varios tipos de reguladores del crecimiento como las citocininas, principalmente la benciladenina, kinetina, el tidiazurón y la 2-isopentil adenina (Chen *et al.*, 2012; Thi Thu *et al.*, 2013; El-Shamy, 2015; Kaviani *et al.*, 2019; Rezaei y Jowkar, 2018; Alawaadh *et al.*, 2020) y para algunas especies de filodendro se han reportado medios de cultivo combinados

con auxinas como el ácido 3-indol butírico y el ácido naftalenacético (Thi Thu *et al.*, 2013; Alawaadh *et al.*, 2020).

La citocininas son un grupo de reguladores del crecimiento que inducen la formación de yemas y la multiplicación celular. La mayoría de las citocininas son derivados de la adenina (aminopurina) como la BA (6-benciladenina) y kinetina (N6-furfuriladenina). Estas tienen un papel esencial en la inducción y la regeneración en la mayoría de las especies de plantas y también pueden estimular la división celular (Chen y Yeh, 2007; Yeh *et al.*, 2007).

Por lo tanto, el cultivo *in vitro* de tejidos vegetales es una herramienta eficaz y segura para satisfacer la demanda de estas especies. Al respecto existen algunas investigaciones que han estudiado la propagación *in vitro* de varias especies de filodendro, los resultados obtenidos en la fase de multiplicación de filodendros con la adición de 2.5 a 3.0 mg L<sup>-1</sup> de benciladenina al medio de cultivo han sido reportados como adecuados (Gangopadhyay *et al.*, 2004; Jirakiattikul y Limpradithanont, 2006; Chen *et al.*, 2012).

El éxito en la regeneración y propagación *in vitro* dependen de cada una de las fases del cultivo *in vitro*, en las cuales se deben seguir estrictos métodos y utilizar compuestos adecuados para la preparación del medio de cultivo; de aquí que, el objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto de la concentración de benciladenina en la multiplicación de brotes axilares de filodendro xanadu, con el fin de determinar la concentración más adecuada para la propagación eficiente.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

La investigación se llevó a cabo en el laboratorio de micropropagación de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos, en Cuernavaca, Morelos, México.

Se efectuaron dos experimentos, bajo las mismas condiciones de medio de cultivo; el segundo experimento se estableció una vez concluido el primero y se realizó una selección de explantes más estricta en cuanto a características físicas.

Para el primer experimento se utilizaron plántulas de filodendro xanadu cultivadas *in vitro*, con longitud de  $20 \pm 2$  mm y base del tallo de 2 a 3 mm, con tres hojas, sin brotes y sin raíces. Para el segundo, se emplearon plantas con las características semejantes a las empleadas en el primer experimento, pero con base del tallo de  $5 \pm 1$  mm.

Se preparó el medio de cultivo MS (Murashige y Skoog, 1962) suplementado con 3 % de sacarosa, tiamina, glicina, piridoxina, ácido nicotínico ( $0.5 \text{ mg L}^{-1}$ ) e inositol ( $100 \text{ mg L}^{-1}$ ); el pH se ajustó a 5.7. Como agente gelificante se usaron  $7.5 \text{ g L}^{-1}$  de agar Merck®. Se prepararon ocho medios de cultivo con concentración variable de Benciladenina (0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5,  $4.0 \text{ mg L}^{-1}$ ). Se utilizaron frascos de 100 mL de capacidad con 20 mL de medio de cultivo, el cual se esterilizó durante 18 min en autoclave vertical a  $1.2 \text{ kg cm}^{-2}$  y  $120 \text{ }^\circ\text{C}$ .

Los experimentos se establecieron en una cámara de crecimiento a una temperatura de  $28 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ , fotoperiodo de 16 horas de iluminación y 8 de oscuridad, intensidad luminosa de  $32 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ , por 63 días.

Se estudiaron nueve tratamientos con nueve repeticiones en un diseño experimental completamente al azar. La unidad experimental fue un frasco de 100 mL con 20 mL de medio de cultivo y cinco explantes por frasco.

Transcurridos 63 días después del establecimiento de los experimentos, se evaluó el porcentaje de explantes que produjeron brotes, número de brotes generados a partir de cada explante, número de raíces por explante, número de hojas por brote y la altura de brotes (desde la base hasta la parte superior, con hoja milimétrica).

Los datos de los experimentos se estudiaron mediante análisis de varianza (ANOVA) y se realizó la prueba de comparación de medias DMS ( $P \leq 0.05$ ), con el paquete estadístico SAS System versión 9.0.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El análisis de varianza indicó diferencias altamente significativas ( $P \leq 0.01$ ) para las cinco variables evaluadas en ambos establecimientos de brotes para su multiplicación, debidas al efecto de la concentración de benciladenina (BA) en el medio de cultivo (Cuadro 1). En el segundo experimento, se tuvo un mejor ajuste del modelo estadístico y menor coeficiente de variación en las variables, en comparación con los resultados del primer experimento, lo que indica un manejo más cuidadoso.

**Cuadro 1. Cuadrados medios y parámetros estadísticos del ANOVA para multiplicación de brotes y variables del crecimiento de filodendro xanadu, por efecto de Benciladenina.**

| Fuentes de variación    | gl | Explantos con brotes (%) | Brotes por explante (Núm.) | Raíces por explante (Núm.) | Hojas por brote (Núm.) | Altura de brotes (mm) |
|-------------------------|----|--------------------------|----------------------------|----------------------------|------------------------|-----------------------|
| Primer establecimiento  |    |                          |                            |                            |                        |                       |
| Benciladenina           | 8  | 80.187**                 | 0.183**                    | 0.280**                    | 1.076**                | 36.222**              |
| Error exp.              | 72 | 4.571                    | 0.003                      | 0.005                      | 0.039                  | 0.979                 |
| C.V. (%)                |    | 39.7                     | 6.5                        | 7.5                        | 3.22                   | 7.67                  |
| R <sup>2</sup>          |    | 0.66                     | 0.84                       | 0.86                       | 0.75                   | 0.80                  |
| Segundo establecimiento |    |                          |                            |                            |                        |                       |
| Benciladenina           | 8  | 47.9**                   | 0.99**                     | 0.80**                     | 0.14**                 | 2.54**                |
| Error exp.              | 72 | 0.02                     | 0.01                       | 0.004                      | 0.001                  | 0.007                 |
| C.V. (%)                |    | 1.7                      | 3.6                        | 7.0                        | 1.7                    | 2.29                  |
| R <sup>2</sup>          |    | 0.99                     | 0.98                       | 0.97                       | 0.95                   | 0.98                  |

gl: grados de libertad, C.V.: coeficiente de variación, R<sup>2</sup>: coeficiente de determinación, \*\*: efecto altamente significativo ( $P \leq 0.01$ ).

### Primer establecimiento

Todos los explantes establecidos en el medio de cultivo suplementado con 3 mg L<sup>-1</sup> de BA generaron brotes, seguido de aquellos cultivados en el medio de cultivo con 4 mg L<sup>-1</sup> de BA (66.67 %); en contraste, en el medio de cultivo con 0.5 mg L<sup>-1</sup> de BA hubo menor cantidad de explantes con brotes (4.44 %); en el medio de cultivo sin BA, los explantes no formaron nuevos brotes (Cuadro 2).

Con respecto al número de brotes por explante, la mayor cantidad de brotes ocurrió en el medio de cultivo con 3 mg L<sup>-1</sup> de BA (1.02 brotes), seguido por los brotes formados en los medios suplementados con 3.5 y 4 mg L<sup>-1</sup> de BA (0.66 y 0.77 brotes, respectivamente); el menor número de brotes por explante ocurrió en el medio suplementado con 0.5 mg L<sup>-1</sup> de BA (0.08 brotes) (Cuadro 2).

**Cuadro 2. Respuesta de explantes de filodendro xanadu establecidos en medio de cultivo MS, suplementado con Benciladenina en el primer experimento.**

| Benciladenina (mg L <sup>-1</sup> ) | Explantes con brotes (%) | Brotes por explante (Núm.) | Raíces por explante (Núm.) | Hojas por brote (Núm.) | Altura de brotes (mm) |
|-------------------------------------|--------------------------|----------------------------|----------------------------|------------------------|-----------------------|
| 0                                   | 0.0 e                    | 0.0 f                      | 1.55 a                     | 6.00 d                 | 16.26 a               |
| 0.5                                 | 4.44 e                   | 0.08 f                     | 0.84 b                     | 6.57 d                 | 16.00 a               |
| 1.0                                 | 24.44 d                  | 0.22 e                     | 0.42 c                     | 5.57 e                 | 12.91 c               |
| 1.5                                 | 37.78 cd                 | 0.37 cd                    | 0.53 c                     | 6.24 c                 | 13.00 c               |
| 2.0                                 | 31.11 d                  | 0.31 d                     | 0.35 c                     | 5.53 e                 | 11.13 de              |
| 2.5                                 | 48.89 bc                 | 0.48 c                     | 0.26 d                     | 6.37 c                 | 10.82 e               |
| 3.0                                 | 100.0 a                  | 1.02 a                     | 0.28 d                     | 6.66 a                 | 14.82 b               |
| 3.5                                 | 51.11 bc                 | 0.66 b                     | 0.22 d                     | 6.62 ab                | 11.17 de              |
| 4.0                                 | 66.67 ab                 | 0.77 b                     | 0.11 e                     | 6.4 bc                 | 11.95 cd              |
| DMS(P ≤ 0.05)                       | 2.0                      | 0.05                       | 0.06                       | 0.018                  | 0.93                  |

DMS: Diferencia mínima significativa, Medias con letras iguales en una columna, no son estadísticamente diferentes de acuerdo con la prueba LSD (P ≤ 0.05).



Aunque el medio de cultivo no contenía auxinas, hubo formación de raíces. El medio de cultivo sin BA fue el que generó el mayor número de raíces por explante (1.55 raíces), seguido del medio de cultivo suplementado con  $0.5 \text{ mg L}^{-1}$  de BA (0.84 raíces). Por el contrario, el menor número de raíces ocurrió en explantes cultivados en el medio con mayor concentración de BA que fue  $4 \text{ mg L}^{-1}$  de BA (0.11 raíces) (Cuadro 2).

El número de hojas por brote fue mayor en el medio suplementado con  $3 \text{ mg L}^{-1}$  de BA (6.66 hojas), seguido del medio suplementado con  $3.5 \text{ mg L}^{-1}$  de BA (6.62 hojas). El menor número de hojas ocurrió en los medios de cultivo suplementados con 1 y  $2 \text{ mg L}^{-1}$  de BA (5.57 y 5.53 hojas respectivamente) (Cuadro 2). Los explantes que fueron establecidos en el medio desprovisto de BA y aquellos suplementados con  $0.5 \text{ mg L}^{-1}$  de BA presentaron la mayor altura (16.26 y 16.0 mm respectivamente), seguidos por aquellos explantes establecidos en el medio de cultivo con  $3 \text{ mg L}^{-1}$  de BA (14.82 mm). Los explantes establecidos en el medio de cultivo con  $2.5 \text{ mg L}^{-1}$  de BA fueron los de menor altura (10.82 mm) (Cuadro 2).

### **Segundo establecimiento**

En este caso, se observó que todos los explantes establecidos en los medios de cultivo suplementados con 1 a  $4 \text{ mg L}^{-1}$  de BA generaron brotes, en tanto que, cuando se usó el medio de cultivo con  $0.5 \text{ mg L}^{-1}$  de BA, hubo respuesta en el 96 % de los explantes. En contraste, cuando no se adicionó citocinina al medio de cultivo, no hubo formación de brotes (Cuadro 3).

La concentración de citocinina también afectó el número de brotes por explante; como se observa en el cuadro 3, al aumentar la concentración de  $0.5$  a  $3.0 \text{ mg L}^{-1}$  de BA, también aumentaron los brotes formados, pero al usar más BA, la cantidad de brotes fue un poco menor, de ahí que, el mayor número de brotes por explante ocurrió en el medio de cultivo con  $3 \text{ mg L}^{-1}$  de BA (4.32 brotes), seguido de los medios de cultivo suplementados con  $2.5 \text{ mg L}^{-1}$  de BA (3.8 brotes). El menor número de brotes por explante ocurrió en el medio suplementado con  $0.5 \text{ mg L}^{-1}$  de BA (Figura 1).

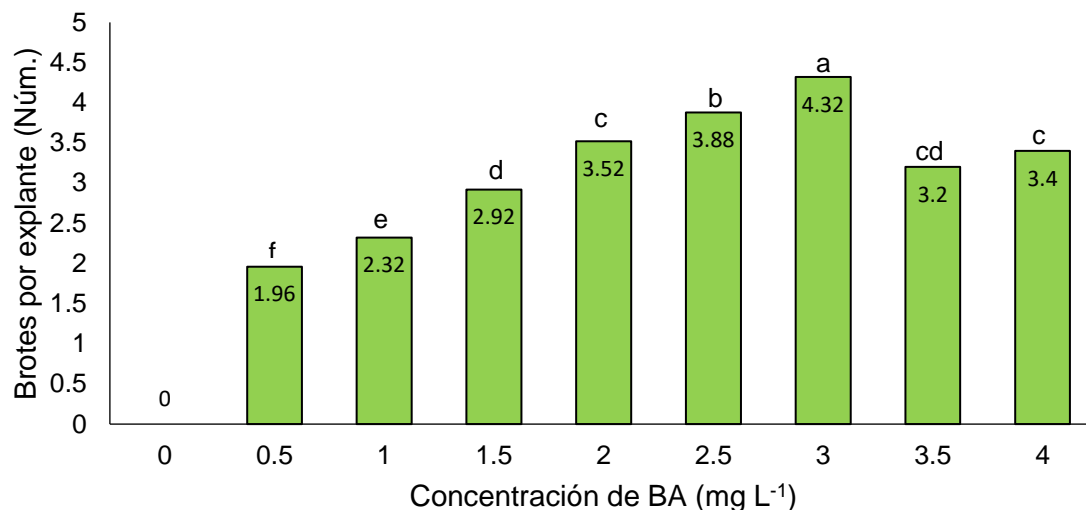


Figura 1. Producción de brotes por explante por efecto de la concentración de Benciladenina. DMS=0.08.

**Cuadro 3. Respuesta de explantes de filodendro xanadu establecidos en medio de cultivo MS, suplementado con Benciladenina, en el segundo experimento.**

| Benciladenina (mg L <sup>-1</sup> ) | Explantes con brotes (%) | Raíces por explante (Núm.) | Hojas por brote (Núm.) | Altura de brotes (mm) |
|-------------------------------------|--------------------------|----------------------------|------------------------|-----------------------|
| 0                                   | 0 c                      | 2.64 a                     | 6.36 a                 | 31.28 a               |
| 0.5                                 | 96 b                     | 1.80 b                     | 5.06 b                 | 16.08 b               |
| 1.0                                 | 100 a                    | 0.40 c                     | 3.57 f                 | 12.55 cd              |
| 1.5                                 | 100 a                    | 0.36 c                     | 4.86 bc                | 13.19 c               |
| 2.0                                 | 100 a                    | 0 d                        | 4.31 d                 | 12.26 de              |
| 2.5                                 | 100 a                    | 0 d                        | 4.18 de                | 12.24 de              |
| 3.0                                 | 100 a                    | 0 d                        | 3.98 e                 | 10.31 f               |
| 3.5                                 | 100 a                    | 0 d                        | 4.86 bc                | 11.54 e               |
| 4.0                                 | 100 a                    | 0 d                        | 4.81 c                 | 11.66 e               |
| DMS(P ≤ 0.05)                       | 0.20                     | 0.08                       | 0.04                   | 0.11                  |

DMS: Diferencia mínima significativa, Medias con letras iguales en una columna, no son estadísticamente diferentes de acuerdo con la prueba LSD (P ≤ 0.05).

Se observó que hubo formación de raíces en los explantes; el mayor número de raíces se formó en el medio de cultivo sin BA (2.64 raíces), seguido del medio suplementado con 0.5 mg L<sup>-1</sup> de BA (1.8 raíces). El menor número de raíces ocurrió en explantes cultivados en los medios de cultivos suplementados con 1 y 1.5 mg L<sup>-1</sup> de BA; mientras que, los explantes establecidos en los medios de cultivo con 2 a 4 mg L<sup>-1</sup> de BA no produjeron raíces, como ocurre en la mayoría de los casos donde se utiliza medio de cultivo con citocininas (Chen *et al.*, 2012; Thi Thu *et al.*, 2013; Alawaadh *et al.*, 2020).

Las citocininas además de afectar la formación de brotes, también tienen efecto en las características de éstos. En este caso, el mayor número de hojas por explante ocurrió en el medio de cultivo desprovisto de BA (6.36 hojas), esto se debe probablemente a que los explantes establecidos en este medio no formaron brotes y por lo tanto sólo ocurrió crecimiento de los brotes usados como explante. Esta respuesta fue seguida por la observada en los explantes del medio de cultivo en el cual se usaron 0.5 mg L<sup>-1</sup> de BA (5.06 hojas). El menor número de hojas ocurrió en los explantes cultivados en el medio suplementado con 1 mg L<sup>-1</sup> de BA (3.57 hojas).

Con respecto a la altura de los brotes por efecto de la cantidad de citocininas, se encontró que la mayor altura se presentó en los brotes que fueron establecidos en el medio desprovisto de BA (31.28 mm), seguido de los brotes cultivados en el medio suplementado con 0.5 mg L<sup>-1</sup> de BA (16.08 mm). En contraste, los brotes de menor altura fueron aquellos en los cuales se usó el medio de cultivo con 3 mg L<sup>-1</sup> de BA (10.31 mm).

La suplementación del medio de cultivo aún con la menor cantidad de BA (0.5 mg L<sup>-1</sup>) promovió la brotación de explantes de filodendro xanadu en la fase de multiplicación. Tanto en el primero como en el segundo establecimiento, la adición de 3 mg L<sup>-1</sup> de BA al medio de cultivo resultó la cantidad más adecuada para la obtención de un mayor número de brotes; sin embargo, los resultados obtenidos en cada establecimiento fueron variables debido a las características de los explantes empleados, pues se observó que los explantes que producen brotes de mejores características y en mayor cantidad en la etapa de multiplicación fueron aquellos de mayor grosor de tallo, pues es probable que tengan mayor cantidad de reservas (Figura 2).



Figura 2. Multiplicación de brotes de filodendro xanadu en medio de cultivo MS suplementado con benciladenina. a) 2, b) 2.5, c) 3 y d) 3.5 mg L<sup>-1</sup>.

Respecto al efecto de las citocininas en la multiplicación de filodendro, algunos investigadores reportan resultados parcialmente semejantes a los obtenidos en esta investigación. Thi Thu *et al.* (2013), cultivaron explantes de yemas apicales de filodendro xanadu en medio MS que contenía BA o kinetina y encontraron que el medio suplementado con 4 mg L<sup>-1</sup> de BA fue óptimo para la multiplicación de brotes (5 brotes). Los investigadores también evaluaron el efecto de la combinación de citocinas con las auxinas ácido indol acético (AIA) y ácido 3-indolbutírico (AIB) en la multiplicación de brotes y observaron que la adición de las auxinas AIA o AIB no aumentó la tasa de multiplicación.

Por su parte Alawaadh *et al.* (2020) en estudios realizados para la micropropagación de *Philodendron bipinnatifidum* a partir de brotes axilares en medio MS, encontraron que la adición de 1 mg L<sup>-1</sup> de BA aumentó significativamente la multiplicación de brotes (6 brotes por explante) en comparación con otras citoquininas, y la combinación de citoquininas y auxinas ácido 3-indolbutírico (AIB) y ácido naftalenacético (ANA) produjo más brotes que las citoquininas solas. Así, 1 mg L<sup>-1</sup> de BA y 0.5 mg L<sup>-1</sup> de AIB produjeron un mayor número de brotes por explante (10.9 brotes).

El-Shamy (2015), realizó una investigación de propagación masiva de *Philodendron bipinnatifidum* para lo cual adicionó BA y kinetina al medio de cultivo, observaron que usar 3 mg L<sup>-1</sup> de BA fue más efectiva que la kinetina para la multiplicación de brotes a partir de explantes de meristemos apicales. Chen *et al.* (2012) compararon la eficacia de diferentes citoquininas en tres cultivares comerciales de filodendro para inducir la proliferación de brotes, describen que 0.5 y 1 mg L<sup>-1</sup> de BA fueron adecuadas para la formación de brotes (40.8 a 50.4 brotes respectivamente) y que éstos fueron de mejores características que los brotes producidos en medios de cultivo suplementados con kinetina y tidiazurón.

Por otro lado, Hassan *et al.* (2016) reportan que en *Philodendron selloum*, el medio MS suplementado con 8 mg L<sup>-1</sup> de BA y 0.4 mg L<sup>-1</sup> de ácido naftalen acético se observó un aumento significativo para todos los parámetros de crecimiento (número de brotes por explante, longitud de los brotes y número de hojas). Los resultados obtenidos en este estudio, así como lo mencionado en otras investigaciones indican que la benciladenina es la citocinina más adecuada para inducir la multiplicación de brotes de filodendro xanadu y otras especies del género *Philodendron*.

## CONCLUSIONES

El medio de cultivo MS suplementado con 3 mg L<sup>-1</sup> de benciladenina es el más adecuado para la multiplicación de brotes de filodendro xanadu, porque los explantes producen mayor número de brotes.

La tasa de multiplicación de brotes de filodendro xanadu varía en función del tamaño y vigor de los explantes utilizados, los brotes con 15 mm de altura y  $5\pm 1$  mm de diámetro en la base fueron los explantes más adecuados.

## LITERATURA CITADA

AKIKO. 2020. [En línea]. <https://akiko.com.mx/productos/plantulas/>. Fecha de acceso: 6-mayo-2019.

Alawaadh, A. A.; Y. H. Dewir; M. S. Alwihibi; A. A. Aldubai; S. El-Hendawy; Y. Naidoo. 2020. Micropropagation of lacy tree Philodendron (*Philodendron bipinnatifidum* Schott ex Endl.). *HortScience* 55: 294–299.

Chen, W. L. and D. M. Yeh. 2007. Elimination of *in vitro* contamination, shoot multiplication, and *ex vitro* rooting of *Aglaonema*. *HortScience* 42: 629-632.

Chen, F. C.; C. Y. Wang; J. Y. Fang. 2012. Micropropagation of self-heading Philodendron via direct shoot regeneration. *Scientia Horticulturae* 141: 23-29.

El-Shamy, M. A. 2015. Studies on *Philodendron bipinnatifidum* to propagation by *in vitro* culture. *Journal of Biological, Chemical and Environmental Sciences* 10: 23-36.

FLORAMUNDO. 2020. [En línea] [https://vivero.floramundo.com.mx/index.php?route=product/product&product\\_id=348](https://vivero.floramundo.com.mx/index.php?route=product/product&product_id=348). Fecha de acceso: 6-mayo-2019.

Gangopadhyay, G.; T. Bandyopadhyay; S. B. Gangopadhyay; K. K. Mukherjee. 2004. Luffa sponge - a unique matrix for tissue culture of *Philodendron*. *Current Science*. 86: 315-319.

Hassan, H.; M. Ali; D. Soliman. 2016. Effect of low cost gelling agents and some growth regulators on micropropagation of *Philodendron selloum*. *Journal of Plant Production* 7: 169-176.

- Jirakiattikul, Y. and P. Limpraditthanont. 2006. Shoot multiplication and rooting of *Philodendron xanadu* cultured *in vitro*. *Songklanakarinn Journal Science Technology* 28: 79-86.
- Kaviani, B.; S. Shahram; R. Mohammad; M. Safari; R. Seddigh. 2018. Influence of plant growth regulators (BA, TDZ, 2-iP and NAA) on micropropagation of *Aglaonema widuri*. *Iranian Journal of Plant Physiology* 9: 2709-2718.
- Murashige, T. and F. Skoog 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473-497.
- Rezaei, B. O. and A. Jowkar 2018. Micropropagation of dwarf schefflera *Schefflera arboricola* (Hayata) Merr. via direct shoot regeneration. *Advances in Horticultural Sciences* 32: 205-212.
- Safwat, G.; Y. El-Sayed; G. S. F. El-Sharabasy; A. Amin. 2014. Assessment level for complex additives in the tissue culture media of philodendron red emerald plants. *International Journal of Agricultural Science and Research* 4: 155-164.
- Thị Thu, H. P.; N. H. Thanh; L. Thị Thùy; T. N. Thị; D.T. Thị Thanh; N. P. T. Thị. 2013. Nhân nhanh *in vitro* cây trầu bà cánh phượng (*Philodendron xanadu*). *Journal, Science & Development* 11: 826-832.
- Yeh, D. M.; W. Yang; F. Chang; M. Chung; W. Chen; H. Huang. 2007. Breeding and micropropagation of *Aglaonema*. *Acta Horticulturae* 755: 93–98.

### **CAPÍTULO 3. CRECIMIENTO *IN VITRO* DE FILODENDRO XANADU POR EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN Y RELACIÓN NUTRIMENTAL EN EL MEDIO DE CULTIVO**

Moisés Lara-Ascencio<sup>1</sup>, María Andrade-Rodríguez<sup>1\*</sup>, Héctor Sotelo-Nava<sup>1</sup>, Oscar Gabriel Villegas-Torres<sup>1</sup>, Dagoberto Guillén-Sánchez<sup>1</sup>, Porfirio Juárez-López<sup>1</sup>, Teresa de Jesús Rodríguez-Rojas<sup>1</sup>, José Luis Viveros-Ceballos<sup>2</sup>.

<sup>1</sup>Posgrado en Ciencias Agropecuarias y Desarrollo Rural. Facultad de Ciencias Agropecuarias. <sup>2</sup>Centro de Investigaciones Químicas. Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Av. Universidad 1001. 62209. Col. Chamilpa, Cuernavaca, Morelos. México.

\*Autor para correspondencia: maria.andrade@uaem.mx

#### **RESUMEN**

La propagación *in vitro* es importante para la multiplicación rápida de una amplia gama de especies, incluyendo las ornamentales y cualquier innovación relacionada con el medio de cultivo optimiza este método de propagación. Aunque el medio de cultivo es un factor clave, la composición mineral a menudo se pasa por alto durante el desarrollo de los protocolos de propagación *in vitro*. El objetivo de este trabajo fue determinar el medio de cultivo que promueva el mejor crecimiento de las plantas de filodendro xanadu *in vitro*. Se emplearon 11 medios de cultivo, nueve medios se generaron modificando la concentración de macro y micro nutrientes y la relación entre ellos tomando como base la metodología de Steiner (1984), los otros dos fueron medio Murashige y Skoog (1962; MS) al 100 y 50 % de concentración de macro y micronutrientes, que fueron estudiados en un diseño experimental completamente al azar con seis repeticiones; la evaluación se hizo a los 50 días después del establecimiento, se midieron variables morfológicas de los brotes y contenido de clorofila y carotenoides. La composición nutrimental afectó el potencial osmótico,



conductividad eléctrica y pH de los medios de cultivo y generó resultados variables en el crecimiento de las plantas. El medio de cultivo siete compuesto con macroelementos:  $\text{NO}_3^-$ , 14;  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ , 0.75;  $\text{SO}_4^{2-}$ , 5.25;  $\text{K}^+$ , 8.27;  $\text{Ca}^{2+}$ , 7 y  $\text{Mg}^{2+}$ , 4.73 ( $\text{me L}^{-1}$ ), microelementos: Fe, 5; B, 0.5; Mn, 0.5; Zn, 0.05; Cu, 0.045 y Mo, 0.01 ( $\text{me L}^{-1}$ ) y vitaminas del medio MS (1962), generó brotes con mayor altura (4.1 cm), con número de raíces (1.8) similar a lo obtenido con el medio de cultivo MS (2.03) , así como un adecuado número de hojas (8.3), acumulación de biomasa (8.8 mg) y mayor contenido relativo de clorofila (35.16 U. Spad), por lo que podría usarse para el cultivo *in vitro* de filodendro xanandu en producción comercial.

**Palabras clave:** Filodendro, medios de cultivo, concentración y relación nutrimental.

## SUMMARY

*In vitro* propagation is important for the rapid multiplication of a wide range of species, including ornamentals, and any innovation related to the culture medium optimizes this method of propagation. Although the culture medium is a key factor, the mineral composition is often overlooked during the development of *in vitro* propagation protocols. The objective of this work was to determine the culture medium that promotes the best growth of philodendron xanadu plants *in vitro*. Eleven culture media were used, nine of them were generated by modifying the concentration of macro and micro nutrients and the relationship between them, based on the methodology of Steiner (1984), the other two were Murashige and Skoog (1962; MS) medium. at 100 and 50 % concentration of macro and micronutrients, which were studied in a completely randomized experimental design with six replications; The evaluation was made 50 days after the establishment, morphological variables of the shoots and chlorophyll and carotenoid content were measured. The nutritional composition affected the osmotic potential, electrical conductivity and pH of the culture media and generated variable results in the growth of the plants. The culture medium consists of seven macroelements:  $\text{NO}_3^-$ , 14;  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ , 0.75;  $\text{SO}_4^{2-}$ , 5.25;  $\text{K}^+$ , 8.27;  $\text{Ca}^{2+}$ , 7 y  $\text{Mg}^{2+}$ , 4.73 ( $\text{me L}^{-1}$ ), microelements: Fe, 5; B, 0.5; Mn, 0.5; Zn, 0.05; Cu, 0.045 y Mo, 0.01 ( $\text{me L}^{-1}$ ) and vitamins of the MS medium (1962), generated shoots with greater height (4.1 cm),

with a number of roots (1.8) similar to that obtained with the MS (2.03) culture medium, as well as an adequate number of leaves (8.3), biomass accumulation (8.8 mg) and higher relative chlorophyll content (35.16 U. Spad), so it could be used for the *in vitro* cultivation of philodendron xanandu in commercial production.

**Key Words:** Philodendron, culture medium, concentration and nutritional relation.

## INTRODUCCIÓN

El filodendro es una de las especies ornamentales más importantes cultivadas en el estado de Morelos, donde se produce una amplia variedad de estas plantas, mismas que son utilizadas como elementos de ornato en casas y jardines; también se usan como follaje para complemento de arreglos florales (Moya-Hernández *et al.*, 2015). La propagación de plantas para cultivo en vivero generalmente se realiza mediante semillas, esquejes, estacas, hijuelos, entre otros; sin embargo, para la propagación de filodendro xanadu estos métodos de propagación resultan lentos e inconsistentes (Safwat *et al.*, 2014). El filodendro xanadu se propaga *in vitro* con éxito, al igual que otras especies de este género. Además, esta técnica de propagación vegetal ofrece provisión de plantas de alta calidad y sanidad con la periodicidad deseable (Ramírez-Rojas *et al.*, 2016; Alawaadh *et al.*, 2020).

La formulación del medio de cultivo adecuada es esencial para el éxito en la propagación *in vitro* dado que éste suministra los nutrientes necesarios (minerales, vitaminas, reguladores del crecimiento, entre otros) para el desarrollo apropiado de la planta; por lo que el medio debe prepararse con la cantidad de nutrientes necesaria para satisfacer los requerimientos de cada especie (Ibrahim *et al.*, 2008; Hameg *et al.*, 2018). El medio de cultivo MS (Murashige y Skoog, 1962), es el más utilizado porque ha generado buenos resultados para la micropropagación de diversas especies (George *et al.*, 2008), es considerado como un medio alto en sales (Bell *et al.*, 2009), por lo que su potencial osmótico es más negativo. La composición del medio de cultivo afecta la fisiología de los tejidos y órganos que se cultivan *in vitro* porque algunos elementos pueden ser tóxicos, como el nitrógeno (Gago *et al.*, 2011; Alanagh *et al.*, 2014; Hameg *et al.*, 2018).

Con relación a esto Parada y Monter (2009) indican que el cloruro de calcio es considerado tóxico para especies leñosas, motivo por el cual reformularon el medio WPM para el cultivo de *Prunus* spp., el cual carece de cloruro de calcio.

En la propagación de cualquier especie, por lo general se usa sólo un tipo de medio de cultivo para las diferentes fases de la micropropagación, aunque la formulación puede ser inadecuada para alguna de las etapas de crecimiento y desarrollo del explante (Adelberg *et al.*, 2013), debido a que cada órgano de la planta tiene diferente requerimiento de nutrientes durante su crecimiento (El-Hawaz *et al.*, 2015). Mesa (2003) y Ružić *et al.* (2000) mencionan que la disminución de los procesos morfogénicos y la toxicidad se deben entre otros factores, a los desbalances iónicos y relaciones nutricionales del medio de cultivo. Además, la respuesta de los tejidos y las células a los reguladores del crecimiento se ve afectada por estos desequilibrios nutricionales (Ramage y Williams, 2002; Kothari *et al.*, 2004).

Actualmente se han propuesto distintos protocolos para la micropropagación de algunas especies del género *Philodendron*, que incluyen desde el establecimiento del cultivo aséptico, multiplicación y enraizamiento, donde el medio de cultivo más utilizado es el MS (Chen *et al.*, 2012; Alanagh *et al.*, 2014; Safwat *et al.*, 2014; El-Shamy, 2015; Hassan *et al.*, 2016; Alawaadh *et al.*, 2020). No obstante, para algunas especies, el medio MS se ha considerado inadecuado (Greenway *et al.*, 2012; Nezami-Alanagh *et al.*, 2017).

Las plantas que crecen en ambientes naturales absorben los nutrientes a través de las raíces, en tanto que, las plantas cultivadas *in vitro* por lo general carecen de un sistema radical, por lo que se nutren únicamente por medio de células no especializadas para la absorción de nutrientes (Leifert *et al.*, 1995). Por lo anterior, es importante tener un balance y concentración nutrimental adecuado y fácilmente disponible para facilitar la absorción mineral. La formulación nutrimental propuesta por Steiner (1984) señala que las características químicas de una solución nutritiva, tales como: la relación mutua de cationes, la relación mutua de aniones, la concentración iónica total, la conductividad eléctrica y el pH, tienen alto efecto en el crecimiento, rendimiento y calidad de las plantas. Estas características también se presentan en los medios de cultivo que se

preparan para la propagación *in vitro*, por lo que podría considerarse también como una modalidad de hidroponía, pero en condiciones asépticas.

Con base en la importancia del filodendro y el interés de generar medios alternativos para su cultivo *in vitro*, el objetivo de esta investigación fue evaluar los efectos del medio de cultivo elaborado con diferentes relaciones y concentraciones de nutrimentos, empleando la metodología propuesta por Steiner (1984), para identificar combinaciones de minerales *in vitro* que promuevan buen crecimiento de plantas de filodendro xanadu.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron plantas de filodendro xanadu cultivadas *in vitro* con longitud de  $20 \pm 2$  mm, tres hojas jóvenes, sin brotes, sin raíces y de tamaño uniforme entre ellas. Se prepararon once medios de cultivo, nueve de ellos se generaron modificando la concentración y relación de macro y micro nutrimentos, tomando como base la metodología de Steiner (1984), los otros dos medios fueron Murashige y Skoog (1962; MS) al 100 y 50 % de concentración de macro y micronutrientes (Cuadro 1 y 2).

Los nueve medios de cultivo diseñados a partir de la metodología de Steiner se prepararon con fertilizantes comerciales altamente solubles para hidroponía:  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{KNO}_3$ ,  $\text{K}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  y  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , con agua destilada. Los microelementos fueron:  $\text{H}_3\text{BO}_3$ ,  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{H}_2\text{MoO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , grado reactivo en las concentraciones ( $\text{mg L}^{-1}$ ) siguientes: Fe, 5; B, 0.5; Mn, 0.5; Zn, 0.05; Cu, 0.045 y Mo, 0.01; el Fe se proporcionó como Fe-EDTA del producto comercial Librel FeLo<sup>®</sup>. Los once medios de cultivo fueron suplementados con tiamina, glicina, piridoxina, ácido nicotínico ( $0.5 \text{ mg L}^{-1}$ ) y mioinositol ( $100 \text{ mg L}^{-1}$ ). El pH fue ajustado a 5.7; como agente gelificante se usó 0.75 % de agar Merck<sup>®</sup>. Se usaron frascos de 100 mL de capacidad con 20 mL de medio de cultivo en cada uno. El medio de cultivo se esterilizó durante 18 min en autoclave a  $1.2 \text{ kg cm}^{-2}$  y  $120 \text{ }^\circ\text{C}$ .

Una vez que el medio estuvo preparado, en cada uno de los frascos de los once medios de cultivo se colocaron cinco brotes de filodendro xanadu. Los frascos de cultivo se establecieron en una cámara de crecimiento con temperatura de  $28 \pm 2$  °C, fotoperiodo de 16 horas de iluminación y 8 de oscuridad, e intensidad luminosa de  $32 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , por 50 días.

**Cuadro 1. Composición química de los medios de cultivo para crecimiento de filodendro xanadu.**

| Medio de cultivo | Concentración relativa de iones ( $\text{me}\cdot\text{L}^{-1}$ ) |                           |                    |               |              |                  |                  |                 |
|------------------|---|---------------------------|--------------------|---------------|--------------|------------------|------------------|-----------------|
|                  | $\text{NO}_3^-$   | $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ | $\text{SO}_4^{2-}$ | $\text{Cl}^-$ | $\text{K}^+$ | $\text{Ca}^{2+}$ | $\text{Mg}^{2+}$ | $\text{NH}_4^+$ |
| 1                | 10.00   | 1.25                      | 8.75               | -             | 8.27         | 7.00             | 4.73             | -               |
| 2                | 10.00   | 1.25                      | 8.75               | -             | 7.00         | 9.00             | 4.00             | -               |
| 3                | 10.00   | 1.25                      | 8.75               | -             | 5.73         | 11.00            | 3.27             | -               |
| 4                | 12.00   | 1.00                      | 7.00               | -             | 8.27         | 7.00             | 4.73             | -               |
| 5                | 12.00   | 1.00                      | 7.00               | -             | 7.00         | 9.00             | 4.00             | -               |
| 6                | 12.00   | 1.00                      | 7.00               | -             | 5.73         | 11.00            | 3.27             | -               |
| 7                | 14.00   | 0.75                      | 5.25               | -             | 8.27         | 7.00             | 4.73             | -               |
| 8                | 14.00   | 0.75                      | 5.25               | -             | 7.00         | 9.00             | 4.00             | -               |
| 9                | 14.00   | 0.75                      | 5.25               | -             | 5.73         | 11.00            | 3.27             | -               |
| MS 100 %         | 39.40   | 1.00                      | 1.50               | 3.00          | 19.80        | 3.00             | 1.50             | 20.60           |
| MS 50 %          | 19.70   | 0.50                      | 0.75               | 1.50          | 9.90         | 1.50             | 0.75             | 10.30           |

**Cuadro 2. Concentración nutrimental (mg L<sup>-1</sup>) de once medios de cultivo para el crecimiento *in vitro* de filodendro xanadu.**

| Nutrientos   | MS100 % | MS50 %   | 1       | 2       | 3      | 4       | 5      | 6      | 7      | 8      | 9      |
|--|---------|----------|---------|---------|--------|---------|--------|--------|--------|--------|--------|
| NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>                        | 1650    | 825      | -       | -       | -      | -       | -      | -      | -      | -      | -      |
| Ca (NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O | -       | -        | 257     | 338     | 360    | 257     | 338    | 419    | 257    | 338    | 419    |
| KNO <sub>3</sub>                                       | 1900    | 950      | 148     | 32      | -      | 266     | 149    | 32     | 383    | 266    | 149    |
| K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>                         | -       | -        | 271     | 315     | 271    | 164     | 209    | 253    | 58     | 102    | 147    |
| Mg SO <sub>4</sub>                                     | 370     | 185      | 200     | 166     | 131    | 200     | 166    | 131    | 200    | 166    | 131    |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                        | 170     | 85       | 146     | 146     | 146    | 117     | 117    | 117    | 88     | 88     | 88     |
| CaCl <sub>2</sub> · 7H <sub>2</sub> O                  | 440     | 220      | -       | -       | -      | -       | -      | -      | -      | -      | -      |
| NA <sub>2</sub> EDTA· 2H <sub>2</sub> O                | 37.2    | 18.6     | -       | -       | -      | -       | -      | -      | -      | -      | -      |
| FeEDTA   | -       | -        | 5       | 5       | 5      | 5       | 5      | 5      | 5      | 5      | 5      |
| FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O                  | 27.8    | 13.9     | -       | -       | -      | -       | -      | -      | -      | -      | -      |
| H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>                         | 6.2     | 3.1      | 2.88    | 2.88    | 2.88   | 2.88    | 2.88   | 2.88   | 2.88   | 2.88   | 2.88   |
| H <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub>                        | -       | -        | 0.02    | 0.02    | 0.02   | 0.02    | 0.02   | 0.02   | 0.02   | 0.02   | 0.02   |
| MnSO <sub>4</sub> · 4H <sub>2</sub> O                  | 22.3    | 11.15    | -       | -       | -      | -       | -      | -      | -      | -      | -      |
| ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O                  | 8.6     | 4.3      | 0.22    | 0.22    | 0.22   | 0.22    | 0.22   | 0.22   | 0.22   | 0.22   | 0.22   |
| Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O   | 0.250   | 0.125    | -       | -       | -      | -       | -      | -      | -      | -      | -      |
| CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O                  | 0.025   | 0.012    | 0.18    | 0.18    | 0.18   | 0.18    | 0.18   | 0.18   | 0.18   | 0.18   | 0.18   |
| CoCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O                  | 0.025   | 0.012    | -       | -       | -      | -       | -      | -      | -      | -      | -      |
| KI   | 8.3     | 4.15     | -       | -       | -      | -       | -      | -      | -      | -      | -      |
| MnCl <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O                  | -       | -        | 1.81    | 1.81    | 1.81   | 1.81    | 1.81   | 1.81   | 1.81   | 1.81   | 1.81   |
| Total (mg)   | 4640.7  | 2320.349 | 1032.11 | 1007.11 | 918.11 | 1014.11 | 989.11 | 962.11 | 996.11 | 970.11 | 944.11 |

MS: medio Murashige & Skoog (1962)

## **Potencial osmótico (PO), conductividad eléctrica (CE) y pH**

En cada medio de cultivo se determinó la conductividad eléctrica (potenciómetro Hanna HI 8424) y el potencial osmótico (Osmómetro Löser Messtechnik® Tipo 6), tanto al finalizar la preparación del medio de cultivo como después de la esterilización en la autoclave (Cuadro 3).

## **Diseño experimental**

Se estudiaron once tratamientos con seis repeticiones en un diseño experimental completamente al azar. La unidad experimental estuvo conformada por un frasco de 100 mL de capacidad con 20 mL de medio de cultivo y cinco brotes por frasco.

## **Variables morfológicas**

Transcurridos 50 días del establecimiento del experimento, se evaluó la altura de brotes (desde la base hasta la parte superior, con hoja milimétrica), hojas por planta, raíces por planta, longitud de raíz (con hoja milimétrica) y materia seca (mg) (balanza analítica); los brotes se colocaron en bolsas de papel estraza y se colocaron en un horno con circulación forzada de aire a una temperatura de 70 °C durante 72 h para posteriormente pesar en balanza analítica (LUZEREN FA2204B).

## **Contenido de clorofila y carotenoides**

Se determinó el contenido relativo de clorofila (SPAD 502DL Plus Spectrum®, tomando el valor promedio de tres hojas de vida intermedia), para la evaluación de la clorofila *a*, *b* y carotenoides se utilizaron las mismas hojas en las cuales se determinó la clorofila con el SPAD, se usó un espectrofotómetro GENESYS 10S UV. Se empleó la metodología propuesta por Rodés y Collazo (2006), modificada de acuerdo al volumen final del extracto filtrado. De cada tratamiento se tomó una muestra de 0.1 g de tejido fresco de hojas, se adicionaron 10 mL de acetona al 80 % fría y se maceró por 30 s a

14000 rpm utilizando un ULTRA TURRAX T8 (IKA®). Las muestras se pasaron por papel filtro y se almacenaron en viales ámbar hasta su evaluación. El espectrofotómetro se ajustó a 645, 663 y 440.5 nm para medir la clorofila a, clorofila b y carotenoides respectivamente. Como blanco se utilizó acetona al 80 % y se utilizaron celdas de cuarzo rectangulares de 10 mm (Thomas Scientific) que se limpiaron con agua destilada entre cada muestra evaluada.

La concentración de pigmentos en mg L<sup>-1</sup> se obtuvo mediante las siguientes ecuaciones:

$$Ca \text{ (mg L}^{-1}\text{)} = 12.7 (A_{663}) - 2.69 (A_{645}), \quad Cb \text{ (mg L}^{-1}\text{)} = 22.9 (A_{645}) - 4.68 (A_{663})$$

$$C_{a+b} \text{ (mg L}^{-1}\text{)} = 20.2 (A_{645}) + 8.02 (A_{663}), \quad C_{car} \text{ (mg L}^{-1}\text{)} = 4.695 (A_{440.5}) - 0.268 (C_{a+b})$$

Donde: A<sub>645</sub> = Absorbancia a 645 nm; A<sub>663</sub> = Absorbancia a 663 nm; A<sub>440.5</sub> = Absorbancia a 440.5 nm; Ca = Concentración de clorofila a; Cb = Concentración de clorofila b; C<sub>a+b</sub> = Concentración total de clorofila; C<sub>car</sub> = Concentración de carotenoides.

Los datos del experimento se estudiaron mediante análisis de varianza (ANOVA) y en las variables donde hubo efecto de tratamientos se realizó la prueba de comparación de medias DMS (P ≤ 0.05) con en el paquete estadístico SAS System versión 9.0.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Potencial osmótico (PO), conductividad eléctrica (CE) y pH

La composición nutrimental de los medios de cultivo repercutió en el potencial osmótico, conductividad eléctrica y potencial de hidrógeno, antes y después del proceso de esterilización (Cuadro 3). El PO de los medios de cultivo fue menos negativo después de esterilizar el medio; los medios de cultivo 5 y MS 100 % tuvieron el PO más negativo antes y después de ser esterilizados. Los valores observados después de la esterilización, son



los que tendrán efecto en el crecimiento de los brotes. El cambio en PO puede deberse a que los azúcares disacáridos como la sacarosa, se hidrolizan en monosacáridos (glucosa y fructuosa) durante la esterilización y este tiende a ser más negativo conforme se aumenta la concentración de alguna fuente de carbono como sacarosa, glucosa, manitol, sorbitol o mioinositol (Cárdenas y Villegas, 2002). De acuerdo con estos autores, el PO menos negativo y la alta disponibilidad de agua pueden causar hiperhidratación. Sin embargo, en las plantas cultivadas en el medio 8 con el PO menos negativo de todos (-0.177 MPa) (Cuadro 3) no se observaron problemas de hiperhidratación.

**Cuadro 3. PO, CE y pH de once medios de cultivo, evaluados en el crecimiento de filodendro xanadu.**

| Medio de cultivo | Antes de esterilizar |         |     | Después de esterilizar |         |     |
|------------------|----------------------|---------|-----|------------------------|---------|-----|
|                  | PO (MPa)             | CE (mV) | pH  | PO (MPa)               | CE (mV) | pH  |
| 1                | -0.223               | 64.8    | 5.7 | -0.215                 | 64.6    | 6.0 |
| 2                | -0.220               | 66.0    | 5.7 | -0.211                 | 55.2    | 6.0 |
| 3                | -0.303               | 65.0    | 5.7 | -0.288                 | 61.7    | 6.0 |
| 4                | -0.303               | 64.0    | 5.7 | -0.296                 | 57.2    | 6.0 |
| 5                | -0.406               | 62.8    | 5.7 | -0.402                 | 66.0    | 5.9 |
| 6                | -0.294               | 62.6    | 5.7 | -0.283                 | 63.0    | 6.0 |
| 7                | -0.206               | 51.4    | 5.7 | -0.195                 | 46.0    | 6.1 |
| 8                | -0.188               | 50.9    | 5.7 | -0.177                 | 63.0    | 6.0 |
| 9                | -0.215               | 54.9    | 5.7 | -0.211                 | 59.8    | 6.0 |
| (MS100%)         | -0.345               | 72.0    | 5.7 | -0.335                 | 97.0    | 5.4 |
| (MS 50%)         | -0.299               | 68.0    | 5.7 | -0.288                 | 67.0    | 5.8 |

PO: potencial osmótico, CE: conductividad eléctrica, pH: potencial de hidrógeno.

De acuerdo con Pierik y Steegmans (1975), el crecimiento y organogénesis *in vitro* se detienen si el potencial osmótico es más negativo que -0.3 Mpa, porque la planta absorbe poca agua del medio de cultivo. No obstante, en esta investigación se observó

que con el potencial osmótico más negativo (medios de cultivo 5 y MS 100 % con -0.402 y -0.335 MPa respectivamente), el crecimiento de las plantas no se detuvo. Al respecto, Raya *et al.* (2009) reportan que el mejor enraizamiento (97 %) plantas de *Vitis* sp. se obtuvo en un medio de cultivo con PO de -0.69 MPa.

El PO es uno de los componentes del potencial del agua, que varía en función del cambio de las propiedades físicas y químicas debido a la presencia de solutos (Larque-Saavedra y Trejo-López, 1990) y fuentes de carbono (Cárdenas y Villegas, 2002). Molinos *et al.* (2004) indican que el potencial osmótico del medio de cultivo también es determinante para la morfogénesis *in vitro*, aunque no se considera en la mayoría de las investigaciones realizadas con esta técnica de cultivo.

La CE varió de 46 a 97 mV en los medios MS 100 y 50 % y fue mayor que la de los nueve medios formulados con base en la metodología de Steiner (1984), antes y después del autoclave. Después de la esterilización, la CE de los medios 1, 2, 3, 4, 7 y MS 50 % fue menor, mientras que en los medios 5, 6, 8, 9 y MS 100 % se incrementó (Cuadro 3). La menor CE de los nueve medios diseñados con base en Steiner (1984) indica que la cantidad de sales que se les añadió fue menor, incluso que las usadas para el medio MS 50 %. Bell *et al.* (2009) han definido al medio MS como rico en sales, de ahí que su potencial osmótico es más negativo. Navarro *et al.* (2000) mencionan que la salinidad reduce el transporte de agua y asimilación de nutrientes.

Respecto al pH, después de la esterilización éste tendió a elevarse en la mayoría de los medios; sin embargo, en el medio MS100 % disminuyó (Cuadro 3). Estos resultados concuerdan con Chen *et al.* (2014) quienes mencionan que el pH en el medio por lo general tiende a elevarse después de la esterilización, lo que se atribuye a los componentes del medio, los cambios que ocurren por el proceso de calentamiento (autoclave), intercambio iónico y condiciones ambientales; también informan que la necrosis puede ser causada por deficiencia nutrimental inducida por un pH bajo. En esta investigación el pH del medio tuvo efectos significativos importantes en el crecimiento de los brotes de filodendro xanadu; la mayor altura de brotes y número de raíces ocurrió en el medio de cultivo 7 que tuvo pH final de 6.1, estos resultados son similares a los obtenidos por Sharma *et al.* (2018) quienes

observaron que hubo mayor crecimiento y multiplicación de brotes de *Saccharum officinarum* L. en medios de cultivo MS ajustados a pH 6.0. Por su parte, Yaacob *et al.* (2014) reportaron que para la regeneración *in vitro* de *Citrus assamensis* fue adecuado el pH 5.8 en medio MS. George *et al.* (2008) mencionan que esta característica del medio de cultivo está relacionada con la absorción de nutrientes, porque el pH facilita o inhibe la disponibilidad en el medio.

Con base a los resultados obtenidos en este trabajo y de acuerdo con Sharma *et al.* (2018) y Chen *et al.* (2014) se ha demostrado que el pH del medio de cultivo es muy importante para muchos aspectos del desarrollo y crecimiento de explantes, y que la tolerancia a un determinado valor de pH varía según la especie. Chen *et al.* (2014) sugieren subcultivar cada 21 días, para tener medio de cultivo fresco, pH estable y crecimiento del explante adecuado.

### **Variables morfológicas**

La composición de los medios de cultivo tuvo efecto significativo ( $P \leq 0.05$ ) en el número de hojas y formación de raíces, y altamente significativo para la altura de brotes y para el crecimiento en longitud de las raíces de filodendro xanadu, lo anterior puede atribuirse a la variación en balance y relación iónica, y con ello también al PO y pH de los medios de cultivo. Las plantas que crecieron en el medio de cultivo 7 fueron las de mayor altura (41.8 mm) (Figura 1), seguidas por aquellas cultivadas en el medio 9 (38 mm), las plantas de estos dos medios tuvieron 22.5 y 15.8 % mayor crecimiento que las cultivadas en el medio MS al 100 %; en contraste, las plantas cultivadas en el medio de cultivo 1 fueron las de menor altura (26.9 mm) (Cuadro 4).

El número de hojas por planta fue mayor en el medio MS 50 %, seguido por las de los medios 3, 4, 5 y 6, sin diferencias estadísticas entre ellos; en contraste, el menor número de estos órganos ocurrió en las plantas del medio 1 (Cuadro 4). Aunque las

**Cuadro 4. Efecto de la composición del medio de cultivo en el crecimiento de plantas de filodendro xanadu.**

| Medio de cultivo | Concentración relativa de iones (me·L <sup>-1</sup> ) |   |                               |                 |                |                  |                  |                              | Características de brotes |             |              |                 |
|------------------|---|---|-------------------------------|-----------------|----------------|------------------|------------------|------------------------------|---------------------------|-------------|--------------|-----------------|
|                  | NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>                          | H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> <sup>-</sup> | SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> | Cl <sup>-</sup> | K <sup>+</sup> | Ca <sup>2+</sup> | Mg <sup>2+</sup> | NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> | Altura (mm)               | Hojas (Núm) | Raíces (Núm) | Long. Raíz (cm) |
| 1                | 10.0  | 1.25  | 8.75                          | -               | 8.27           | 7.0              | 4.73             | -                            | 26.9 d                    | 7.2 c       | 1.53 abc     | 20.1 cd         |
| 2                | 10.0  | 1.25  | 8.75                          | -               | 7.00           | 9.0              | 4.00             | -                            | 34.3 bc                   | 7.7 bc      | 1.76 ab      | 21.2 bc         |
| 3                | 10.0  | 1.25  | 8.75                          | -               | 5.73           | 11.0             | 3.27             | -                            | 33.8 bc                   | 8.9 ab      | 1.83 a       | 17.7 cde        |
| 4                | 12.0  | 1.00  | 7.00                          | -               | 8.27           | 7.0              | 4.73             | -                            | 33.4 c                    | 8.8 ab      | 1.53 abc     | 17.4 cde        |
| 5                | 12.0  | 1.00  | 7.00                          | -               | 7.00           | 9.0              | 4.00             | -                            | 32.6 c                    | 8.9 ab      | 1.60 ab      | 15.5 de         |
| 6                | 12.0  | 1.00  | 7.00                          | -               | 5.73           | 11.0             | 3.27             | -                            | 32.0 c                    | 8.6 ab      | 1.60 ab      | 14.8 e          |
| 7                | 14.0  | 0.75  | 5.25                          | -               | 8.27           | 7.0              | 4.73             | -                            | 41.8 a                    | 8.3 abc     | 1.83 a       | 16.9 cde        |
| 8                | 14.0  | 0.75  | 5.25                          | -               | 7.00           | 9.0              | 4.00             | -                            | 31.3 c                    | 8.3 abc     | 1.13 c       | 15.0 e          |
| 9                | 14.0  | 0.75  | 5.25                          | -               | 5.73           | 11.0             | 3.27             | -                            | 38.0 ab                   | 7.6 bc      | 1.33 bc      | 16.9 cde        |
| MS 100 %         | 39.4  | 1.00  | 1.50                          | 3.0             | 19.80          | 3.0              | 1.50             | 20.6                         | 32.4 c                    | 8.3 abc     | 2.03 a       | 35.8 a          |
| MS 50 %          | 19.7  | 0.50  | 0.75                          | 1.5             | 9.90           | 1.50             | 0.75             | 10.3                         | 30.8 cd                   | 9.7 a       | 1.73 ab      | 25.6 b          |
| DMS (P ≤ 0.05)   |   |   |                               |                 |                |                  |                  |                              | 0.38                      | 0.24        | 0.20         | 1.81            |

DMS: diferencia mínima significativa. Medias con letras iguales en una columna, no son estadísticamente diferentes de acuerdo con la prueba LSD (P ≤ 0.05).



Figura 1. Plántula de filodendro xanadu cultivada en medio de cultivo elaborado con fertilizantes comerciales grado no reactivo.

hojas de los brotes cultivados en los medios 7, 8 y 9 fueron cualitativamente más grandes y de color más verde.

También se observaron diferencias significativas en el número de raíces por planta. Los medios MS 100 %, 3 y 7 generaron el mayor número de raíces, en tanto que los medios de cultivo 2, 5, 6 y MS 50 % produjeron valores estadísticamente iguales. En contraste, las plantas cultivadas en el medio 8 produjeron la menor cantidad de raíces. En cuanto a la longitud de raíz, ésta se vio favorecida en el medio MS 100 %, seguida de las plantas cultivadas en el medio MS 50 %; la menor longitud se observó en los medios 6 y 8. El medio de cultivo que propició mayor crecimiento de la raíz en cuanto a número y longitud fue el MS 100 %, seguido por el MS 50 % (Cuadro 4). Estos resultados coinciden parcialmente con Jirakiattikul y Limpradithtanont (2006) quienes reportan que el desarrollo de raíz en brotes de filodendro xanadu ocurre bien en el medio de cultivo MS en su concentración total o al 50 %, ya sea con la suplementación de auxinas o en ausencia de estas. No obstante, emplear el medio de cultivo a una menor concentración puede ocasionar aporte de cantidades inadecuadas de

nutrimentos indispensables para el desarrollo y crecimiento del explante (Adelberg *et al.*, 2013).

Raya *et al.* (2009) reportan resultados similares en *in vitro* plantas de *Vitis* sp. donde el mayor enraizamiento (97 %) ocurrió en el medio de cultivo con el PO más negativo (-0.69 MPa), sin indicar anomalías en las raíces. Aunque un PO tan negativo podría ser perjudicial para el crecimiento y desarrollo (Pierik y Steegmans, 1975). Los resultados obtenidos en esta investigación, así como lo reportado por otros investigadores, muestra que la tolerancia de explantes a ciertas características de los medios de cultivo varía según la especie en cuestión.

Ibrahim *et al.* (2008) evaluaron el efecto de los minerales del medio MS en diferentes niveles sobre el crecimiento y desarrollo de *Stevia* sp., sugieren que el mejor medio de cultivo fue el MS 100 % o modificando la cantidad ( $\text{mg L}^{-1}$ ) de varios componentes ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$  a 1237.5,  $\text{KNO}_3$  a 950,  $\text{Mg SO}_4$  a 185,  $\text{CaCl}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  a 440 y  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  a 85); indican que la concentración de cloruro de calcio es muy importante para disminuir o prevenir la necrosis de la punta del brote. De acuerdo con estos autores, el paso más importante para obtener un medio de cultivo adecuado para tejidos vegetales es la selección de iones macronutrientes en una concentración y equilibrio correctos. Los elementos secundarios o mesos ( $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{MgSO}_4$  y  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) también ejercen efectos importantes en el crecimiento, Poothong y Reed (2015) estudiaron el crecimiento y desarrollo de brotes de cinco cultivares de frambuesa roja y determinaron que la mejor concentración de estos compuestos fue 2.5 o 3.0 veces la concentración de MS.

El medio de cultivo más utilizado en la propagación *in vitro* es el Murashige y Skoog (1962); sin embargo, este medio fue diseñado para un desarrollo óptimo de callos de tabaco (George *et al.*, 2008). Con base a los resultados obtenidos en esta investigación, y tras evaluar el efecto que tiene el medio MS y los medios de cultivo diseñados en base a la relación mutua entre cationes y aniones y la concentración de estos sobre el crecimiento de brotes de filodendro xanadu, se puede decir que el medio MS genera amplia variación de efectos en función de la especie, se pueden obtener plantas que crecen bien, hasta aquellas que presentan efectos de toxicidad o desordenes fisiológicos. Los resultados de este trabajo también demuestran que los medios de cultivo con menor

concentración de nutrientes, pero con una relación mutua entre cationes y aniones, no limitaron el crecimiento de brotes de filodendro xanadu y que estos pueden crecer bien en medio de cultivo preparado con nutrimentos grado no reactivo, lo cual podría disminuir los costos de producción mediante esta técnica de propagación.

Respecto a la acumulación de materia seca, las plantas cultivadas en el medio de cultivo 2 tuvieron la mayor acumulación (11 mg), seguido de aquellas cultivadas en el MS 100 % (10 mg); en contraste, la menor acumulación de materia seca (50 % menos) ocurrió en aquellas cultivadas en el medio 8. Los brotes cultivados en los medios 3, 4 y 7 tuvieron crecimiento similar entre ellos y fue de 16 a 25 % menor que el obtenido en las plantas cultivadas en el medio 2 (Figura 2). Molinos *et al.* (2004) obtuvieron resultados parcialmente similares, indican que la mayor cantidad de biomasa seca de *Vitis* sp. se obtuvo en las plantas cultivadas en el medio de cultivo cuyo PO fue menos negativo. Aunque en esta investigación el PO del medio de cultivo 2 fue el tercero menos negativo (-0.211) al igual que en el medio de cultivo 9.

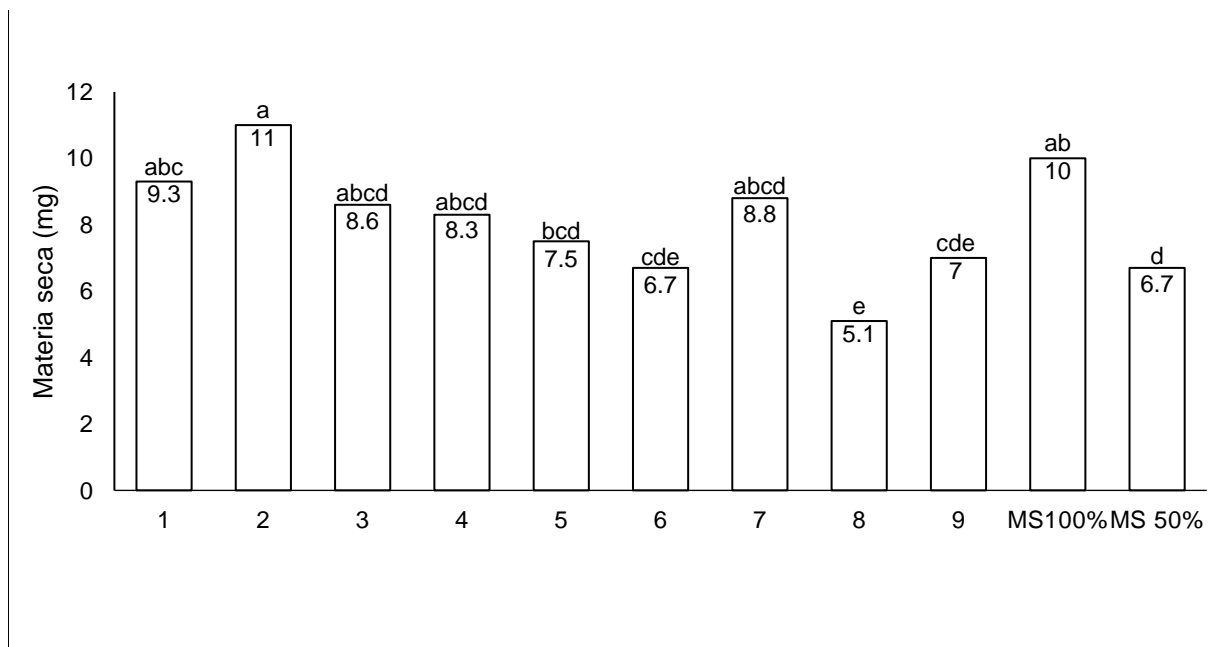


Figura 2: Efecto de medio de cultivo en la acumulación de materia seca de plantas de filodendro xanadu. Medias con letras iguales entre barras no son estadísticamente diferentes de acuerdo con la prueba LSD ( $P \leq 0.05$ ), (DMS= 0.03).

## Contenido de clorofila y carotenoides

Los brotes de filodendro xanadu presentaron diferencias en la producción de pigmentos por efecto de la composición del medio de cultivo. Las plantas cultivadas en el medio 7 y 8 tuvieron el mayor contenido relativo de clorofila (CRC) en las hojas, con 35 y 36 unidad SPAD respectivamente, seguidas de las plantas cultivadas en los medios 4, 5 y 6 que fueron estadísticamente iguales entre sí con 33 y 34 unidades; el menor contenido de clorofila se cuantificó en las plantas cultivadas en los medios 1, 2 y 3 (Cuadro 5).

En la cuantificación de pigmentos mediante cromatografía, las plantas cultivadas en el medio MS 100 % fueron las que tuvieron la mayor concentración de clorofila *a* y clorofila total con 15.75 y 23.04 mg respectivamente, mientras que las plantas que crecieron en el medio MS 50 % tuvieron mayor concentración de clorofila *b*. La mayor concentración de carotenoides (3.80 mg) se cuantificó en las plantas que crecieron en el medio de cultivo 2, seguidas por las de medio MS 100 % con 3.66 mg; por el contrario, las plantas que tuvieron la menor concentración fueron aquellas cultivadas en el medio de cultivo 1 (2.09 mg) (Cuadro 5). La clorofila *a* se presentó en mayor proporción que la clorofila *b* y carotenoides.

Respecto al contenido relativo de clorofila determinado mediante Spad y clorofilas mediante cromatografía se pudo observar que a medida que se incrementó la cantidad de nitrógeno de 10 a 12 me·L<sup>-1</sup> de NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, en los medios de cultivo formulados con base en la formulación de Steiner (1984), se cuantificó mayor cantidad de pigmentos en el tejido, pues al aumentar a 14 me·L<sup>-1</sup>, la cantidad de clorofilas fue menor. Los medios de cultivo con menor contenido de nitrato (10 me·L<sup>-1</sup>) y ausencia de amonio produjeron menor cantidad de clorofila *a* y clorofila total (por los dos métodos), a consecuencia del menor contenido de nitrógeno, mismo que forma parte de la molécula de clorofila (George *et al.*, 2008).

Aunque el medio de cultivo MS 100 % fue sobresaliente en el número de raíces, longitud de raíz, clorofila *a* y *b* así como en contenido de carotenoides, no promovió un crecimiento



**Cuadro 5. Efecto de medio de cultivo en la producción de pigmentos en plantas de filodendro xanadu.**

| Medio de cultivo | CRC<br>(U. Spad) | Clorofila <i>a</i> Clorofila <i>b</i> Clorofila total Carotenoides |         |           |          |
|------------------|------------------|--|---------|-----------|----------|
|                  |                  | (mg L <sup>-1</sup> )  |         |           |          |
| 1                | 26.23 d          | 4.98 d   | 2.53 c  | 7.51 d    | 2.09 c   |
| 2                | 26.00 d          | 5.13 d   | 0.44 d  | 5.57 d    | 3.80 a   |
| 3                | 27.00 d          | 10.00 c  | 5.63 ab | 15.64 c   | 2.27 bc  |
| Promedio         | 26.61            | 6.70   | 2.86    | 9.57      | 2.72     |
| 4                | 33.33 ab         | 13.16 b  | 7.04 ab | 20.20 ab  | 3.08 abc |
| 5                | 34.33 ab         | 11.62 bc   | 5.62 ab | 17.24 bc  | 2.90 abc |
| 6                | 34.83 ab         | 12.91 b  | 6.29 ab | 19.20 abc | 2.22 bc  |
| Promedio         | 34.16            | 12.56  | 6.31    | 18.88     | 2.73     |
| 7                | 35.16 a          | 12.18 bc   | 6.08 ab | 18.26 bc  | 3.13 abc |
| 8                | 36.83 a          | 11.36 bc   | 5.45 b  | 16.81 bc  | 2.81 abc |
| 9                | 30.16 bcd        | 12.45 bc   | 5.75 ab | 18.19 bc  | 3.14 abc |
| Promedio         | 34.05            | 11.99  | 5.76    | 17.75     | 3.02     |
| MS 100 %         | 32.83 abc        | 15.75 a  | 7.29 ab | 23.04 a   | 3.66 ab  |
| MS 50 %          | 28.00 cd         | 11.09 bc   | 7.47 a  | 18.57 bc  | 2.31 bc  |
| DMS (P ≤ 0.05)   | 4.64             | 2.55   | 1.98    | 3.96      | 1.46     |

DMS: diferencia mínima significativa. Medias con letras iguales en una columna, no son estadísticamente diferentes de acuerdo con la prueba LSD (P ≤ 0.05).

adecuado porque las plantas establecidas en este medio presentaron poca altura, amarillamiento temprano en hojas maduras, peciolo compactos y engrosamiento de la base del tallo. De acuerdo con algunos autores, estas características se deben

probablemente al efecto tóxico generado por la captación y acumulación de iones (Mesa, 2003), como resultado de alto contenido de solutos en el medio (Alanagh *et al.*, 2014), desbalance iónico e inapropiadas relaciones de nutrimentos, así como por el estrés hídrico debido al potencial osmótico más negativo (Ružić *et al.*, 2000; Mesa, 2003; Molinos *et al.*, 2004), lo cual puede contribuir a que el metabolismo vegetal estimule la liberación de compuestos fitotóxicos capaces de oxidar (Türkan y Demiral, 2009).

Como se observó en esta investigación, el medio de cultivo MS 100 % de manera general no favoreció el crecimiento del tallo de las plantas de filodendro xanadu, aunque algunos autores reportan la utilización de este medio sin mencionar algún tipo de problema fisiológico o de crecimiento en otras especies del mismo género (Chen *et al.*, 2012; Safwat *et al.*, 2014; El-Shamy, 2015; Hassan *et al.*, 2016; Alawaadh *et al.*, 2020); de acuerdo a los resultados, el medio MS podría ser una buena alternativa para la fase de enraizamiento de especies de este género que presenten poco desarrollo de raíz.

## CONCLUSIONES

El uso de medios de cultivo elaborados con diferentes relaciones y concentraciones de nutrimentos de la solución Steiner (1984) permitió el crecimiento *in vitro* de plantas de filodendro xanadu con la misma o mayor eficiencia que el medio de cultivo convencional Murashige y Skoog (1962), de tal modo que el medio 7 (14, 0.75, 5.25, 8.27, 7 y 4.73 me L<sup>-1</sup>) y medio 2 (10, 1.25, 8.75, 7, 9 y 4 me L<sup>-1</sup>) de NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub><sup>-</sup>, SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>, K<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup> y Mg<sup>2+</sup>, microelementos Fe, 5; B, 0.5; Mn, 0.5; Zn, 0.05; Cu, 0.045 y Mo, 0.01 me L<sup>-1</sup>, y vitaminas del medio MS (1962) podrían ser una alternativa al medio MS (1962). La sustitución de nutrimentos grado reactivo por el uso de fertilizantes comerciales para la preparación del medio de cultivo permitió el crecimiento *in vitro* de filodendro xanadu y redujo los costos de producción de esta técnica de propagación.

## LITERATURA CITADA

- Adelberg, J.; T. Driesse; S.Halloran; W. C. Bridges. 2013. Relationships between nutrients and plant density in liquid media during micropropagation and acclimatization of turmeric. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant* 49: 724-736.
- Alanagh, E. N.; G. A. Garoosi; R. S. Maleki; M. Landín; P. P. Gallego. 2014. Design of tissue culture media for efficient Prunus rootstock micropropagation using artificial intelligence models. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 117: 349-359.
- Alawaadh, A. A.; Y. H. Dewir; M. S. Alwihibi; A. A. Aldubai; S. El-Hendawy; Y. Naidoo. 2020. Micropropagation of lacy tree Philodendron (*Philodendron bipinnatifidum* Schott ex Endl.). *HortScience* 55: 294-299.
- Bell, R. L.; C. Srinivasan; D. Lomberk. 2009. Effect of nutrient media on axillary shoot proliferation and preconditioning for adventitious shoot regeneration of pears. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant* 45: 708-714.
- Cárdenas, L. M. A. y M. Á. Villegas. 2002. Potencial osmótico del medio de cultivo con diferentes componentes para la propagación *in vitro*. *Revista Fitotecnia Mexicana* 25: 213-217.
- Chen, C. C.; R. Bates; J. Carlson. 2014. Effect of environmental and cultural conditions in medium pH and plant growth performance of Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*) shoot culture. *F1000Research* 3: 298.
- Chen, F. C.; C. Y. Wang; J. Y. Fang. 2012. Micropropagation of self-heading Philodendron via direct shoot regeneration. *Scientia Horticulturae* 141: 23-29.
- El-Hawaz, R. F.; W. C. Bridges; J. W. Adelberg. 2015. *In vitro* growth of *Curcuma longa* L. in response to five mineral elements and plant density in fed-batch culture systems. *PLoS ONE* 10: 1-13.
- El-Shamy, M. A. 2015. Studies on *Philodendron bipinnatifidum* to propagation by *in vitro* culture. *Journal of Biological, Chemical and Environmental Sciences* 10: 23-36.

- Gago, J.; O. Pérez-Tornero; M. Landín; L. Burgos; P.P.Gallego. 2011. Improving knowledge of plant tissue culture and media formulation by neurofuzzy logic: A practical case of data mining using apricot databases. *Journal of Plant Physiology* 168: 1858-1865.
- George, E. F.; M. A. Hall; G. J. De Klerk. 2008. The Components of plant tissue culture media I: Macro- and micro-nutrients. pp.65-113. *In: George, E. F. y Klerk G. J. De. (Eds.). Plant Propagation by Tissue Culture. 3rd Edition. Springer.*
- Greenway, M. B.; I. C. Phillips; M. N. Lloyd; J. F. Hubstenberger; G. C. Phillips. 2012. A nutrient medium for diverse applications and tissue growth of plant species *in vitro*. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant* 48: 403-410.
- Hameg, R.; T. Arteta; P. P.Gallego; M. E. Barreal. 2018. Selecting an efficient proliferation medium for *Actinidia arguta* 'Issai' explants. *Acta Horticulturae* 1218: 565-572.
- Hassan, H.; M. Ali; D. Soliman. 2016. Effect of low cost gelling agents and some growth regulators on micropropagation of *Philodendron selloum*. *Journal of Plant Production* 7: 169-176.
- Ibrahim, I. A.; M. I. Nasr; B. R. Mohammedm; M. M. El-Zefzafi. 2008. Nutrient factors affecting *in vitro* cultivation of *Stevia rebaudiana*. *Sugar Tech* 10: 248-253.
- Jirakiattikul, Y. and P. Limpraditthanont. 2006. Shoot multiplication and rooting of *Philodendron xanadu* cultured *in vitro*. *Songklanakarinn Journal Science Technology* 28: 79-86.
- Kothari, S. L.; K. Agarwal; S. Kumar. 2004. Inorganic nutrient manipulation for highly improved *in vitro* plant regeneration in finger millet - *Eleusine coracana* (L.) Gaertn. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant* 40: 515-519.
- Larque-Saavedra, A. y C. Trejo-López. 1990. El agua en las plantas. Trillas. México. 88 p.
- Leifert, C.; K. P. Murphy; P. J. Lumsden. 1995. Mineral and Carbohydrate Nutrition of Plant Cell and Tissue Cultures. *Critical Reviews in Plant Sciences* 14: 83–109.

- Mesa, D. 2003. Obtención de plantas resistentes a la salinidad para los suelos salinos cubanos. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola* 37: 217-226.
- Molinos, S. C.; M. Á. Villegas; G. P. Sánchez; G. G. Alcantar; M. M. N. Rodríguez; P. L. D. M. Ruíz. 2004. Efecto del potencial osmótico y contenido de Ca en el medio de cultivo sobre la distribución de Ca<sup>2+</sup> y K<sup>+</sup>, producción de biomasa y necrosis apical de vid "R110." *Interciencia* 29: 384-388.
- Moya-Hernández, S. L.; M. L. Rodríguez-Mejía; M. Espinosa-Mendoza. 2015. *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* causante de manchas foliares del filodendro (*Philodendron scadens* subsp. *oxycardium*) en Cuautla, Morelos, México. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 6: 391-397.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473-497.
- Navarro, J. M.; M. Á. Botella; A. Cerdá; V. Martínez. 2000. Effect of salinity x calcium interaction on cation balance in melon plants grown under two regimes of orthophosphate. *Journal of Plant Nutrition* 23: 991-1006.
- Nezami-Alanagh, E.; G. A. Garoosi; S. Maleki; M. Landín; P. P. Gallego. 2017. Predicting optimal *in vitro* culture medium for *Pistacia vera* micropropagation using neural networks models. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 129: 19-33.
- Parada P. D. M. y Á. V. Monter 2009. Propagación *in vitro* del híbrido almendro x durazno H1. *Revista Fitotecnia Mexicana* 32: 103-109.
- Pierik, R. L. M. and H. H. M. Steegmans. 1975. Analysis of adventitious root formation in isolated stem explants of rhododendron. *Scientia Horticulturae* 3: 1-20.
- Poothong, S. and B.M. Reed. 2015. Increased CaCl<sub>2</sub>, MgSO<sub>4</sub>, and KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> improve the growth of micropropagated red raspberries. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant* 51: 648-658.
- Ramage, C. M. and R. R. Williams. 2002. Mineral nutrition and plant morphogenesis. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant* 38: 116-124.

- Ramírez-Rojas, S.; F. J. Osuna-Canizalez; F. García-Pérez; J. Canul-Ku; A. Palacios-Talavera. 2016. Identificación molecular de bacterias asociadas a plantas ornamentales producidas *in vitro*. *Revista Mexicana de Fitopatología* 34: 173-183.
- Raya M., Y. A.; A. M. Villegas; G. O. Arellano. 2009. Cinética de enraizamiento *in vitro* de portainjertos de vid en respuesta a la fuente y concentración de azúcar. *Revista Fitotecnia Mexicana* 32: 111-117.
- Rodés-García, R. y M. Collazo-Ortega. 2006. Manual de prácticas de fotosíntesis. Las prensas de Ciencias. UNAM. México. 159 p.
- Ružić, D.; M. Sarić; R. Cerovic; L. Čulafić. 2000. Relationship between the concentration of macroelements, their uptake and multiplication of cherry rootstock Gisela 5 *in vitro*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 63: 9-14.
- Safwat, G.; Y. El-Sayed; G. S. F. El-Sharabasy; A. Amin. 2014. Assessment level for complex additives in the tissue culture media of philodendron red emelard plants. *International Journal of Agricultural Science and Research* 4: 155-164.
- Sharma, M.; R. Chaudhary; R. Kureel; R. Sengar. 2018. Effects of culture media pH on *In Vitro* shoot multiplication in sugarcane. *International Journal of Chemical Studies* 6: 1308-1310.
- Steiner, A. A. 1984. The universal nutrient solution. International Congress on Soilless Culture. Lunteren. 633-649.
- Türkan, I. and T. Demiral. 2009. Recent developments in understanding salinity tolerance. *Environmental and Experimental Botany* 67: 2-9.
- Yaacob, J. S.; N. Mahmad; R. Mat Taha; N. Mohamed; A. I. Mad Yussof; A. Saleh. 2014. Optimization of culture conditions (Sucrose, pH, and Photoperiod) for *in vitro* regeneration and early detection of somaclonal variation in ginger lime (*Citrus assamensis*). *The Scientific World Journal* 2014: 1-9.

## **CAPÍTULO 4. AGENTES GELIFICANTES ALTERNATIVOS AL AGAR PARA EL CRECIMIENTO *IN VITRO* DE FILODENDRO XANADU**

Moisés Lara-Ascencio<sup>1</sup>, María Andrade-Rodríguez<sup>1\*</sup>, Héctor Sotelo-Nava<sup>1</sup>, Oscar Gabriel Villegas-Torres<sup>1</sup>, Dagoberto Guillén-Sánchez<sup>1</sup>, Porfirio Juárez-López<sup>1</sup>, Teresa de Jesús Rodríguez-Rojas<sup>1</sup>, José Luis Viveros-Ceballos<sup>2</sup>.

<sup>1</sup>Posgrado en Ciencias Agropecuarias y Desarrollo Rural. Facultad de Ciencias Agropecuarias. <sup>2</sup>Centro de Investigaciones Químicas. Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Av. Universidad 1001. 62209. Col. Chamilpa, Cuernavaca, Morelos. México.

\*Autor para correspondencia: maria.andrade@uaem.mx

### **RESUMEN**

El agente gelificante representa un alto costo del medio de cultivo y afecta directamente el crecimiento y desarrollo de los cultivos *in vitro*, por lo que el tipo de agente gelificante y las concentraciones empleadas pueden ser tan importantes como la selección ideal de nutrientes. El objetivo del estudio fue evaluar el crecimiento *in vitro* de plántulas de filodendro xanadu empleando agentes gelificantes menos costosos y de fácil adquisición como una alternativa para sustituir el agar. Se utilizó el medio de cultivo Murashige y Skoog (1962) que fue solidificado con agar, phytigel, carragenina y poliacrilato de potasio variando su concentración. Se evaluó la altura, número de hojas, número de raíces, longitud de raíces, contenido relativo de clorofila de las plantas y el porcentaje de humedad y dureza del medio de cultivo. Los resultados mostraron efecto altamente significativo del agente gelificante en las variables evaluadas, indicando que el medio de cultivo solidificado con phytigel a 1.5 g L<sup>-1</sup> fue el que generó mejor crecimiento de las plantas, mismas que tuvieron altura de 3.3 cm, 7.6 hojas, 1.2 raíces con 12.4 cm de longitud y con mayor contenido de clorofila (40.6 unidades spad); así, como el menor

costo del producto gelificante (\$ 0.9 por litro de medio de cultivo) y por consiguiente fue el más apropiado como sustituto del agar.

**Palabras clave:** agentes gelificantes, filodendro, medios de cultivo, micropropagación.

## SUMMARY

The gelling agent represents a high cost of the culture medium and directly affects the growth and development of *in vitro* cultures, so the type of gelling agent and the concentrations used can be as important as the ideal selection of nutrients. The objective of the study was to evaluate the *in vitro* growth of philodendron xanadu seedlings using less expensive and readily available gelling agents as an alternative to substitute agar. The culture medium Murashige y Skoog (1962) was used, which was solidified with agar, phytigel, carrageenan and potassium polyacrylate, varying its concentration. The height, number of leaves, number of roots, length of roots, relative chlorophyll content of the plants and the percentage of moisture and hardness of the culture medium were evaluated. The results showed a highly significant effect of the gelling agent on the evaluated variables, indicating that the culture medium solidified with phytigel at 1.5 g L<sup>-1</sup> was the one that generated the best growth of the plants, which had a height of 3.3 cm, 7.6 leaves, 1.2 roots with 12.4 cm in length and with a higher content of chlorophyll (40.6 spad units); thus as the lower cost of the gelling product (\$ 0.9 per liter of culture medium) and therefore it was the most appropriate as a substitute for agar.

**Key words:** gelling agents, philodendron, culture media, micropropagation.



## INTRODUCCIÓN

Los medios de cultivo aportan los compuestos nutricionales necesarios para promover crecimiento a los tejidos vegetales establecidos *in vitro*, así como dar sostén a los explantes, por lo que la respuesta morfogénica depende sustancialmente de la composición del medio de cultivo y el agente gelificante empleado. El medio de cultivo MS (Murashige y Skoog, 1962), es el más utilizado porque ha generado buenos resultados para la micropropagación de diversas especies (George *et al.*, 2008).

Se conocen como agentes gelificantes a los componentes del medio de cultivo que se utilizan para que éste permanezca en un estado semisólido y que proporciona sostén al explante. Uno de estos es el agar, constituido por una mezcla de polisacáridos que se extraen de las paredes celulares de las algas rojas *Pterocladia*, *Gelidiella* (Montilla-Escudero *et al.*, 2011); es el agente gelificante más utilizado en el cultivo *in vitro* debido a sus propiedades físico-químicas (Jain y Babbar, 2006; Dobránszki *et al.*, 2011; Montilla-Escudero *et al.*, 2011), pero es el componente más caro en la preparación del medio de cultivo, ya que representa un 70 % del costo total del medio (Mohamed *et al.*, 2010). Al parecer, la causa del alto precio de este insumo es la sobreexplotación, consecuencia de la alta demanda, lo cual ha hecho que sea cada vez más difícil su obtención, elevando así los precios (Romay *et al.*, 2006; Mohamed *et al.*, 2010).

Al respecto, se han realizado estudios buscando agentes gelificantes menos costosos y relativamente puros que provean claridad de los geles, entre ellos están la agarosa y el agar gel, compuestos de polisacáridos obtenidos de *Gelidium*, *Gracillaria* (Dobránszki *et al.*, 2011); gelrite o phytigel que son heteropolisacáridos secretados por bacterias del género *Sphingomonas* o producto de la fermentación de varias especies de *Pseudomonas* (Bajaj *et al.*, 2007); xanthan gum, polisacárido producido por *Xanthomonas campestris* (García-Ochoa *et al.*, 2000; Jain y Babbar, 2006).

El tipo de agente gelificante y las concentraciones a ser empleadas pueden ser tan importantes como la selección de la mezcla ideal de nutrientes. Diversos trabajos han probado la eficacia de los diferentes agentes gelificantes en el desarrollo de los tejidos,

la germinación de embriones somáticos o formación de brotes en especies leñosas, herbáceas o de importancia hortícola (Clapa *et al.*, 2010; Saglam y Cifci, 2010; Dobránski *et al.*, 2011; Veitía *et al.*, 2012).

La propagación *in vitro* de filodendro se realiza utilizando preferentemente agar bacteriológico (Blanco y Valverde, 2004; Chen *et al.*, 2012; El-Shamy, 2015; Alhussein *et al.*, 2020) y pocas veces se usa otro tipo de compuestos como phytagel y carragenos (Hassan *et al.*, 2016).

Se considera que los agentes gelificantes no deben intervenir en el crecimiento y desarrollo del material inoculado (Montilla-Escudero *et al.*, 2011), aunque se ha podido observar en diferentes estudios que el agar no es un componente inerte fisiológicamente, dependiendo de su origen y el proceso de purificación pueden quedar impurezas minerales y orgánicas que modifican las características químicas y físicas del medio de cultivo y que afectan significativamente el desarrollo de los tejidos puesto que posee cantidades variables de sustancias inhibidoras o estimulantes del crecimiento (Dobránski *et al.*, 2011; Veitía *et al.*, 2012), así mismo confiere diferentes particularidades en el potencial hídrico lo que permite una mayor o menor toma de agua y nutrimentos por el tejido, lo que se refleja en las características fisiológicas y morfológicas del explante, causando hiperhidratación y necrosis (Cárdenas y Villegas, 2002; Dobránski *et al.*, 2011; Veitía *et al.*, 2012).

Con base en la importancia de cultivar *in vitro* plantas de filodendro, el objetivo del presente trabajo fue probar y evaluar el efecto de cuatro agentes gelificantes en el crecimiento *in vitro* de filodendro xanadu, para determinar y proponer un agente gelificante alternativo, con igual o mejor eficacia que el agar y que permita disminuir el costo del medio de cultivo sin afectar el crecimiento vegetal.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

La investigación se desarrolló en el laboratorio de propagación vegetal de la Facultad de Ciencias Agropecuarias, en la Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Se

utilizaron plantas de filodendro xanadu cultivadas *in vitro* con longitud de  $16 \pm 2$  mm, tres hojas jóvenes, sin brotes, sin raíces y de tamaño uniforme entre ellas.

### Medio de cultivo

Se usó el medio de cultivo MS (Murashige y Skoog, 1962) suplementado con 3 % de sacarosa, tiamina, glicina, piridoxina, ácido nicotínico ( $0.5 \text{ mg L}^{-1}$ ), e inositol ( $100 \text{ mg L}^{-1}$ ); el pH se ajustó a 5.7. El agente gelificante varió en función del tratamiento. Se prepararon nueve medios de cultivo con cuatro agentes gelificantes en concentración variable (Cuadro 1).

Una vez preparados los medios de cultivo, se dosificaron en alícuotas de 20 mL por frasco de cultivo de 100 mL de capacidad; estos fueron esterilizados durante 18 min en autoclave vertical a  $1.2 \text{ kg cm}^{-2}$  y  $120 \text{ }^{\circ}\text{C}$ .

**Cuadro 1. Productos gelificantes, alternativos al agar para el crecimiento *in vitro* de brotes de filodendro xanadu.**

| Tipo de gelificante     | Cantidad<br>( $\text{g L}^{-1}$ ) | Costo por litro de medio<br>de cultivo (\$) |
|-------------------------|-----------------------------------|---|
| Agar Agar Hycel®        | 9                                 | 30.75                                       |
| Phytigel                | 1.5                               | 0.90  |
| Phytigel                | 2.0                               | 1.20  |
| Phytigel                | 2.5                               | 1.50  |
| Carragenina             | 10                                | 7.50  |
| Carragenina             | 11                                | 8.25  |
| Poliacrilato de potasio | 35                                | 4.55  |
| Poliacrilato de potasio | 40                                | 5.20  |
| Poliacrilato de potasio | 45                                | 5.85  |

En los nueve medios de cultivo, se determinó el porcentaje de humedad (medidor de humedad Kelway HB-2) y la rigidez del medio de cultivo en Newtons (estación de prueba Shimadzu SM-100N-168) después de la esterilización en la autoclave y enfriados a temperatura ambiente (Figura 1, Cuadro 2).



Figura 1. Evaluación de dureza (N) del gel del medio de cultivo MS solidificado con: a) phytigel, b) agar.

Para establecer el experimento de crecimiento, en cada uno de los frascos de los nueve medios de cultivo se colocaron cinco brotes de filodendro xanadu. Los frascos se incubaron a  $28 \pm 2$  °C, con fotoperiodo de 16 h luz y 8 h de oscuridad, intensidad luminosa de  $32 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ , durante 50 días.

### **Diseño experimental**

Se estudiaron nueve tratamientos con seis repeticiones, en un diseño experimental completamente al azar. La unidad experimental estuvo conformada por un frasco de 100 mL de capacidad con 20 mL de medio de cultivo y cinco brotes por frasco.

## **Variables evaluadas y análisis de datos**

Transcurridos 50 días después del establecimiento del experimento, se evaluó la altura de brotes (desde la base hasta la parte superior, con hoja milimétrica), hojas por planta, raíces por planta, longitud de raíz (con hoja milimétrica), contenido relativo de clorofila (CRC) (SPAD 502DL Plus Spectrum<sup>®</sup>, tomando el valor promedio de tres hojas de vida intermedia).

Los datos del experimento se estudiaron mediante análisis de varianza (ANOVA) y se realizó la prueba de comparación de medias Tukey ( $P \leq 0.05$ ), para las variables que tuvieron efecto de los tratamientos, así como una correlación de variables morfológicas con la humedad y dureza de los geles del medio de cultivo, para lo cual se utilizó el paquete estadístico SAS System versión 9.0.

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

El tipo y cantidad de agente gelificante afectó en forma altamente significativa ( $P \leq 0.01$ ) al porcentaje de humedad y la dureza del medio de cultivo (Cuadro 2).

En los medios de cultivo solidificados con poliacrilato de potasio no se observaron diferencias estadísticas en contenido de humedad y dureza, pues se determinó una humedad de 100 %, aún empleado distintas concentraciones del gelificante. El phytigel con  $1.5 \text{ g L}^{-1}$  generó el medio de cultivo con la humedad más alta después del poliacrilato de potasio (59.3 %), seguido por los medios de cultivo solidificados con una mayor concentración del mismo gelificante que fueron estadísticamente iguales entre sí. El medio de cultivo solidificado con agar  $9 \text{ g L}^{-1}$  produjo geles con menor contenido de agua que aquellos en los que se usó phytigel, mientras que los geles con menor humedad disponible fueron donde se usó carragenina (Cuadro 2).

**Cuadro 2. Características físicas de nueve medios de cultivo MS.**

| Tipo de gelificante<br>(g L <sup>-1</sup> ) | Humedad<br>(%) | Dureza<br>(N) |
|---|----------------|---------------|
| Agar (9.0)                                  | 55.6 c         | 0.051 a       |
| Phytigel (1.5)                              | 59.3 b         | 0.015 d       |
| Phytigel (2.0)                              | 58.0 bc        | 0.030 bc      |
| Phytigel (2.5)                              | 58.3 bc        | 0.036 b       |
| Carragenina (10.0)                          | 50.6 d         | 0.015 d       |
| Carragenina (11.0)                          | 50.0 d         | 0.025 c       |
| Poliacrilato de potasio (35.0)              | 100 a          | 0.010 d       |
| Poliacrilato de potasio (40.0)              | 100 a          | 0.011 d       |
| Poliacrilato de potasio (45.0)              | 100 a          | 0.015 d       |
| DMSH (P ≤ 0.05)                             | 3.06           | 0.007         |

DMSH: diferencia mínima significativa honesta. Medias con letras iguales dentro de columna, no son estadísticamente diferentes de acuerdo con la prueba Tukey (P ≤ 0.05).

Con relación a la dureza o rigidez del medio de cultivo, los geles de mayor dureza fueron generados por la adicción de 9 gL<sup>-1</sup> del agar al medio de cultivo. La dureza de los geles aumentó de 0.015 a 0.036, conforme se incrementó la cantidad de phytigel en el medio, y fue 0.015 a 0.036 N menor que la dureza del medio donde se uso agar.

Los medios de cultivo solidificados con phytigel 1.5 gL<sup>-1</sup>, carragenina 10 gL<sup>-1</sup> y poliacrilato de potasio produjeron los geles más suaves, mismos que fueron estadísticamente iguales entre sí. Se pudo observar que a medida que se aumentó la concentración de los gelificantes phytigel y carragenina la dureza de los medios aumenta significativamente, contrario a lo que sucedió con el poliacrilato de potasio cuyos geles presentaron una dureza similar, aunque se hayan usado 5 ó 10 g más de producto (Cuadro 2).

El análisis de varianza indicó que los agentes gelificantes (agar, phytigel y carragenina) tuvieron efecto altamente significativo (P ≤ 0.01) en las variables de crecimiento de filodendro evaluadas (Cuadro 3). Los medios de cultivo gelificados con

poliacrilato de potasio no se incluyeron en el análisis porque el medio de cultivo perdió la consistencia semisólida seis días después de haber establecido el experimento lo que ocasionó que las plantas perdieran soporte, se hiper hidrataran y por lo tanto no se evaluaron.

Los brotes de mayor altura fueron los cultivados en medio solidificado con phytigel 1.5 g L<sup>-1</sup>, seguidos de aquellos cultivados con 10 g L<sup>-1</sup> de carragenina, en tanto que los brotes más pequeños fueron los cultivados con 9 g L<sup>-1</sup> de agar (Figura 2). Se observó que la altura de los brotes fue menor conforme se incrementó la cantidad de gelificante en el medio de cultivo.

Con respecto al número de hojas, los medios con carragenina 10 y 11 gL<sup>-1</sup> fueron estadísticamente superiores al resto, ya que presentaron 8.2 y 8.3 hojas, seguidos de los brotes crecidos en medio con phytigel; los brotes cultivados con agar fueron los que tuvieron menor número de hojas (Cuadro 3).

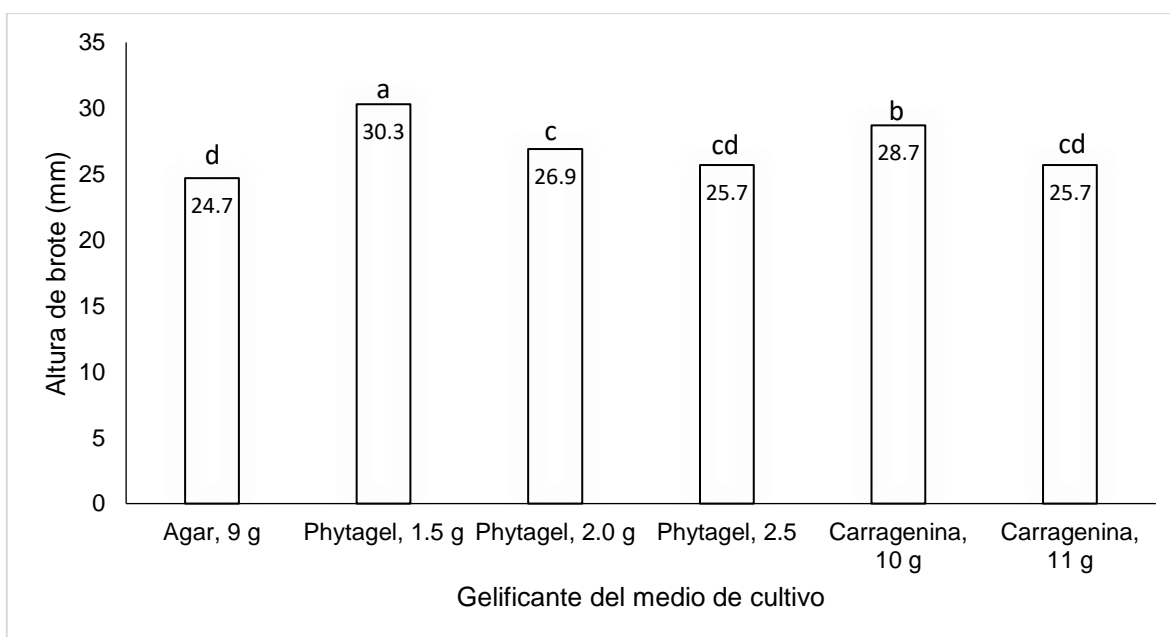


Figura 2. Altura de brotes de filodendro xanadu por efecto del tipo y cantidad de gelificante, DMSH= 1.32.

**Cuadro 3. Efecto del agente gelificante del medio de cultivo en el crecimiento y contenido relativo de clorofila de filodendro xanadu.**

| Tipo de gelificante<br>(g L <sup>-1</sup> ) | Hojas<br>(Núm.) | Raíces<br>(Núm.) | Longitud<br>de raíz<br>(mm) | CRC<br>(U. SPAD) |
|---|-----------------|------------------|-----------------------------|------------------|
| Agar (9.0)                                  | 7.1 c           | 1.0 b            | 61.7 e                      | 40.8 a           |
| Phytigel (1.5)                              | 7.6 bc          | 1.2 a            | 124.0 bc                    | 40.6 a           |
| Phytigel (2.0)                              | 7.9 ab          | 1.0 b            | 145.0 a                     | 36.0 b           |
| Phytigel (2.5)                              | 8.0 ab          | 1.0 b            | 140.5 ab                    | 40.9 a           |
| Carragenina (10.0)                          | 8.3 a           | 1.0 b            | 116.8 cd                    | 33.4 c           |
| Carragenina (11.0)                          | 8.2 a           | 1.0 b            | 102.2 d                     | 41.1 a           |
| DMSH (P ≤ 0.05)                             | 0.52            | 0.15             | 17.37                       | 2.40             |

DMSH: diferencia mínima significativa honesta. Medias con letras iguales en una columna, no son estadísticamente diferentes de acuerdo con la prueba Tukey (P ≤ 0.05).

Con relación al número de raíces, este fue superior en las plantas cultivadas con 1.5 g L<sup>-1</sup> de phytigel, no hubo diferencias estadísticas en número de estos órganos con respecto a los de los brotes cultivados con los otros agentes gelificantes (Cuadro 3).

El mayor crecimiento de las raíces de los brotes ocurrió en el medio con 2.0 g L<sup>-1</sup> de phytigel, seguido de phytigel 2.5 g L<sup>-1</sup>, mientras que la menor longitud ocurrió en los brotes cultivados con 9 g L<sup>-1</sup> de agar.

El contenido relativo de clorofila, evaluado en unidades Spad fue estadísticamente mayor e igual en los brotes que crecieron en los medios solidificados con 9 g L<sup>-1</sup> de agar, phytigel 1.5, phytigel 2.5 y carragenina 11 (g L<sup>-1</sup>) (40.6 a 41.1 unidades Spad).

Las plantas crecidas en el medio de cultivo solidificado con phytigel 2 g L<sup>-1</sup> presentaron valores intermedios (36 unidades Spad). Mientras que las plantas que crecieron en el medio de cultivo solidificado con carragenina 10 g L<sup>-1</sup> registraron los valores de clorofila más bajos (Cuadro 3).



Aunque se empleó el mismo agente gelificante en más de un tratamiento, la respuesta morfológica de las plántulas ocurrió en función de la concentración del gelificante. En términos generales se puede decir que, aunque la composición del medio de cultivo fue la misma, la respuesta de los brotes varió en función del agente gelificante y su concentración (Cuadro 3).

### **Correlación de variables**

Los resultados de la correlación de las variables morfológicas del crecimiento de los brotes de filodendro xanadu se presentan en el cuadro 4.

La altura de los brotes presentó una correlación negativa significativa con la dureza del gel del medio donde estuvieron creciendo, esta correlación fue alta, lo que indica que altura de los brotes fue mayor conforme los geles fueron más suaves; sin embargo, no hubo asociación de esta variable con la humedad retenida en el gel del medio.

En el caso del número de hojas, también se observó una correlación negativa y significativa con la dureza del gel del medio de cultivo; también hubo una asociación negativa altamente significativa con la humedad contenida en el gel. Lo anterior indica que con menor contenido de humedad y dureza del gel los brotes pudieron producir mayor cantidad de hojas.

El número de raíces por brote, tuvo asociación positiva baja y significativa con la humedad del gel, esto significa que a mayor contenido de agua en el gel, los brotes desarrollaron más raíces. Por el contrario, la relación entre número de raíces y dureza del gel fue negativa pero no significativa. Las raíces tuvieron mayor crecimiento al disponer de mayor contenido de agua en el medio, aunque la asociación entre las variables fue baja; por el contrario, la asociación con la dureza del gel fue negativa y altamente significativa. Lo anterior implica que conforme el gel fue más duro las raíces tuvieron menor crecimiento.

**Cuadro 4. Correlaciones entre variables de crecimiento de filodendro xanadu con contenido de humedad y dureza del medio de cultivo.**

| Variable morfológica  | Humedad (%) |              | Dureza (N) |              |
|-----------------------|-------------|--------------|------------|--------------|
| Altura de brotes (mm) | 0.1495      | (p ≤ 0.3840) | -0.7918    | (p ≤ 0.0001) |
| Hojas (Núm.)          | -0.3728     | (p ≤ 0.0251) | -0.5361    | (p ≤ 0.0007) |
| Raíces (Núm.)         | 0.3899      | (p ≤ 0.0187) | -0.3233    | (p ≤ 0.0544) |
| Longitud de raíz (mm) | 0.3669      | (p ≤ 0.0277) | -0.5059    | (p ≤ 0.0016) |
| CRC (U. Spad)         | 0.2564      | (p ≤ 0.1311) | 0.3927     | (p ≤ 0.0178) |

El contenido relativo de clorofila, medido en unidades Spad presentó una correlación significativa moderadamente fuerte con la dureza del gel del medio de cultivo.

Se considera que el mejor crecimiento de filodendro xanadu se tuvo en el medio de cultivo solidificado con 1.5 gL<sup>-1</sup> de phytigel (Figura 3), lo cual puede atribuirse a la humedad disponible en el medio (59.3 %). Probablemente porque en este medio ocurre una liberación de agua y componentes del medio de cultivo acorde a la demanda del explante. Además, un gel más suave permite un mayor desarrollo y crecimiento de raíces, lo cual promueve un mayor crecimiento de la planta debido a la mayor absorción de agua y componentes del medio de cultivo.

Estos resultados concuerdan con lo reportado por otros investigadores que han demostrado que existe relación entre el tipo de agente gelificante empleado y la respuesta morfogénica del explante en el medio de cultivo. Al respecto, Cárdenas y Villegas (2002); Garriaga *et al.* (2006); Hassan *et al.* (2016); Lopez-Escamilla *et al.* (2016); Flores-Hernández *et al.* (2017), señalan que el agente gelificante es el responsable del componente mátrico del potencial hídrico del medio de cultivo y genera una fuerza del gel que es diferente entre las marcas de este debido a sus propiedades fisicoquímicas; esta fuerza influye en la liberación de agua, limita la movilidad de los solutos en el medio y por lo tanto influyen en el crecimiento de los tejidos *in vitro*.



Figura 3. Plántula cultivada en medio de cultivo MS gelificado con  $1.5 \text{ g L}^{-1}$  de phytigel.

Resultados similares a los obtenidos en esta investigación fueron reportados por Lopez-Escamilla *et al.* (2016) quienes mencionan que las plántulas de *Echinocactus* sp. en medio MS solidificado con phytigel alcanzaron una mayor talla (alto y ancho) y que esto pudo deberse a que este agente gelificante proporcionó mayor disponibilidad de agua y nutrimentos. Por su parte, Lucyszyn *et al.* (2005) estudiaron el crecimiento de brotes de manzano (*Malus prunifolia* Borkh.) en medios de cultivo gelificados con mezclas de goma guar-agar y goma cassia-agar, comparadas con un testigo preparado con agar; observaron una mayor proliferación de los brotes de manzano, así como menor hiperhidratación de explantes en los medios de cultivo gelificados con gomas y agar. Además, reportan que utilizar mezclas para sustituir al agar no afecta significativamente la cantidad y longitud de los brotes formados.

Afrasiab y Rabia (2011) utilizaron phytigel como agente gelificante del medio MS para la germinación y organogénesis indirecta en hojas de arroz (*Oryza sativa* L.), con base a los resultados mencionaron que, aunque el porcentaje de germinación, inducción de callo y crecimiento evaluados fueron menores en los medios gelificados con phytigel este gelificante es una alternativa al empleo de agar porque el pH del medio es más

estable con el transcurso de los días y contiene menos impurezas. Por otro lado, Saglam y Cifici (2010) emplearon isubgol como agente gelificante en medios para organogénesis indirecta en hojas de Woad (*Isatis tinctoria*) y al comparar los resultados con medios solidificados con agar obtuvieron mejor respuesta callogénica y de diferenciación en los medios solidificados con isubgol.

Chacón *et al.* (2000) emplearon phytigel para solidificar medios de cultivo para la propagación *in vitro* de *Dioscorea trifida* y *Dioscorea alata* en comparación con agar para comparar el comportamiento de los índices de crecimiento, y observaron diferencias significativas en ambas especie en altura, peso fresco y peso seco, los cuales fueron superiores cuando los medios se gelificaron con phytigel; también mencionan que al aumentar la concentración del gelificante, el crecimiento se vió afectado de manera negativa debido a una mayor consistencia y dureza de los medios, lo que limita la absorción y movilidad de los componentes del medio.

Con respecto a medios de soporte, Labrousse *et al.* (2012), Oh *et al.* (2012), Flores-Hernández *et al.* (2017) encontraron que el phytigel, vermiculita, pulpa de papel y perlita aumentan la conductividad hídrica, lo que favorece la absorción de nutrientes por las plantas, el mejor desarrollo de raíces y mayor supervivencia en la aclimatación.

En concordancia con algunos autores y con base a los resultados obtenidos, el porcentaje de humedad determinados en cada medio de cultivo solidificado es debido principalmente a la disponibilidad del agua que es proporcionada por la fuerza de cada agente gelificante empleado (Adelberg *et al.*, 2013; Lopez-Escamilla *et al.*, 2016) y la dureza del gel que se define como la fuerza que puede ser aplicada a un gel para que se fracture (Kuria *et al.*, 2008; Mbanaso, 2008) son características que tienen fuerte influencia en la germinación, crecimiento y desarrollo *in vitro*. Sin embargo, una mínima variación en la concentración del agente gelificante modifica significativamente las características físicas del medio de cultivo y por consiguiente la respuesta morfogénica de las plantas como ocurrió en esta investigación.

De acuerdo con los resultados obtenidos en esta investigación, los brotes de filodendro xanadu crecen bien en phytigel y carragenina, lo que representa una alternativa para disminuir los costos de preparación de medio de cultivo. Sin embargo, el phytigel

provee los geles de mayor claridad lo cual es una característica deseable e importante de los medios de cultivo para monitorear la morfogénesis y posibles agentes contaminantes, mientras que la carragenina en las concentraciones evaluadas produjo geles opacos. Aunado a lo anterior, el uso de phytigel implica el menor costo por concepto de agente gelificante del medio.

## CONCLUSIONES

El medio de cultivo solidificado con phytigel a  $1.5 \text{ gL}^{-1}$  fue el mejor para promover el crecimiento de las plantas, las cuales presentaron mayor altura, número de raíces y contenido relativo de clorofila, así como un adecuado número de hojas y longitud de raíces. Además, el gel fue más claro y permitió observar fácilmente el desarrollo morfogénico de las plantas; también es el producto gelificante de menor costo por litro de medio de cultivo.

## LITERATURA CITADA

- Adelberg, J.; T. Driesse; S. Halloran; W. C. Bridges. 2013. Relationships between nutrients and plant density in liquid media during micropropagation and acclimatization of turmeric. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant* 49: 724-736.
- Afrasiab, H. and J. Rabia. 2011. Effect of different media and solidifying agents on callogenesis and plant regeneration from different explants of rice (*Oryza sativa* L.) varieties super basmati and IRRI-6. *Pakistan Journal of Botany* 43: 487-501.
- Alhussein, A. A.; D. Y. Hassan; M. S. Alwihibi; A. A. Aldubai; S. El-Hendawy; Y. Naidoo. 2020. Micropropagation of lacy tree *Philodendron (Philodendron bipinnatifidum* Schott ex Endl.). *Hortscience* 55: 294–299.

- Bajaj, I. B.; S. A. Survase; P. S. Saudagar; R. Singhal. 2007. Gellan gum: Fermentative production, downstream processing and applications. *Food Technology and Biotechnology* 45: 341-354.
- Blanco, M. y R. Valverde. 2004. Micropropagación de *Philodendron* sp. (Posiblemente *P. corcovadense*). *Agronomía Costarricense* 28: 39-46.
- Cárdenas, L. M. A. y Villegas M. Á. 2002. Potencial osmótico del medio de cultivo con diferentes componentes para la propagación *in vitro*. *Revista Fitotecnia Mexicana* 25: 213-217.
- Chacón, A. G.; F. Saborío; L. Gómez; S. Torres; R. Valverde. 2000. El tipo de gelificante en el desarrollo *in-vitro* y la aclimatización de plantas de yampi (*Dioscorea trifida*) y ñame (*Dioscorea alata*). *Agronomía costarricense* 24: 57-64.
- Chen, F. C.; C. Y. Wang; J. Y. Fang. 2012. Micropropagation of self-heading *Philodendron* via direct shoot regeneration. *Scientia Horticulturae* 141: 23-29.
- Clapa, D.; A. Fira; I. Pacurar. 2010. *In vitro* propagation of *Pinguicula vulgaris*. *Bulletin UASVM Horticulture* 67: 330-335.
- Dobránszki, J.; K. Magyar-Tábori; E. Tombácz. 2011. Comparison of the rheological and diffusion properties of some gelling agents and blends and their effects on shoot multiplication. *Plant Biotechnology Reports* 5: 345-352.
- El-Shamy, M. A. 2015. Studies on *Philodendron bipinnatifidum* to propagation by *in vitro* culture. *Journal of Biological, Chemical and Environmental Sciences* 10: 23-36.
- Flores-Hernández, L. A.; A. Robledo-Paz; M.J. Jimarez-Montiel. 2017. Medio de cultivo y sustitutos del agar en el crecimiento *in vitro* de orquídeas. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 8: 1315-1328.
- García-Ochoa, F.; V. E. Santos; J. A. E. Gómez. 2000. Xanthan gum: production, recovery, and properties. *Biotechnology Advances* 18: 549- 579.

- Garriga, C. M.; S. Alemán; G. González. 2006. Influencia del estado físico del medio de cultivo y diferentes combinaciones de reguladores del crecimiento sobre la formación de brotes axilares en *Agave fourcroydes* Lem. *Biotecnología vegetal* 6: 3-7.
- George, E. F.; M.A. Hall; De G. Klerk. 2008. Plant Propagation by Tissue Culture. Springer. The Netherlands. 479 p.
- Hassan, H.; M. Ali; D. Soliman. 2016. Effect of low cost gelling agents and some growth regulators on micropropagation of *Philodendron selloum*. *Journal of Plant Production* 7: 169-176.
- Jain, N. and S. B. Babbar. 2006. Xanthan gum: an economical substitute for agar in plant tissue culture media. *Plant Cell Reports* 25: 81-84.
- Kuria, P.; P. Demo; A.B. Nyende; E. M. Kahangi. 2008. Cassava starch as an alternative cheap gelling agent for the *in vitro* micropropagation of potato (*Solanum tuberosum* L.). *African Journal of Biotechnology* 7: 301-307.
- Labrousse, P.; D. Delmail; P. Decou; M. Carlúe; S. Lhernould; P. Krausz. 2012. Nemesia root hair response to paper pulp substrate for micropropagation. *The Scientific World Journal* 1:1-7.
- López-Escamilla, A. L.; M. López-Herrera; C. Loaiza-Alanís. 2016. Efecto de diferentes agentes gelificantes en la germinación y desarrollo *in vitro* de plántulas de *Echinocactus platyacanthus* Link et Otto (Cactaceae). *Polibotánica* 42: 153-166.
- Lucyszyn, N.; A. A. Quoirin; M. R. Sierakowski. 2005. Blends of Agar-Galactomannan for Marubakaido Apple Rootstock Shoot Proliferation. *Polímeros: Ciência e Tecnologia* 15: 146-150.
- Mbanaso, E. N. A. 2008. Effect of multiple subcultures on Musa shoots derived from cassava starch-gelled multiplication medium during micropropagation. *African Journal of Biotechnology* 7: 4491-4494.

- Mohamed, M. A. H.; A. A. Alsadon; M. S. Al Mohaidib. 2010. Corn and potato starch as an agar alternative for *Solanum tuberosum* micropropagation. *African Journal of Biotechnology* 9: 12-16.
- Montilla-Escudero, E. A.; M. F. Dulce-Rivedeneira; B. Quevedo-Hidalgo; M. Mercado-Reyes; R. Álvarez-León; J.N. Molina-Vargas; A. A. Trespalacios-Rangel. 2011. Efecto del tratamiento alcalino sobre la productividad y las propiedades físicas del agar-agar proveniente de *Gracilaria verrucosa*. *Boletín de Investigaciones Marinas y Costeras-INVERMAR* 40: 75-88.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473-497.
- Oh, M. M. S.; J. S. Park; J. E. Son. 2012. Physicochemical properties of mixtures of inorganic supporting materials affect growth of potato (*Solanum tuberosum* L.) plantlets cultured photoautotrophically in a nutrient-circulated micropropagation system. *Horticulture, Environment and Biotechnology* 53:497-504.
- Romay, G.; J. Matheus; A. Gerlts; R. Rueda; M.A. Santana. 2006. Almidón modificado de yuca como sustituto económico del agente solidificante para medios de cultivo de tejidos vegetales. *Interciencia* 3: 686-689.
- Saglam, S. and C. Y. Cifici. 2010. Effects of agar and isubgol on adventitious shoot regeneration of woad (*Isatis tinctoria*). *International Journal of Agriculture and Biology* 12: 281-285.
- Veitía, N.; R. Collado; R.L. García; I. Bermúdez-Caraballosa; D. Torres; C. Romero. 2012. Influencia del agente gelificante en la regeneración de plantas de *Phaseolus vulgaris* L. a partir de callos organogénicos. *Bioteología Vegetal* 12: 143-148.



## CAPÍTULO 5. ENRAIZAMIENTO *IN VITRO* DE FILODENDRO XANADU

Moisés Lara-Ascencio<sup>1</sup>, María Andrade-Rodríguez<sup>1\*</sup>, Héctor Sotelo-Nava<sup>1</sup>, Oscar Gabriel Villegas-Torres<sup>1</sup>, Dagoberto Guillén-Sánchez<sup>1</sup>, Porfirio Juárez-López<sup>1</sup>, Teresa de Jesús Rodríguez-Rojas<sup>1</sup>, José Luis Viveros-Ceballos<sup>2</sup>.

<sup>1</sup>Posgrado en Ciencias Agropecuarias y Desarrollo Rural. Facultad de Ciencias Agropecuarias. <sup>2</sup>Centro de Investigaciones Químicas. Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Av. Universidad 1001. 62209. Col. Chamilpa, Cuernavaca, Morelos. México.

\*Autor para correspondencia: maria.andrade@uaem.mx

### RESUMEN

El proceso de adaptación de una planta establecida en condiciones *in vitro* durante el paso a un medio *ex vitro* es delicado y requiere de condiciones especiales para que las plantas logren adaptarse exitosamente. Además, las plantas deben tener un sistema radical bien desarrollado que les facilitará su adaptación; por lo cual deben cultivarse en un medio especial que promueva el enraizamiento. La investigación tuvo como objetivo evaluar el ácido 3-indolbutírico (AIB) y ácido 3-indolacético (AIA) para determinar la auxina y cantidad más adecuada para el enraizamiento de brotes de filodendro xanadu. Se utilizaron brotes de filodendro xanadu sin raíces, obtenidos por organogénesis directa en condiciones *in vitro*. Se evaluaron cuatro concentraciones de cada auxina (0.5, 1.0, 1.5 y 2.0 mg L<sup>-1</sup>) y un testigo sin auxinas, en el medio de cultivo Murashige y Skoog (1962). El diseño experimental fue completamente al azar. Se evaluó altura de planta, característica de raíz y de hojas. Los resultados indicaron que el medio de cultivo suplementado con 0.5 mg L<sup>-1</sup> de AIB es el medio más apropiado para promover el enraizamiento adecuado de brotes de filodendro xanadu en 17 días, donde se obtuvieron 6.6 raíces con 6 cm de longitud, así como plantas de 4.1 cm con 9.8 hojas y con más clorofila (36.6 unidades spad). El medio de cultivo con AIA, en

cualquiera de las cuatro concentraciones no fue adecuado para el enraizamiento de los brotes de esta especie.

**Palabras clave:** filodendro, auxinas, enraizamiento.

### SUMMARY

The adaptation process of an established plant under *in vitro* conditions during the transition to an *ex vitro* medium is delicate and requires special conditions for the plants to successfully adapt. In addition, plants must have a well-developed root system that will facilitate their adaptation; for which they must be cultivated in a special medium that promotes rooting. The objective of the research was to evaluate indole 3-butyric acid (IBA) and 3-indoleacetic acid (IAA) to determine the most suitable auxin and quantity for rooting shoots of philodendron xanadu. Philodendron xanadu shoots without roots, obtained by direct organogenesis under *in vitro* conditions, were used. Four concentrations of each auxin (0.5, 1.0, 1.5 and 2.0 mg L<sup>-1</sup>) and a control without auxins were evaluated in the culture medium Murashige and Skoog (1962). The experimental design was completely randomized. Plant height, root and leaf characteristics were evaluated. The results indicated that the culture medium supplemented with 0.5 mg L<sup>-1</sup> of IBA is the most appropriate medium to promote adequate rooting of shoots of philodendron xanadu in 17 days, where 6.6 roots with 6 cm in length were contained, as well as plants 4.1 cm with 9.8 leaves and more chlorophyll (36.6 spad units). The culture medium with IAA, in any of the four concentrations, was not suitable for rooting the shoots of this specie.

**Key words:** philodendron, auxins, rooting.

## INTRODUCCIÓN

En la micropropagación de plantas, la fase de aclimatación puede ser crítica, donde el enraizamiento de las vitro plantas es una parte fundamental. El enraizamiento *in vitro* es seguido por la fase de aclimatación de plantas, en condiciones de invernadero, y en la mayoría de los casos se realiza en plantas de difícil enraizamiento *ex vitro* (Sathyanarayana y Barghese, 2007). La formación de raíces adventicias es un proceso inducido y regulado por factores externos como temperatura, luz y composición del medio de cultivo e internos como producción endógena de fitohormonas, carbohidratos y compuestos fenólicos (Pop *et al.*, 2011). Otro aspecto importante son los reguladores de crecimiento utilizados en la fase de multiplicación como las citoquininas y giberelinas empleadas para la multiplicación y alargamiento de brotes o tallos, las cuales se han considerado como inhibidores del enraizamiento (Saini *et al.*, 2013). El material obtenido de la propagación *in vitro* también puede ser enraizado *ex vitro* durante el proceso de aclimatación en condiciones no asépticas y en sustratos como turbas, perlita o arena (Smith, 2012). Aunque esta condición de enraizamiento no es muy recomendable para plantas que tienen tallos acaules como el filodendro.

Los reguladores de crecimiento en los medios de cultivo permiten direccionar la morfogénesis de los tejidos y modificar las respuestas fisiológicas en condiciones *in vitro*. La utilización exógena de auxinas naturales como ácido 3-indolacético (AIA) o sintéticas como ácido naftalenacético (ANA) y ácido 3-indolbutírico (AIB), coadyuva a mejorar y eficientar el proceso de enraizamiento estimulando células indiferenciadas que promueven la iniciación del enraizamiento o emergencia de raíces adventicias por medio de mecanismos de alargamiento celular (Jiménez-Mariña *et al.*, 2009; García *et al.*, 2015).

Se han desarrollado diferentes protocolos de micropropagación para el género *Philodendron* y se ha observado que el enraizamiento *in vitro* ha dado buenos resultados cuando se aplican distintos tipos y concentraciones de auxinas al medio de cultivo. Para el enraizamiento *in vitro* de filodendro xanadu se ha utilizado el medio de cultivo MS con ácido 3-indolbutírico a razón de a razón de 0.5 mg L<sup>-1</sup> (Gangopadhyay

*et al.*, 2004) y medio MS suplementado ya sea con carbón activado o ácido naftalen acético a razón de 1 g L<sup>-1</sup> (Thi Thu *et al.*, 2013) resultando adecuados para el enraizamiento de esta especie. En otras especies como *Philodendron bipinnatifidum* el enraizamiento se ha logrado con el medio de cultivo MS suplementado con 1 a 2 mg L<sup>-1</sup> de ácido naftalen acético (Alawaadh *et al.*, 2020) y también con ácido 3-indolbutírico en concentración de 3 mg L<sup>-1</sup> y el medio MS (El-Shamy, 2015). En otras ocasiones el enraizamiento ocurre en medio de cultivo MS desprovisto de reguladores de crecimiento (Blanco y Valverde, 2004), aunque el número de raíces es menor en comparación de usar auxinas para promover la formación de las raíces.

Debido a la importancia de la especie en estudio, y la necesidad de formar el sistema de raíces para tener la planta completa, el objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto independiente de dos auxinas, ácido 3-indolbutírico (AIB) y ácido 3-indolacético (AIA), en el enraizamiento *in vitro* de brotes de filodendro xanadu, obtenidos a partir de subcultivos sucesivos.

## MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación se llevó a cabo en el laboratorio de micropropagación de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos, en Cuernavaca, Morelos, México.

Para este experimento, se utilizaron plantas de filodendro xanadu cultivadas *in vitro*, con longitud de 18 ± 2 mm, tres hojas jóvenes, sin brotes, sin raíces y de tamaño uniforme entre ellas.

## **Medio de cultivo**

Se usó el medio de cultivo MS (Murashige y Skoog, 1962) suplementado con 3 % de sacarosa, tiamina, glicina, piridoxina, ácido nicotínico ( $0.5 \text{ mg L}^{-1}$ ), e inositol ( $100 \text{ mg L}^{-1}$ ); el pH se ajustó a 5.7. Como agente gelificante se usaron  $7.5 \text{ g L}^{-1}$  de agar Merck®. Se prepararon ocho medios de cultivo que contenían: ácido 3-indolbutírico (AIB: 0.5, 1.0, 1.5 y  $2.0 \text{ mg L}^{-1}$ ) o ácido 3-indolacético (AIA: 0.5, 1.0, 1.5 y  $2.0 \text{ mg L}^{-1}$ ), más un testigo absoluto sin auxinas.

Una vez preparados los medios de cultivo, se dosificaron en alícuotas de 20 mL por frasco de cultivo de 100 mL de capacidad; mismos que fueron esterilizados durante 18 min en autoclave vertical a  $1.2 \text{ kg cm}^{-2}$  y  $120 \text{ }^\circ\text{C}$ . Los frascos de cultivo se establecieron en una cámara de crecimiento con temperatura de  $28 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ , fotoperiodo de 16 horas de iluminación y 8 de oscuridad, intensidad luminosa de  $32 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , en donde estuvieron por 17 días.

## **Diseño experimental**

Se estudiaron nueve tratamientos de enraizamiento de brotes, con cinco repeticiones; se usó un diseño experimental completamente al azar. La unidad experimental fue un frasco de 100 mL con 20 mL de medio de cultivo y cinco explantes por frasco.

## **Variables evaluadas y su análisis**

Transcurridos 17 días después del establecimiento del experimento, se evaluó la altura de brotes (desde la base hasta la parte superior, con hoja milimétrica), hojas por planta, raíces por planta, longitud de raíz (con hoja milimétrica), contenido relativo de clorofila (CRC) (SPAD 502DL Plus Spectrum®, tomando el valor promedio de tres hojas de vida intermedia).

Los datos obtenidos se estudiaron mediante análisis de varianza (ANOVA) y se realizó la prueba de comparación de medias Tukey ( $P \leq 0.05$ ) con el paquete estadístico SAS System versión 9.0.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La concentración de auxina en el medio de cultivo tuvo efecto significativo ( $P \leq 0.05$ ) en la altura y longitud de raíces de los brotes, y altamente significativo ( $P \leq 0.01$ ) para el número de la raíces y contenido relativo de clorofila, mientras que en el número de hojas no hubo diferencias significativas por efecto del tratamiento de auxinas. Lo anterior se atribuye al tipo de auxina y cantidad agregada a cada tratamiento, donde es claramente observado el efecto de cada una en el enraizamiento de los brotes de filodendro y la necesidad de estas para promover el enraizamiento (Cuadro 1).

**Cuadro 1. Cuadrados medios y parámetros estadísticos del ANOVA para variables del crecimiento de filodendro xanadu durante el enraizamiento de brotes por efecto de auxinas.**

| Fuentes de variación | gl | Altura de planta (mm) | Hojas (Núm.) | Raíces (Núm.) | Longitud de raíz (cm) | CRC (U. spad) |
|----------------------|----|-----------------------|--------------|---------------|-----------------------|---------------|
| Auxinas              | 8  | 37.8*                 | 1.19 ns      | 45.9**        | 17.1*                 | 26.9**        |
| Error exp.           | 36 | 11.9                  | 0.8          | 1.0           | 4.1                   | 5.3           |
| C.V. (%)             |    | 9.9                   | 10.7         | 31.8          | 53.2                  | 6.97          |

gl: grados de libertad, CV: coeficiente de variación, \*: efecto significativo ( $P \leq 0.05$ ): \*\*: efecto altamente significativo ( $P \leq 0.01$ ), ns: efecto no significativo.

La altura de las plantas presentó pocas diferencias, la mayoría tuvieron de 3.2 a 3.4 cm. Sin embargo, las plantas que crecieron en el medio de cultivo con  $0.5 \text{ mg L}^{-1}$  de AIB fueron las de mayor altura (41.6 mm), seguidas por aquellas en las que se adicionó  $1 \text{ mg L}^{-1}$  de AIA al medio de cultivo (34.7 mm); como se observa, las plantas cultivadas en el resto de los tratamientos ya sea con la adición de AIB o AIA tuvieron un crecimiento en altura estadísticamente igual (Cuadro 2).

**Cuadro 2. Características morfológicas de brotes de filodendro xanadu *in vitro* evaluados en medios de cultivo MS con dos tipos de auxinas.**

| Auxina<br>(mg L <sup>-1</sup> )               | Altura de planta<br>(mm) | Hojas<br>(Núm.) | Raíces<br>(Núm.) | Longitud de raíz<br>(cm) | CRC<br>(U. spad) |
|---|--------------------------|-----------------|------------------|--------------------------|------------------|
| 0   | 32.5 b                   | 7.9 a           | 0.2 b            | 0.8 b                    | 30.7 b           |
| -----<br>Ácido 3-indolbutírico (AIB)<br>----- |                          |                 |                  |                          |                  |
| 0.5   | 41.6 a                   | 9.8 a           | 6.6 a            | 6.0 a                    | 36.6 a           |
| 1.0   | 34.2 b                   | 8.7 a           | 6.6 a            | 5.8 a                    | 36.6 a           |
| 1.5   | 34.3 b                   | 8.8 a           | 6.6 a            | 5.2 a                    | 33.2 ab          |
| 2.0   | 33.8 b                   | 9.0 a           | 5.6 a            | 5.4 a                    | 33.2 ab          |
| -----<br>Ácido 3-indolacético (AIA)<br>-----  |                          |                 |                  |                          |                  |
| 0.5   | 33.9 b                   | 8.7 a           | 1.0 b            | 3.6 ab                   | 32.1 ab          |
| 1.0   | 34.7 ab                  | 8.7 a           | 0.8 b            | 2.6 ab                   | 33.5 ab          |
| 1.5   | 33.8 b                   | 8.8 a           | 0.6 b            | 2.0 ab                   | 33.7 ab          |
| 2.0   | 32.3 b                   | 8.7 a           | 0.6 b            | 3.2 ab                   | 29.7 b           |
| DMSH  | 7.2                      | 1.97            | 2.1              | 4.26                     | 4.83             |

DMSH: diferencia mínima significativa honesta. Medias con letras iguales en una columna, no son estadísticamente diferentes de acuerdo con la prueba Tukey ( $P \leq 0.05$ ).

El número de hojas en las plantas de los distintos tratamientos de auxinas fue estadísticamente igual pero numéricamente diferente variando de 7.9 a 9.8 hojas; es importante indicar que las hojas de las plantas cultivadas en los medios de cultivo en que se adicionó AIB fueron más grandes, mientras que aquellas cultivadas en medios con AIA fueron de menor tamaño (Cuadro 2). El número de raíces fue mayor y estadísticamente igual en los medios de cultivo en que se adicionó AIB (5.6 a 6.6 raíces por planta); en tanto que en los medios de cultivo en que se adicionó AIA, así como en el medio de cultivo sin auxinas (testigo absoluto), el número de raíces fue reducido y en algunos brotes no hubo desarrollo de raíces.

Al igual que el número de raíces, la longitud de raíz se vió favorecida por las auxinas y fue estadísticamente superior en los medios de cultivo en que se adicionó AIB (5.2 a

6 cm). Las plantas cultivadas en los cuatro medios de cultivo suplementados con AIA presentaron una longitud de raíz estadísticamente igual entre sí y varió de 2 a 3.6 cm; las raíces de estas plantas fueron 51 % más cortas que las enraizadas con AIB. Las plantas que enraizaron en el medio de cultivo sin auxinas tuvieron la menor longitud de raíz (Cuadro 2). Además de existir diferencias significativas para raíz en cuanto a número y longitud, se observó que las raíces de las plantas que crecieron en los medios de cultivo suplementados con AIA no presentaron ramificaciones y éstas fueron de color verde intenso (Figura 1).



Figura 1. Enraizamiento de brotes de filodendro xanadu. a) Formación múltiple de raíces adventicias en brotes por efecto de AIB, b) Plántula completa con raíces bien diferenciadas por efecto del AIB, c) Raíces en brotes cultivados con AIA, d) Plántula cultivada en medio con AIA.



La adición de auxinas y su concentración en el medio de cultivo modificó el contenido relativo de clorofila (CRC) en las plantas cultivadas en los diversos medios de cultivo. Las plantas que estuvieron en medios de cultivo adicionados con 0.5 y 1 mg L<sup>-1</sup> de AIB tuvieron el mayor contenido relativo de clorofila (36.6 unidades spad), seguidas por aquellas que crecieron en los medios suplementados con 1.5 y 2 mg L<sup>-1</sup> de AIB, así como 0.5, 1.0 y 1.5 mg L<sup>-1</sup> de AIA, en las que el CRC varió de 32.1 a 33.7 unidades SPAD; el menor CRC se observó en las plantas cultivadas en el medio con 2 mg L<sup>-1</sup> de AIA y en aquellas en las que no se usaron auxinas (Cuadro 2).

Los resultados obtenidos en esta investigación coinciden con lo reportado por Gangopadhyay *et al.* (2004) quienes obtuvieron el adecuado enraizamiento de filodendro xanadu con la adición de 0.5 mg L<sup>-1</sup> de ácido indol-3-butírico al medio de cultivo. Por su parte, Thi Thu *et al.* (2013) reporta que el filodendro xanadu en medio MS suplementado ya sea con carbón activado o ácido naftalen acético a 1 g L<sup>-1</sup> resultó apropiado para la inducción de raíces en términos de número y longitud después de cuatro semanas de cultivo.

Alawaadh *et al.* (2020) reportan que el 100 % de enraizamiento de brotes de *Philodendron bipinnatifidum* ocurre en el medio MS suplementado con 1 a 2 mg L<sup>-1</sup> de ácido naftalen acético. Por su parte, El-Shamy (2015) reporta que para la propagación *in vitro* de *Philodendron bipinnatifidum*, la auxina más adecuada fue el ácido indol-3-butírico en concentración de 3 mg L<sup>-1</sup>. También Hassan *et al.* (2016) reportan que para la etapa de enraizamiento de *Philodendron selloum* se requiere usar el medio de cultivo MS suplementado con 3 mg L<sup>-1</sup> de ácido 3-indolbutírico. De igual modo, Chen *et al.* (2012) reportan que en estudios realizados con tres cultivares comerciales de filodendro, las plantas enraizaron bien después de un mes de subcultivarse en medio MS con 0.1 a 1 mg L<sup>-1</sup> de AIB.

Contrario a los reportes anteriores, Blanco y Valverde (2004) en estudios realizados para generar el protocolo de propagación *in vitro* de *Philodendron* sp. mencionan que esta especie no requiere del estímulo de auxinas para el enraizamiento, ya que la inducción de raíces ocurrió en un periodo de 3 a 4 semanas, tanto en los medios de cultivo suplementados con auxinas, como en los medios desprovistos de estas.

De acuerdo a los resultados obtenidos en esta investigación y en concordancia con lo reportado por otros autores, cada especie aún del mismo género, puede requerir o no del estímulo de alguna auxina para completar el proceso morfogénico de enraizamiento. En el caso de filodendro xanadu, el enraizamiento requirió sólo de 17 días para tener raíces listas para trasplantar a sustrato.

## CONCLUSIONES

El medio de cultivo MS suplementado con 0.5 mg L<sup>-1</sup> de ácido indol-3-butírico es el más adecuado para propiciar un mejor enraizamiento *in vitro* de brotes de filodendro xanadu en un periodo de 17 días. Por el contrario, el medio de cultivo suplementado con ácido 3-indolacético no es adecuado para el enraizamiento *in vitro* de brotes de filodendro xanadu.

## LITERATURA CITADA

- Alawaadh, A. A.; Y. H. Dewir; M. S. Alwihibi; A. A. Aldubai; S. El-Hendawy; Y. Naidoo. 2020. Micropropagation of lacy tree Philodendron (*Philodendron bipinnatifidum* Schott ex Endl.). *HortScience* 55: 294-299.
- Blanco, M. y R. Valverde. 2004. Micropropagación de *Philodendron* sp. (Posiblemente *P. corcovadense*). *Agronomía Costarricense* 28: 39-46.
- Chen, F. C.; C. Y. Wang; J. Y. Fang. 2012. Micropropagation of self-heading Philodendron via direct shoot regeneration. *Scientia Horticulturae* 141: 23-29.
- El-Shamy, M. A. 2015. Studies on *Philodendron bipinnatifidum* to propagation by *in vitro* culture. *Journal of Biological, Chemical and Environmental Sciences* 10: 23-36.

- Gangopadhyay, G.; T. Bandyopadhyay; S. B. Gangopadhyay; K. K. Mukherjee. 2004. Luffa sponge - A unique matrix for tissue culture of *Philodendron*. *Current Science* 86: 315-319.
- García, G. J.; E. Salas A.; J. Azofeifa B. 2015. Efecto del AIA y el AIB sobre el enraizamiento *in vitro* de brotes de *Sechium edule* (Jacq.) Sw. *Biotecnología Vegetal* 15: 3-7.
- Hassan, H.; M. Ali; D. Soliman. 2016. Effect of low cost gelling agents and some growth regulators on micropropagation of *Philodendron selloum*. *Journal of Plant Production* 7: 169-176.
- Jiménez-Mariña, L.; M. Fonseca-Arias; A. García-Alcántara; S. Infante-Fonseca; J. Vázquez-Rodríguez. 2019. Efecto de diferentes concentraciones de Ácido Indolacético (AIA) en el enraizamiento *in vitro* de *Dahlia* sp. *Cultivos Tropicales* 40: 1-11.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473-497.
- Pop, T.; P. Doru; C. Bellini. 2011. Auxin control in the formation of adventitious roots. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca* 39: 307-316.
- Saini, S.; I. Sharma; N. Kaur; P. K. Pati. 2013. Auxin: a master regulator in plant root development. *Plant Cell Reports* 32: 741-757.
- Sathyanarayana, B. and D. Barghese. 2007. Plant tissue culture: practices and new experimental protocols. I.K. International Pvt Ltd., India. 316 p.
- Smith, R. 2012. Plant tissue culture: Techniques and experiments. Academic Press Elsevier, Londres, UK. 208 p.
- Thị Thu, H. P.; N. H. Thanh; L. Thị Thùy; T. N. Thị; D. T. Thị Thanh; N. P. T. Thị. 2013. Nhân nhanh *in vitro* cây trầu bà cánh phượng (*Philodendron xanadu*). *Journal, Science & Development* 11: 826-832.

## **CAPÍTULO 6. MEZCLAS DE SUSTRATOS PARA LA ACLIMATACIÓN DE PLÁNTULAS DE FILODENDRO XANADU EN INVERNADERO**

Moisés Lara-Ascencio<sup>1</sup>, María Andrade-Rodríguez<sup>1\*</sup>, Héctor Sotelo-Nava<sup>1</sup>, Oscar Gabriel Villegas-Torres<sup>1</sup>, Dagoberto Guillén-Sánchez<sup>1</sup>, Porfirio Juárez-López<sup>1</sup>, Teresa de Jesús Rodríguez-Rojas<sup>1</sup>, José Luis Viveros-Ceballos<sup>2</sup>.

<sup>1</sup>Posgrado en Ciencias Agropecuarias y Desarrollo Rural. Facultad de Ciencias Agropecuarias. <sup>2</sup>Centro de Investigaciones Químicas. Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Av. Universidad 1001. 62209. Col. Chamilpa, Cuernavaca, Morelos. México.

\*Autor para correspondencia: maria.andrade@uaem.mx

### **RESUMEN**

Las plantas obtenidas por micropropagación deben pasar por una etapa de aclimatación (adaptación *ex vitro*) antes de ser establecidas en un sitio definitivo, esta etapa es considerada crítica por el estrés al que se someten las plantas debido a diversos factores. El sustrato es considerado uno de los factores más importantes para la adaptación y crecimiento de plántulas, por lo que es importante definir en la mayoría de los casos una mezcla de componentes que satisfagan este criterio. El objetivo de este estudio fue evaluar mezclas de sustratos en la adaptación y crecimiento de plántulas de filodendro xanadu obtenidas por micro propagación, durante el periodo de aclimatación en condiciones de invernadero, para determinar la mezcla más adecuada para la adaptación exitosa y el crecimiento óptimo de esta especie. Se elaboraron nueve mezclas con los sustratos: ocochal molido, polvo de coco, turba, vermiculita y agrolita. El experimento se estableció bajo un diseño experimental completamente al azar. Se evaluaron las características físicas y químicas de las mezclas, las variables de respuesta fisiológica al trasplante y aclimatación (respuesta de inicio de crecimiento y porcentaje de aclimatación), altura, número de hojas, diámetro del tallo, número de

raíces, volumen de raíces y contenido relativo de clorofila. A los 52 días con un 100 % de éxito en la aclimatación de las plántulas en las distintas mezclas de sustratos, los resultados indicaron que la mezcla 5 conformada por ocochal molido 70 %, polvo de coco 10 %, turba 10 %, agrolita 10 % fue la más adecuada para la aclimatación y crecimiento de las plántulas, porque produjo las plantas de mejores características en el menor tiempo.

**Palabras clave:** mezclas de sustratos, aclimatación, plántulas.

### SUMMARY

Plants obtained by micropropagation must go through an acclimatization stage (*ex vitro* adaptation) before being established in a definitive site, this stage is considered critical due to the stress to which the plants are subjected due to various factors. The substrate is considered one of the most important factors for the adaptation and growth of seedlings, so it is important to define in most cases a mixture of components that satisfy this criterion. The objective of this study was to evaluate substrate mixtures in the adaptation and growth of philodendron xanadu seedlings obtained by micropropagation, during the acclimatization period under greenhouse conditions, to determine the most suitable mixture for successful adaptation and optimal growth of this species. Nine mixtures were made with the substrates: ground ocochal, coconut powder, peat, vermiculite and agrolite. The experiment was established under a completely random design. The physical and chemical characteristics of the mixtures, the variables of physiological response to transplantation and acclimatization (response at the beginning of growth and percentage of acclimatization), height, number of leaves, stem diameter, number of roots, volume of roots and relative chlorophyll content were evaluated. At 52 days with 100 % success in the acclimatization of the seedlings in the different mixtures of substrates, the results indicated that mix 5 made up of ground ocochal 70 %, coconut powder 10 %, peat 10 %, agrolite 10 % it was the most suitable for the acclimatization and growth of the seedlings, because it produced the plants with the best characteristics in the shortest time.

**Key words:** substrate mixtures, acclimatization, seedlings.

## INTRODUCCIÓN

El género *Philodendron* (Araceae) está conformado por 447 especies registradas (The Plant List, 2019). Las distintas especies de filodendros son muy apreciados por la belleza de su follaje, tolerancia a distintos ambientes y por sus distintos hábitos de crecimiento. Las plantas de este género han ganado popularidad en las últimas 4 décadas, debido en mayor parte al aumento en la introducción de nuevos híbridos que poseen colores vistosos y tamaños compactos (Chen *et al.*, 2012).

La propagación *in vitro* de especies vegetales es una alternativa valiosa para la propagación de especies de interés económico y ornamental, debido a que posibilita la producción de grandes cantidades de plantas en un período de tiempo relativamente corto (Espinoza-Reyes *et al.*, 2019).

El éxito de las técnicas de cultivo de tejidos depende esencialmente de tener bien establecido un protocolo que incluya las diferentes etapas del proceso, como son la propagación, el enraizamiento y la aclimatación de las plantas (Resende *et al.*, 2015).

La aclimatación de plantas cultivadas *in vitro* es la última fase del proceso de micropropagación y es considerada una etapa crítica, donde se determina la sobrevivencia y establecimiento de las plántulas (Lesar *et al.*, 2012). La etapa crítica ocurre durante el trasplante de la plántula a condiciones *ex vitro* (procedente de condiciones *in vitro*) y el inicio de emisión de raíces, pues ocurre un desbalance hídrico entre la transpiración y absorción de agua (Rodríguez *et al.*, 2015). Al comenzar la fase de aclimatación, las plantas deben ajustar su fisiología estomática a las condiciones de evapotranspiración imperantes en el nuevo ambiente y activar la toma de agua y nutrientes a través del sistema radical (Bonilla *et al.*, 2015).

Los sustratos utilizados en el proceso de aclimatación y endurecimiento son variados, deben permitir un buen drenaje y a la vez mantener los niveles de humedad requeridos; además, se debe evitar la contaminación con patógenos, lo anterior tiene como propósito permitir la fácil adaptación al nuevo medio de supervivencia (Bonilla *et al.*, 2015).

Para la aclimatación de plántulas de filodendro se han propuesto distintas mezclas de sustratos en las que la aclimatación se ha realizado con éxito y se ha logrado un 100 % de supervivencia del material micropropagado empleando turbas, agrolita, vermiculita, arenas, fibra de coco, cáscara de arroz quemada, entre otros (Chen *et al.*, 2012; Thi Thu *et al.*, 2013; El-Shamy, 2015; Hassan *et al.*, 2016; Alawaadh *et al.*, 2020).

A pesar del éxito que se ha tenido en la aclimatación de plántulas de filodendro con el empleo de las mezclas de sustratos antes mencionadas, dichas mezclas están conformadas por sustratos fuertemente demandados, costosos e incluso importados como las turbas, lo que incrementa considerablemente los costos de producción. Con base en la importancia de la aclimatación de plántulas de filodendro xanadu obtenidas mediante propagación *in vitro* y concretar un protocolo de propagación costeable, el objetivo del presente trabajo fue diseñar y evaluar mezclas de sustratos para la adaptación exitosa y óptimo crecimiento en condiciones de invernadero.

## MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio se realizó en un invernadero de propagación ubicado en Cliserio Alanis, Jiutepec, Morelos, a una altura de 1366 msnm con temperaturas promedio de 36/12 °C (día/noche).

Se utilizaron plántulas de filodendro xanadu cultivadas *in vitro*, con sistema de raíz, altura de  $38 \pm 2$  mm y de tamaño uniforme entre ellas; se removió el agar de las plantas y estas se lavaron con agua para eliminar por completo el medio de cultivo, procurando no dañar las raíces.

### Mezclas de sustratos

Se emplearon sustratos comerciales: Ocochal molido (Om), Polvo de coco (Pc), Turba (T), Vermiculita (V) y Agrolita (A), los cuales fueron preparados mediante trituración y tamizado hasta tener una textura media de 5 mm de diámetro. El polvo de coco y turba

fueron lavados con agua dos veces. Posteriormente, se prepararon las mezclas indicadas en el cuadro 1.

**Cuadro 1. Composición de mezclas de sustratos para la aclimatación de plántulas de filodendro xanadu en condiciones de invernadero.**

| Mezcla de sustratos | Sustratos          |                   |           |                 |              |
|---------------------|--------------------|-------------------|-----------|-----------------|--------------|
|                     | Ocochal molido (%) | Polvo de coco (%) | Turba (%) | Vermiculita (%) | Agrolita (%) |
| 1                   | 50                 | 20                | 20        | 10              | --           |
| 2                   | 50                 | 20                | 20        | --              | 10           |
| 3                   | 60                 | 10                | 10        | 10              | 10           |
| 4                   | 70                 | 10                | 10        | 10              | --           |
| 5                   | 70                 | 10                | 10        | --              | 10           |
| 6                   | 80                 | 10                | --        | 10              | --           |
| 7                   | 80                 | 10                | --        | --              | 10           |
| 8                   | 85                 | --                | --        | 15              | --           |
| 9                   | 85                 | --                | --        | --              | 15           |

Una vez elaboradas las mezclas de sustratos, se determinaron las características físicas y químicas de cada una: porcentaje de humedad (medidor de humedad Kelway HB-2), densidad aparente, densidad real, porcentaje de espacio poroso y pH (potenciómetro, SOIL TESTER) (Cuadro 2).

Se utilizaron charolas de polietileno de 72 cavidades las cuales se prepararon con la mezcla de sustratos correspondiente, se aplicó agua hasta el punto de saturación y posteriormente se realizó el trasplante. El trasplante se realizó extrayendo las plantas de los frascos donde fueron cultivadas *in vitro*, se retiró el agar de las raíces, luego las plantas se sumergieron en una solución de Captan® a razón de 2 g L<sup>-1</sup> para posteriormente ser establecidas en el sustrato de las charolas, hasta el cuello. Finalmente, las charolas fueron cubiertas con un domo de plástico transparente (Figura 1) y colocadas en condiciones de media sombra.



**Cuadro 2. Características físicas y químicas de mezclas de sustratos para la aclimatación de filodendro xanadu en condiciones de invernadero.**

| Mezcla de sustratos (%)       | Humedad (%) | Densidad aparente (g cm <sup>3</sup> ) | Densidad real (g cm <sup>3</sup> ) | Espacio poroso (%) | pH  |
|-------------------------------|-------------|--|------------------------------------|--------------------|-----|
| 1: Om50, Pc 20, T20, V10      | 82          | 0.24                                   | 0.33                               | 38                 | 5.6 |
| 2: Om50, Pc 20, T20, A10      | 85          | 0.27                                   | 0.35                               | 30                 | 5.5 |
| 3: Om60, Pc 10, T10, V10, A10 | 85          | 0.29                                   | 0.41                               | 41                 | 5.6 |
| 4: Om70, Pc 10, T10, V10      | 74          | 0.27                                   | 0.46                               | 70                 | 5.6 |
| 5: Om70, Pc 10, T10, A10      | 80          | 0.30                                   | 0.49                               | 63                 | 5.6 |
| 6: Om80, Pc 10, V10           | 70          | 0.32                                   | 0.51                               | 59                 | 5.7 |
| 7: Om80, Pc 10, A10           | 64          | 0.36                                   | 0.49                               | 36                 | 5.6 |
| 8: Om85, V 15                 | 60          | 0.38                                   | 0.52                               | 37                 | 5.6 |
| 9: Om85, A 15                 | 65          | 0.33                                   | 0.50                               | 52                 | 5.6 |

Om: ocochal molido, Pc: polvo de coco, T: turba, V: vermiculita, A: Agrolita

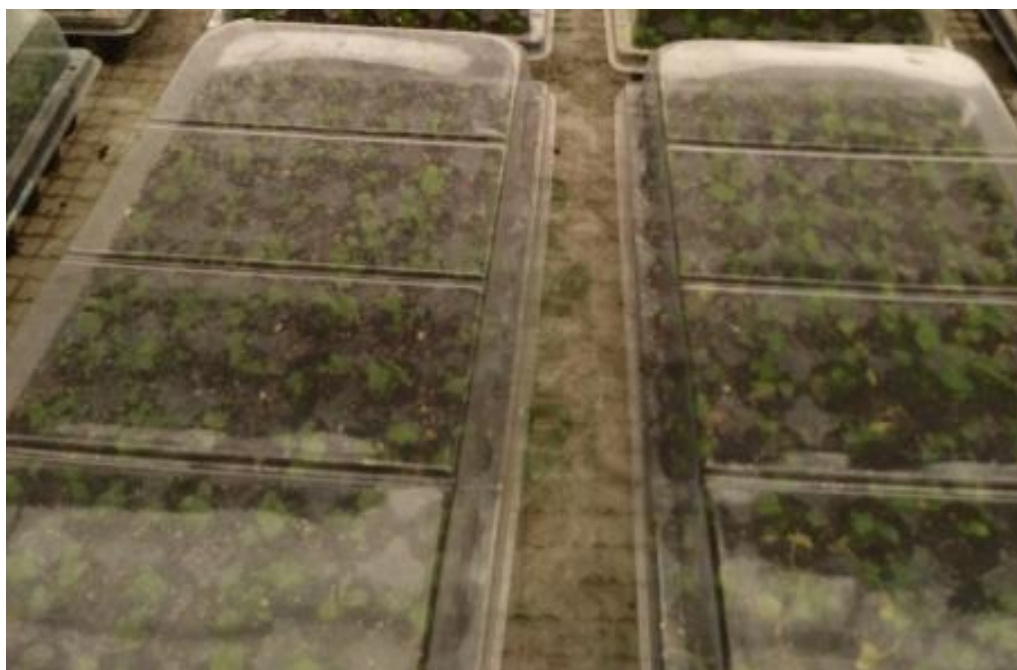


Figura 1. Plántulas de filodendro xanadu al momento de iniciar el periodo de aclimatación.

## **Diseño experimental**

El experimento se estableció en un diseño experimental completamente al azar con tres repeticiones y cinco plantas por repetición (en cada repetición inicialmente se establecieron 10 plantas y al momento de evaluar el experimento únicamente se tomaron cinco plantas de tamaño homogéneo).

A partir de los 7 días después del trasplante, una vez que se retiró el domo plástico, las plantas fueron regadas cada tercer día con agua y cada 7 días se aplicó el riego junto con la solución Steiner (1984) al 50 % de su concentración. A los 14 días después del trasplante, se realizó una aplicación de Terrazole<sup>®</sup>, junto con el riego, a razón de 1 g L<sup>-1</sup> para evitar la incidencia de enfermedades.

## **VARIABLES EVALUADAS Y ANÁLISIS DE DATOS**

Las plantas fueron evaluadas a los 7 y 9 días para las variables de respuesta fisiológica al trasplante – aclimatación (respuesta de inicio de crecimiento y porcentaje de aclimatación, %); la altura, número de hojas, diámetro del tallo, número de raíces, volumen de raíces y contenido relativo de clorofila se evaluaron a los 52 días, cuando las plantas de al menos un tratamiento presentaron de 3 a 5 hojas nuevas y las raíces habían colonizado el sustrato.

Los datos de las variables se estudiaron mediante análisis de varianza (ANOVA) y en las variables donde hubo efecto de tratamientos, se realizó la prueba de comparación de medias Tukey ( $P \leq 0.05$ ) con el paquete estadístico SAS System versión 9.0.

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

La variable de respuesta inicio de crecimiento en días (aparición de la primera hoja en condiciones *ex vitro*) varió en función de la composición de cada mezcla, en las plantas establecidas en las mezclas de sustratos 2, 3, 4 y 5, la primera hoja se observó a los

7 días después del trasplante, mientras que en las plantas establecidas en las mezclas 1, 6, 7, 8 y 9 la primera hoja se observó a los 9 días después del trasplante (Figura 2).

El porcentaje de aclimatación de las plántulas fue 100 % en las distintas mezclas de sustratos evaluadas (Figura 2 y 3). Lo que indica que cualquiera de las nueve mezclas pudieran ser adecuadas para aclimatar las plantas de filodendro.

La calidad y tamaño adecuado de la plántula de filodendro xanadu utilizada, así como el sistema radical bien desarrollado fueron factores importantes durante la fase de aclimatación, ya que estas características repercuten en la supervivencia, la velocidad de reinicio del crecimiento y la producción final (Espinoza-Reyes *et al.*, 2019).

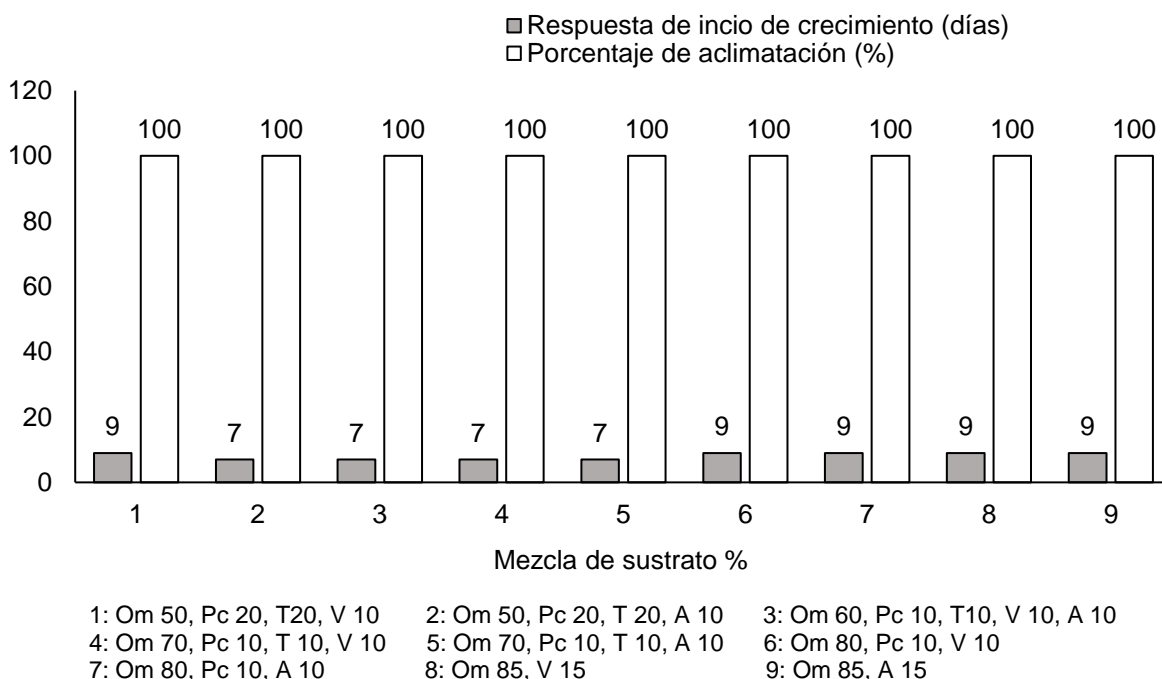


Figura 2. Respuesta de inicio de crecimiento y porcentaje de aclimatación de plántulas de fiodendro xanadu en nueve mezclas de sustratos en condiciones de invernadero.



Figura 3. Aclimatación exitosa de plántulas de filodendro xanadu a los nueve días después del trasplante.

Los resultados obtenidos en esta investigación respecto de la aclimatación exitosa en condiciones de invernadero concuerdan parcialmente con lo reportado en otras investigaciones. Thi Thu *et al.* (2013) aclimataron plántulas *in vitro* de filodendro xanadu en condiciones de invernadero empleando cuatro sustratos diferentes, el porcentaje de supervivencia de las plántulas que obtuvieron fue del 100 % en todos los sustratos; las plántulas aclimatadas que mostraron el mejor crecimiento y desarrollo fueron las cultivadas en una mezcla de fibra de coco y cáscara de arroz quemada (1:1).

Chen *et al.* (2012) tras desarrollar el protocolo de propagación *in vitro* de tres cultivares de filodendro lograron aclimatar exitosamente el 100 % de las plántulas micropropagadas al usar una mezcla compuesta por 80 % peat moss y 10 % agrolita después de mantenerlas 2 meses en condiciones de invernadero con una temperatura de 25 a 30 °C y una humedad relativa de 70 a 100 %. Por su parte Alawaadh *et al.* (2020) realizó estudios en *Philodendron bipinnatifidum* para optimizar la propagación masiva de esta especie, reportaron una tasa de supervivencia del 100 % empleando

una mezcla estéril compuesta por 50 % peat moss y 50 % agrolita durante 30 días, temperatura media de  $25 \pm 2$  °C y humedad relativa de 50 a 60 % con un fotoperiodo de 16 horas luz. Respecto a aclimatación, El-Shamy (2015) desarrolló el protocolo de propagación *in vitro* de *Philodendron bipinnatifidum* y reportó haber obtenido 100 % de supervivencia de las plántulas cultivadas en macetas de plástico llenas de turba y arena en una proporción de 4:1, en condiciones de invernadero. También Hassan *et al.* (2016), realizaron estudios para reducir los costos de producción de la propagación *in vitro* de *Philodendron selloum* y reportaron una supervivencia de 100 % durante la aclimatación de esta especie empleando como sustrato una mezcla de vermiculita y turba en proporción 1:1.

Las plántulas cultivadas durante 52 días en condiciones de invernadero mostraron diferencias durante su crecimiento, presentaron hojas turgentes y vigorosas, totalmente extendidas, brillantes y de color verde oscuro característico de la especie (Figura 4).



Figura 4. Plantas de filodendro xanadu a los 52 días después del trasplante, cultivadas en la mezcla de sustrato 5 (Ocochal molido, 70 %: Polvo de coco, 10 %: Turba, 10 %: Agrolita, 10 %).

La composición de las mezclas de sustratos empleadas en la aclimatación de plántulas de filodendro xanadu en condiciones de invernadero tuvo efecto altamente significativo ( $P \leq 0.01$ ) en la altura, diámetro del tallo, número de raíces, volumen de raíces y contenido relativo de clorofila, excepto para el número de hojas de las plantas (Cuadro 3). Lo anterior puede atribuirse a la proporción de sustratos con que se elaboró cada mezcla, así como también a las características físicas y químicas de estas.

**Cuadro 3. Cuadrados medios y parámetros estadísticos del ANOVA para variables de crecimiento de filodendro xanadu, por efecto de mezclas de sustratos durante la aclimatación.**

| Fuentes de variación | gl  | Altura de planta (mm) | Hojas (Núm.) | Diámetro del tallo (mm) | Raíces (Núm.) | Volumen de raíz (ml) | CRC (U. spad) |
|----------------------|-----|-----------------------|--------------|-------------------------|---------------|----------------------|---------------|
| Sustratos            | 8   | 4.97**                | 1.40 ns      | 1.74**                  | 3.52**        | 0.10**               | 13.84**       |
| Error exp.           | 108 | 0.44                  | 1.10         | 0.16                    | 0.63          | 0.02                 | 4.59          |
| C.V. (%)             |     | 6.64                  | 12.08        | 8.87                    | 16.99         | 14.86                | 6.84          |
| R <sup>2</sup>       |     | 0.72                  | 0.23         | 0.71                    | 0.57          | 0.51                 | 0.42          |

gl: grados de libertad, C.V.: coeficiente de variación, R<sup>2</sup>: coeficiente de determinación, \*\*: efecto altamente significativo ( $P \leq 0.01$ ), ns: efecto no significativo.

Las plantas que fueron aclimatadas con la mezcla 5 fueron las de mayor altura (11.65 mm), seguidas de las cultivadas con la mezcla 9 (11.12 mm), mientras que las cultivadas en la mezcla 6 fueron las de menor altura (8.98 mm) (Figura 5).

El mayor número de hojas fue obtenido en las plantas que crecieron en la mezcla 5, seguidas por las plantas cultivadas en las mezclas 2, 3, 4, 6, 7 y 8, sin diferencias estadísticas entre estas mezclas; el menor número de hojas se cuantificó en las mezclas 1 y 9 (Cuadro 4).

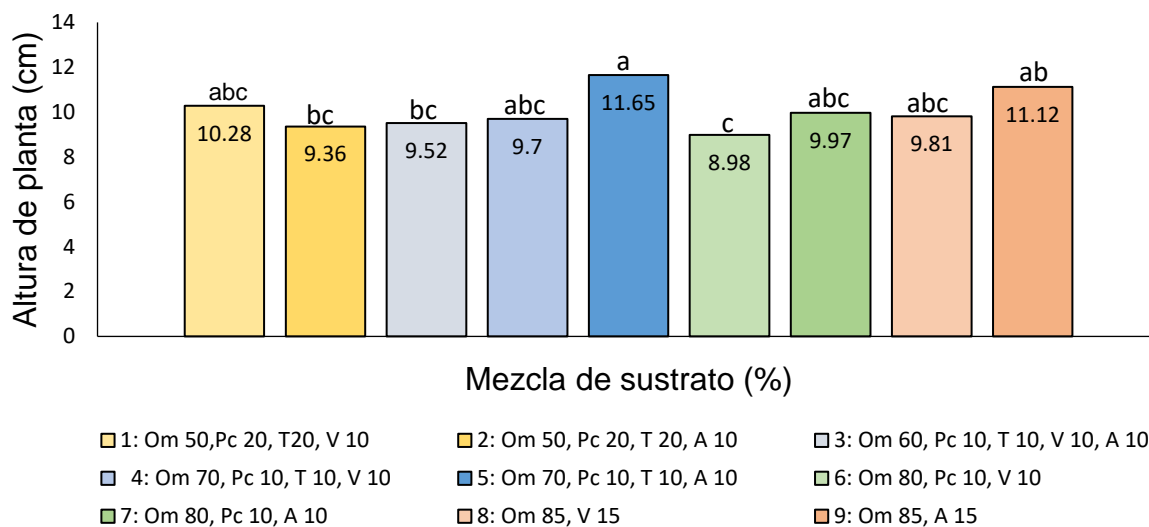


Figura 5. Altura de planta de filodendro xanadu por efecto de la mezcla de sustrato durante la aclimatación. DMS=1.94.

El diámetro de tallo fue mayor en las plantas crecidas en la mezcla 5 (5.46 mm), seguido por las plantas de la mezcla 1 (5.09 mm), el menor diámetro del tallo ocurrió en las mezclas 3 y 4 (3.73 y 3.66 mm respectivamente) (Cuadro 4).

El número de raíces se vió favorecido en la mezcla 5 (6.4 raíces) compuesta por Om /0, Pc 10, T 10 y A 10, seguidas por aquellas de las plantas cultivadas en las mezclas 6 y 8 (5 raíces); en contraste el menor número de estos órganos ocurrió en las plantas de la mezcla 3 (3.8 raíces) (Figura 6).

La mezcla 6 generó el mayor volumen de raíz (1.26 mL), las mezclas 1, 3, 5, 7 y 9 produjeron valores estadísticamente iguales, mientras que el menor volumen de estos órganos ocurrió en las mezclas 2, 4 y 8 sin diferir estadísticamente (Cuadro 4).

El cuanto al contenido relativo de clorofila CRC, este fue mayor en las plantas de la mezcla 5 (33.68 U. SPAD), seguido de las plantas cultivadas en las mezclas 1, 2, 3, 6 y 7 donde los valores fueron estadísticamente iguales, el menor CRC se cuantificó en las plantas de las mezclas de sustratos 4, 8 y 9 (Cuadro 4).

**Cuadro 4. Efecto de la composición de mezclas de sustratos en el crecimiento de plantas de filodendro xanadu durante el periodo de aclimatación.**

| Mezcla de sustratos<br>(%)       | Hojas<br>(Núm.) | Diám. de tallo<br>(mm) | Vol. de raíz<br>(mL) | CRC<br>(U. spad) |
|----------------------------------|-----------------|------------------------|----------------------|------------------|
| 1: Om 50, Pc 20, T20, V 10       | 8.26 b          | 5.09 ab                | 1.03 ab              | 31.18 ab         |
| 2: Om 50, Pc 20, T 20, A 10      | 8.53 ab         | 4.56 bc                | 0.89 b               | 31.90 ab         |
| 3: Om 60, Pc 10, T10, V 10, A 10 | 8.66 ab         | 3.73 d                 | 1.13 ab              | 31.94 ab         |
| 4: Om 70, Pc 10, T 10, V 10      | 8.53 ab         | 3.66 d                 | 0.93 b               | 29.90 b          |
| 5: Om 70, Pc 10, T 10, A 10      | 9.66 a          | 5.46 a                 | 1.02 ab              | 33.68 a          |
| 6: Om 80, Pc 10, V 10            | 8.86 ab         | 4.74 bc                | 1.26 a               | 33.02 ab         |
| 7: Om 80, Pc 10, A 10            | 8.86 ab         | 4.70 bc                | 0.96 ab              | 30.48 ab         |
| 8: Om 85, V 15                   | 8.53 ab         | 4.38 c                 | 0.94 b               | 30.20 b          |
| 9: Om 85, A 15                   | 8.40 b          | 4.92 abc               | 1.11 ab              | 29.78 b          |
| DMSH                             | 1.23            | 0.54                   | 0.31                 | 3.40             |

DMSH: diferencia mínima significativa honesta. Medias con letras iguales en una columna, no son estadísticamente diferentes de acuerdo con la prueba Tukey ( $P \leq 0.05$ ).

Con base a los resultados obtenidos y en concordancia con otros autores, los sustratos con alto contenido de materia orgánica como la composta, turbas, composta de pino, polvo de coco, tierra de monte (ocochal), entre otros, al usarse solos o en proporción con otros sustratos generan plantas de mejores características (Fúnez *et al.*, 2009; Hamim *et al.*, 2011; Martiñon y Aragón, 2014; Ördögh, 2020). Por lo tanto, la aclimatación exitosa en las mezclas de sustratos empleadas y el crecimiento armónico de las plantas en este estudio pueden atribuirse a la alta proporción de materia orgánica en cada mezcla que varió de 85 a 90 %. De acuerdo con González *et al.* (2005) las bondades de los sustratos compostados o semicompostados se deben a la gran disponibilidad de nutrientes asimilables, buena concentración de ácidos húmicos y relación adecuada de carbono/nitrógeno, los cuales están influenciadas por el tiempo de humificación de la composta. Martiñon y Aragón (2014) obtuvieron el mejor porcentaje de germinación y crecimiento de plantas



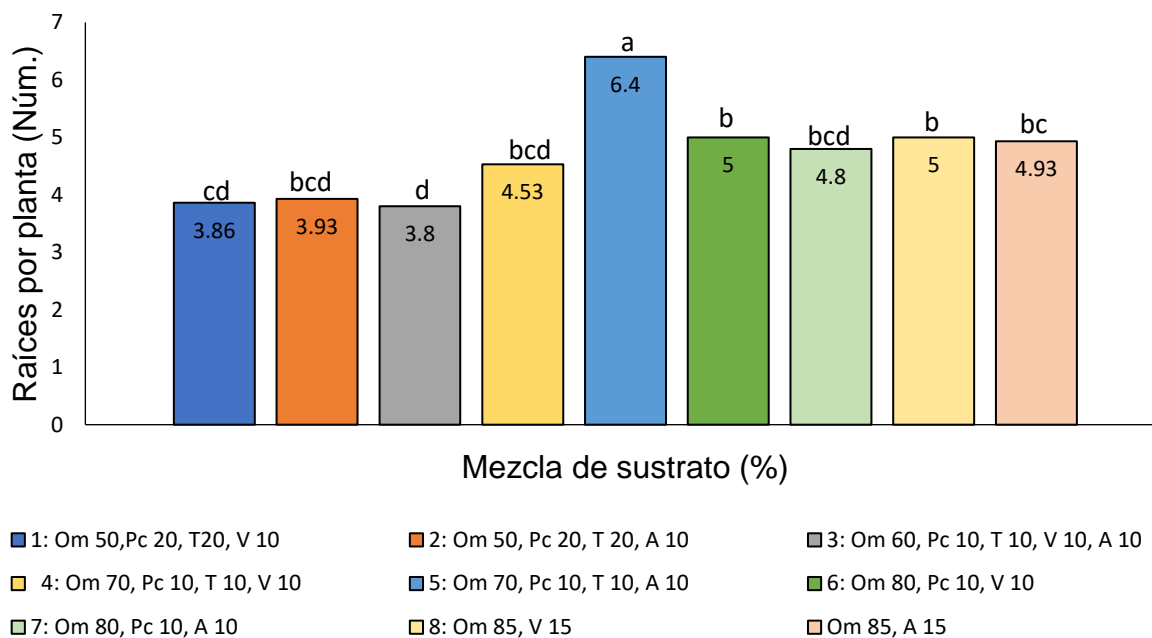


Figura 6. Raíces por planta de filodendro xanadu, por efecto de la mezcla de sustrato durante la aclimatación. DMS=1.08.

de *Jatropha* empleando composta y tierra de monte, las plántulas cultivadas en tierra de monte y composta fueron las plantas de mayor altura, diámetro de tallo, y número de hojas.

En contraste con un estudio realizado por Ördögh (2020) quien evaluó diferentes sustratos en la propagación por esquejes de *Philodendron erubescens* encontró que los productos comerciales BRT GreenMoss y ASB Greenworld, mismos que están elaborados a base de turbas, perlita y vermiculita fueron los más adecuados para la propagación de esta especie, pues generaron mayor número de brotes, mayor longitud y ancho de hojas y mayor contenido total de clorofila y carotenoides.

Por su parte Tuwo y Tambaru (2021) en un estudio para encontrar un método eficiente de aclimatación para plantas micropropagadas de *Colocasia esculenta* (Araceae) evaluaron diferentes mezclas de sustratos y encontraron que la mezcla compuesta por suelo, estiércol y cáscara de arroz en proporción 1: 1: 1 generó una supervivencia de 62 % y plantas con mayor altura y número de hojas respecto de mezclas donde se

adicionó cacarilla de arroz, polvo de coco o arena. Al respecto, El-Sayed *et al.* (2016) en experimentos para establecer un protocolo de micropropagación de *Colocasia esculenta* evaluaron mezclas de sustratos compuestas por vermiculita, turba y arena y encontraron que la mezcla elaborada con vermiculita y turba (1:1) generó el porcentaje más alto de supervivencia (69.7%) así como plantas con mayor altura y número de hojas.

### **Correlación de variables**

Los resultados de la correlación de las variables morfológicas del crecimiento de los brotes de filodendro xanadu durante el periodo de aclimatación en invernadero con las mezclas de sustratos empleadas se presentan en el cuadro 5.

Como puede observarse no hubo alguna asociación significativa de las variables morfológicas con las características de los sustratos empleados, excepto para la variable de volumen de raíz con el pH de las mezclas de sustratos donde se presentó una correlación significativa positiva alta, lo que indica que a mayor pH en el sustrato, el volumen de raíz aumentó.

De acuerdo con Espinosa-Reyes *et al.* (2019), los factores que más influyen en la aclimatación de plántulas *in vitro* son el tipo de sustrato y su composición, el cual determina una adecuada retención de humedad y los componentes químicos para proveer a la planta de agua y nutrientes; además ejerce una influencia significativa en la arquitectura del sistema radical, lo que influye en el estado nutricional y la translocación de agua en las plantas. Por ello, es necesario prestar especial atención a su selección y uso.

De acuerdo con los resultados obtenidos y a lo reportado por otros autores, las mezclas de sustratos empleadas en la aclimatación de distintos filodendros comparten sustratos similares que aun en distintas proporciones proveen un medio de adaptación óptimo para la etapa de aclimatación. Debido a que la aclimatación de plantas cultivadas *in vitro* es la última fase de la micropropagación y se considera una etapa crítica porque define la sobrevivencia y adaptación de las plántulas (Lesar *et al.*, 2012),

**Cuadro 5. Correlaciones entre variables de crecimiento de filodendro xanadu con características de sustratos utilizados en la etapa de aclimatación.**

| Variable morfológica    | Humedad (%)             | Densidad aparente (g cm <sup>3</sup> ) | Densidad real (g cm <sup>3</sup> ) | Espacio poroso (%)      | pH                      |
|-------------------------|-------------------------|--|------------------------------------|-------------------------|-------------------------|
| Altura de planta (mm)   | -0.0484<br>(p ≤ 0.9015) | 0.03165<br>(p ≤ 0.9356)                | 0.1905<br>(p ≤ 0.6234)             | 0.2726<br>(p ≤ 0.4779)  | -0.1111<br>(p ≤ 0.7759) |
| Hojas (Núm.)            | 0.0880<br>(p ≤ 0.8217)  | 0.1836<br>(p ≤ 0.6363)                 | 0.4176<br>(p ≤ 0.2633)             | 0.4101<br>(p ≤ 0.2729)  | 0.2012<br>(p ≤ 0.6036)  |
| Diámetro del tallo (mm) | -0.0508<br>(p ≤ 0.8966) | 0.0493<br>(p ≤ 0.8997)                 | 0.0541<br>(p ≤ 0.8900)             | -0.0291<br>(p ≤ 0.9407) | 0.0760<br>(p ≤ 0.8458)  |
| Volumen de raíz (mL)    | -0.0198<br>(p ≤ 0.9596) | 0.0420<br>(p ≤ 0.9146)                 | 0.2575<br>(p ≤ 0.5035)             | 0.3119<br>(p ≤ 0.4138)  | 0.7817<br>(p ≤ 0.0128)  |
| CRC (U. spad)           | 0.5370<br>(p ≤ 0.1359)  | -0.2498<br>(p ≤ 0.5168)                | -0.0922<br>(p ≤ 0.8133)            | 0.1649<br>(p ≤ 0.6714)  | 0.2008<br>(p ≤ 0.6043)  |

es importante diseñar y emplear mezclas con los sustratos evaluados en esta investigación, lo cual será útil para obtener éxito en la aclimatación de plántulas del género *Philodendron*.

Los resultados obtenidos en la aclimatación exitosa también pueden atribuirse al buen manejo agronómico realizado durante esta fase, a las condiciones ambientales en las cuales se desarrolló el experimento, a las características de las mezclas de sustratos y a las características de la especie.

## CONCLUSIONES

La mezcla de sustratos 5 conformada por ocochal molido 70 %, polvo de coco 10 %, turba 10 %, y agrolita 10 % presentó mejores cualidades para la aclimatación y crecimiento de plántulas de filodendro xanadu provenientes de cultivo *in vitro* ya que promueve una respuesta de inicio de crecimiento más rápida y genera plantas de

mayor altura, número de hojas, diámetro de tallo, contenido relativo de clorofila y número de raíces.

## LITERATURA CITADA

- Alawaadh, A. A.; Y. H. Dewir; M. S. Alwihibi; A. A. Aldubai; S. El-Hendawy; Y. Naidoo. 2020. Micropropagation of lacy tree Philodendron (*Philodendron bipinnatifidum* Schott ex Endl.). *HortScience* 55: 294-299.
- Bonilla, M.; C. Mancipe; C. Aguirre. 2015a. Conservación *in vitro*: una perspectiva para el manejo de los Recursos Fitogenéticos. *Revista de Investigación Agraria y Ambiental* 6: 67-81.
- Chen, F. C.; C. Y. Wang; J. Y. Fang. 2012. Micropropagation of self-heading *Philodendron* via direct shoot regeneration. *Scientia Horticulturae* 141: 23-29.
- El-Sayed, S. F.; A. A. Gharib; A. M. El-Sawy; O. S. Darwish. 2016. Micropropagation protocol of Egyptian native cultivar of taro, *Colocasia esculenta* var. *esculenta*. *International Journal of Advanced Research in Biological Sciences* 3: 17-26.
- El-Shamy, M. A. 2015. Studies on *Philodendron bipinnatifidum* to propagation by *in vitro* culture. *Journal of Biological, Chemical and Environmental Sciences* 10: 23-36.
- Espinosa-Reyes, A.; J. J. Silva-Pupo; M. Bahi-Arevich; D. Romero-Cabrera. 2019. Influencia del tamaño de las plantas *in vitro* y tipo de sustrato en la aclimatación de *Morus alba* L. *Pastos y Forrajes* 42: 23-29.
- Fúnez, O. E. N.; G. J. Arévalo; J. C. Q. Pack. 2009. Comparación de sustratos para la siembra de piñón (*Jatropha curcas*) en etapa de vivero, finca Santa Lucía, Choluteca, Honduras. *Ceiba* 50:58-65.

- González, V. J.; L. J. Cajuste; T. A. Santos; G. F. Reyes; S. P. García. 2005. Análisis químico de compost y efecto de su adición sobre la producción de biomasa en zarzamora. *Revista Terra Latinoamericana* 23: 285-292.
- Hamim, H.; A. Sutrisna; B. Heliyanto; M. Cholid. 2011. Shoot and root growth of *Jatropha curcas* accessions prospective for rootstock on rocky and heavy soil. *Journal Life Science* 5: 942-953.
- Hassan, H.; M. Ali; D. Soliman. 2016. Effect of low cost gelling agents and some growth regulators on micropropagation of *Philodendron selloum*. *Journal of Plant Production* 7: 169-176.
- Lesar, H.; B. Hlebec; N. Čeranič; D. Kastelec; Z. Luthar. 2012. Acclimatization of terrestrial orchid *Bletilla striata* Rchb.f. (Orchidaceae) propagated under *in vitro* conditions. *Acta agriculturae Slovenica* 99: 69-75.
- Martiñón, M. A. S. y S. A. Aragón. 2018. Evaluación de sustratos y genotipos en la germinación de jatropha con potencial comestible (*Jatropha* spp.). *Revista Mexicana De Ciencias Agrícolas* 5: 1179-1192.
- Ördögh, M. 2020. The effect of substrates on different characteristics of philodendron erubescens cuttings. *Review on Agriculture and Rural Development* 8: 53-59.
- Resende, C. F.; R. E. Bianchetti; A. M. S. Oliveira; V. F. Braga; P. H. P. Peixoto. 2015. *In vitro* propagation and acclimatization of *Lippia rotundifolia*, an endemic species of Brazilian Campos Rupestres. *Revista Ciencia Agronomica* 46:582-589.
- Rodríguez, B. M.; R. Carrillo L.; M. Chacón F.; N. Hormazábal V.; J. Tampe P.; R. Tighe N. 2015. Enraizamiento *in vitro* y *ex vitro* de microtallos de *Ugni molinae* Turcz., una especie nativa de Chile. *Gayana Botánica* 72: 14-20.
- Steiner, A. A. 1984. The universal nutrient solution. International Congress on Soilless Culture. Lunteren. 633-649.
- The Plant List. 2019. Philodendron. [En línea]. <http://www.theplantlist.org/browse/A/Araceae/Philodendron/> Fecha de acceso: 2-febrero-2019.

Thị Thu, H. P.; N. H. Thanh; L. Thị Thùy; T. N. Thị; D. T. Thị Thanh; N. P. T. Thị .2013. NHÂN NHANH *IN VITRO* CÂY TRẦU BÀ CÁNH PHƯỢNG (*Philodendron xanadu*). *Journal, Science & Development* 11: 826-832.

Tuwo, M. and E. Tambaru. 2021. The growing of taro *Colocasia esculenta* (L.) Schott var. antiquorum plantlet in several media during acclimatization stage. *IOP Conf. Series: Earth and Environmental Science*. 1-6.

## Establishment of *in vitro* aseptic culture of *Philodendron xanadu* Croat<sup>1</sup>

### Establecimiento del cultivo aséptico *in vitro* de filodendro xanadu

Moises Lara-Ascencio<sup>2</sup>, María Andrade-Rodríguez<sup>2\*</sup>, Dagoberto Guillén-Sánchez<sup>2</sup>, Héctor Sotelo-Nava<sup>2</sup> and Oscar Gabriel Villegas-Torres<sup>2</sup>

**Abstract** - The philodendron is a plant with a high sales price; however, in Mexico there is not enough plant material available for the producers of this ornamental. Therefore, the objective of this research was to establish an *in vitro* aseptic culture of philodendron; for this, the effect of fungicides and bactericides applied from the transplantation of mother plants to the production and harvest of explants (axillary shoots) for *in vitro* establishment was evaluated. Two experiments were carried out using MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) culture medium; in the second, silver nanoparticles (AgNPs) were added to the culture medium. Both experiments were established in a completely randomized experimental design. It was observed that with the joint action of the sanitizing products in the treatment of mother plants and in the disinfection process, as well as the addition of AgNPs to the culture medium, it was possible to establish an aseptic culture of philodendron. Results show that 2 g L<sup>-1</sup> of Agry-Gent Plus 5000\* plus 2 g L<sup>-1</sup> of Prozycar\* in the treatment of mother plants was the one generated the highest percentage of aseptic explants (25.71%) in the first *in vitro* establishment, while, in the second experiment, the same products plus the addition of AgNPs to the culture medium for seven days generated 100% aseptic explants. The contaminants identified were yeasts, *Aspergillus* sp. and *Penicillium* sp.

**Key words:** *Philodendron*. Sanitizers. Vitro pathogens. Asepsis. Micropropagation.

**RESUMO** - O filodendro é uma planta com alto preço de venda, entretanto, no México não há material vegetal suficiente disponível para os produtores desta ornamental. Portanto, o objetivo desta pesquisa foi estabelecer uma cultura *in vitro* asséptica de filodendro, para isso, avaliou-se o efeito de fungicidas e bactericidas aplicados desde o transplante de plantas-mãe até a produção e colheita de explantes (brotos axilares) para estabelecimento *in vitro*. Dois experimentos foram realizados usando meio de cultura MS, no segundo, nanopartículas de prata (AgNPs) foram adicionadas ao meio de cultura. Ambos os experimentos foram estabelecidos em um delineamento experimental inteiramente casualizado. Observou-se que com a ação conjunta dos saneantes no tratamento das plantas-mãe e no processo de desinfecção, bem como a adição de AgNPs ao meio de cultura, foi possível estabelecer uma cultura asséptica do filodendro. Os resultados indicaram que 2 g L<sup>-1</sup> de Agry-Gent Plus 5000® mais 2 g L<sup>-1</sup> de Prozycar® no tratamento de plantas-mãe foi o que gerou a maior porcentagem de explantes assépticos (25,71%) no primeiro estabelecimento *in vitro*, enquanto, no segundo experimento, os mesmos produtos mais a adição de AgNPs ao meio de cultura por sete dias geraram explantes 100% assépticos. Os contaminantes identificados foram leveduras, *Aspergillus* sp. e *Penicillium* sp.

**Palavras-chave:** Filodendro. Sanitizantes. Patógenos vitro. Asepsia. Micropropagação.

DOI: 10.5935/1806-6690.20210024

Editor-in-Chief: Prof. Bruno Lessa - bruno.lessa@univasf.edu.br

\*Author for correspondence

Received for publication on 28/11/2019; approved on 23/11/2020

<sup>1</sup>Investigation that is part of the thesis of the first author, Doctorado en Ciencias Agropecuarias y Desarrollo Rural, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Cuernavaca, Morelos, México

<sup>2</sup>Posgrado en Ciencias Agropecuarias y Desarrollo Rural, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Autónoma del Estado de Morelos (UAEM), Cuernavaca, Morelos, México. moises.crops@hotmail.com (ORCID ID 0000-0002-8247-3842), maria.andrade@uaem.mx (ORCID ID 0000-0003-0757-742X), dagoguillen@yahoo.com (ORCID ID 0000-0001-5958-4969), hectorsotelo@uaem.mx (ORCID ID 0000-0002-0926-9191), voscar66@yahoo.com (ORCID ID 0000-0001-9885-3906)



Cuernavaca, Morelos, 16 de noviembre de 2021.

**Asunto:** Voto Aprobación de Tesis.

**MTRO. JESÚS EDUARDO LICEA RESÉNDIZ**  
**DIRECTOR DE LA FACULTAD DE CIENCIAS**  
**AGROPECUARIAS.**  
**P R E S E N T E.**

Por medio del presente informo a usted que después de revisar el trabajo de tesis titulado: **EVALUACIÓN Y DETERMINACIÓN DE TÉCNICAS DE CULTIVO *IN VITRO* PARA LA PROPAGACIÓN DE FILODENDRO XANADU (*Philodendron xanadu*)** que presenta el **M. en C. MOISES LARA ASCENCIO**, mismo que fue desarrollado bajo mi dirección, y que servirá como requisito parcial para obtener el grado de **DOCTOR EN CIENCIAS AGROPECUARIAS Y DESARROLLO RURAL**, lo encuentro satisfactorio, por lo que emito mi **VOTO DE APROBACIÓN** para que el alumno continúe con los trámites necesarios para presentar el examen de grado correspondiente.

Sin más por el momento y agradeciendo de antemano su valiosa colaboración, quedo de usted.

Atentamente  
***Por una humanidad culta***

**DRA. MARÍA ANDRADE RODRÍGUEZ**  
**Comité Evaluador**

C.i.p. Archivo

Av, universidad 1001 Col. Chamilpa, Cuernavaca, Morelos, México 62209  
Tel (777)3297046, 3297000 Ext. 3304. fagropecuarias@uaem.mx







UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

### Sello electrónico

**MARIA ANDRADE RODRIGUEZ** | Fecha:2021-11-16 19:14:00 | Firmante

X1ea4Yo3zNd/LmbZ3GAYvhy870tI4lg2Z1IfOo5H/KN3At0D9hXWwQAXt+KNU6uuwk1ENR2adtwd8cxEKHeERXmefzIwdKNRf/86saDn1tdqsrqWYyxBQRvRuv+jFXE+4vNxb8V  
O7qKHUFvQDCnxqEPWH/qzUr/CS8CXWsj6DXbTv8ZIFc1oxbpLP2mwoIrzklX4EJPvF90ocScdUnT2D8BnPBKgH10EiuljUJ3HG17Xp2UMUKzs4V19ZGQW28H6RSXJVhIjM1E  
DJLaXIACVUpYMpryGuQgdknhLAzYf9qlqQqHo945hWXohcEU7Hy13RAUq6H7dV0zV7BtVcrJNw==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o  
escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[AH1TqVOvJ](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/ZB6khYj72ErnReWXaoQfQNJI8LZEtO5v>





Cuernavaca, Morelos, 16 de noviembre de 2021.

**Asunto:** Voto Aprobación de Tesis.

**MTRO. JESÚS EDUARDO LICEA RESÉNDIZ**  
**DIRECTOR DE LA FACULTAD DE CIENCIAS**  
**AGROPECUARIAS.**  
**P R E S E N T E.**

Por medio del presente informo a usted que después de revisar el trabajo de tesis titulado: **EVALUACIÓN Y DETERMINACIÓN DE TÉCNICAS DE CULTIVO *IN VITRO* PARA LA PROPAGACIÓN DE FILODENDRO XANADU (*Philodendron xanadu*)** que presenta el **M. en C. MOISES LARA ASCENCIO**, mismo que fue desarrollado bajo la dirección de la **DRA. MARÍA ANDRADE RODRÍGUEZ**, y que servirá como requisito parcial para obtener el grado de **DOCTOR EN CIENCIAS AGROPECUARIAS Y DESARROLLO RURAL**, lo encuentro satisfactorio, por lo que emito mi **VOTO DE APROBACIÓN** para que el alumno continúe con los trámites necesarios para presentar el examen de grado correspondiente.

Sin más por el momento y agradeciendo de antemano su valiosa colaboración, quedo de usted.

Atentamente  
*Por una humanidad culta*

**DR. OSCAR GABRIEL VILLEGAS TORRES**  
**Comité Evaluador**

C.i.p. Archivo

Av, universidad 1001 Col. Chamilpa, Cuernavaca, Morelos, México 62209  
Tel (777)3297046, 3297000 Ext. 3304. fagropecuarias@uaem.mx





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

### Sello electrónico

**OSCAR GABRIEL VILLEGAS TORRES | Fecha:2021-11-17 10:04:01 | Firmante**

busqW6ZCRqaMQXI4LOaDhe2Wvj+Pb5XgYI032fmp5xFMqfX4J5UsMKWXX0gCn/R5Z5qv+zAslZENuEimZicrrPgogFEVUPKqspiO+5Nx4+0yo2CYmIVYNKaFaZxKGGbnrhGfLgl3QMvLU5JDE3eOQ/gI+WSE5uo6EI1MHtoUoWABvjVNgeXMfbGXMqUSgpGxx23oxCul4em82rtC0bHpelOIGncUTMgAlyF7IgmMmKEJ62gdp4Y8H5rg5h9IHgSE0BU+led1Olxqm0+p/nojcmXfxNZdyw2qJVDE4QTK0142ycCYjAPZHDX2DWpNzAvKLoBFcDix4YncBvtTHPig==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[AbePfu04T](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/a1SipMDWdGKmUI0SQ8tDFYaydQwKZI4>





Cuernavaca, Morelos, 16 de noviembre de 2021.

**Asunto:** Voto Aprobación de Tesis.

**MTRO. JESÚS EDUARDO LICEA RESÉNDIZ**  
**DIRECTOR DE LA FACULTAD DE CIENCIAS**  
**AGROPECUARIAS.**  
**P R E S E N T E.**

Por medio del presente informo a usted que después de revisar el trabajo de tesis titulado: **EVALUACIÓN Y DETERMINACIÓN DE TÉCNICAS DE CULTIVO *IN VITRO* PARA LA PROPAGACIÓN DE FILODENDRO XANADU (*Philodendron xanadu*)** que presenta el **M. en C. MOISES LARA ASCENCIO**, mismo que fue desarrollado bajo la dirección de la **DRA. MARÍA ANDRADE RODRÍGUEZ**, y que servirá como requisito parcial para obtener el grado de **DOCTOR EN CIENCIAS AGROPECUARIAS Y DESARROLLO RURAL**, lo encuentro satisfactorio, por lo que emito mi **VOTO DE APROBACIÓN** para que el alumno continúe con los trámites necesarios para presentar el examen de grado correspondiente.

Sin más por el momento y agradeciendo de antemano su valiosa colaboración, quedo de usted.

Atentamente  
*Por una humanidad culta*

**DR. JOSÉ LUIS VIVEROS CEBALLOS**  
**Comité Evaluador**

C.i.p. Archivo

Av, universidad 1001 Col. Chamilpa, Cuernavaca, Morelos, México 62209  
Tel (777)3297046, 3297000 Ext. 3304. fagropecuarias@uaem.mx





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

### Sello electrónico

JOSE LUIS VIVEROS CEBALLOS | Fecha:2021-11-16 19:34:58 | Firmante

4PM0ZhpSGL+veU3NFwU30+doox6FCudBJxqUrYLKtlotLLOxoHagPWNgOVzxlFWxjVZKcRIqwtraIn9Q5Zsh7WrSTq26CoidL8u4sUV/pit4fTgqbS3D4uotNkhivdhd+4FKGMHE5wWqYpCxY3ekSsQkkrrt/bdmhhqfFcfIFn89n2F/RiNSymCxZy7JWHilXiD3B1oyyeokPmNsRrFR8nKHQCcXI+4p3R3hMUGgPP/KcXJQEIzH+5RI/AcGBKg7vrCSzswcK+matp8M5FVJ2WLYDf/scToZb4lJ41x6xbnWaQvBoSy75zVEOC5rQQoQolJmchZ+TPLA7GJ4q7QIKQ==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



Y5hkyog2

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/oCXTOFAPbM5BgjyuXpis6N1QefTJGRtE>





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS



FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS  
JEFATURA DE PROGRAMAS EDUCATIVOS DE POSGRADO

Cuernavaca, Morelos, 16 de noviembre de 2021.

**Asunto:** Voto Aprobación de Tesis.

**MTRO. JESÚS EDUARDO LICEA RESÉNDIZ**  
**DIRECTOR DE LA FACULTAD DE CIENCIAS**  
**AGROPECUARIAS.**  
**P R E S E N T E.**

Por medio del presente informo a usted que después de revisar el trabajo de tesis titulado: **EVALUACIÓN Y DETERMINACIÓN DE TÉCNICAS DE CULTIVO *IN VITRO* PARA LA PROPAGACIÓN DE FILODENDRO XANADU (*Philodendron xanadu*)** que presenta el **M. en C. MOISES LARA ASCENCIO**, mismo que fue desarrollado bajo la dirección de la **DRA. MARÍA ANDRADE RODRÍGUEZ**, y que servirá como requisito parcial para obtener el grado de **DOCTOR EN CIENCIAS AGROPECUARIAS Y DESARROLLO RURAL**, lo encuentro satisfactorio, por lo que emito mi **VOTO DE APROBACIÓN** para que el alumno continúe con los trámites necesarios para presentar el examen de grado correspondiente.

Sin más por el momento y agradeciendo de antemano su valiosa colaboración, quedo de usted.

Atentamente  
*Por una humanidad culta*

**DR. HÉCTOR SOTELO NAVA**  
**Comité Evaluador**

C.i.p. Archivo

Av, universidad 1001 Col. Chamilpa, Cuernavaca, Morelos, México 62209  
Tel (777)3297046, 3297000 Ext. 3304. fagropecuarias@uaem.mx





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

### Sello electrónico

**HECTOR SOTELO NAVA | Fecha:2021-11-16 21:10:44 | Firmante**

qZ6hVH3vBPwIjNgKjsZWTo2htfdUjWM8sjJUaRfKzJpZQJTzLhGzfk84Oiw63KqxcpldzUf3EgaNkgezk6XSVcoebQO56HrIXWq2jsPPdwJO4hHyGZyhkqPPdkSO2M0IRTLzdn/9wNHcLFpfeeG/+3fJkgYxQv8IS74a3/PLY34zP3yE/I0cVbSQPA8DPYFWkuDww9ZsTLSh5Tgeu46hEi2DnrQu39/A+uqC/GuZwO1Cfr6aTRq1aScLoaj4Qk+lzKbOPH5mxJGtO7f00M8/EuzZSE/GDV1st3WQjYAFuz1QEYnpbVyvvcC31inWl5aS2ft1FS5aEGd7jOCfKIsZAw==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[qwcls0YCj](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/7GtBuElh8ksnLJ9V8jgmmmd1EL6TEjTCu>





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS



FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS  
JEFATURA DE PROGRAMAS EDUCATIVOS DE POSGRADO

Cuernavaca, Morelos, 16 de noviembre de 2021.

**Asunto:** Voto Aprobación de Tesis.

**MTRO. JESÚS EDUARDO LICEA RESÉNDIZ**  
**DIRECTOR DE LA FACULTAD DE CIENCIAS**  
**AGROPECUARIAS.**  
**P R E S E N T E.**

Por medio del presente informo a usted que después de revisar el trabajo de tesis titulado: **EVALUACIÓN Y DETERMINACIÓN DE TÉCNICAS DE CULTIVO *IN VITRO* PARA LA PROPAGACIÓN DE FILODENDRO XANADU (*Philodendron xanadu*)** que presenta el **M. en C. MOISES LARA ASCENCIO**, mismo que fue desarrollado bajo la dirección de la **DRA. MARÍA ANDRADE RODRÍGUEZ**, y que servirá como requisito parcial para obtener el grado de **DOCTOR EN CIENCIAS AGROPECUARIAS Y DESARROLLO RURAL**, lo encuentro satisfactorio, por lo que emito mi **VOTO DE APROBACIÓN** para que el alumno continúe con los trámites necesarios para presentar el examen de grado correspondiente.

Sin más por el momento y agradeciendo de antemano su valiosa colaboración, quedo de usted.

Atentamente  
*Por una humanidad culta*

**DR. PORFIRIO JUÁREZ LÓPEZ**  
**Comité Evaluador**

C.i.p. Archivo

Av, universidad 1001 Col. Chamilpa, Cuernavaca, Morelos, México 62209  
Tel (777)3297046, 3297000 Ext. 3304. fagropecuarias@uaem.mx







UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

### Sello electrónico

**PORFIRIO JUAREZ LOPEZ** | Fecha:2021-11-16 20:24:09 | Firmante

rAtmbPNvT70tHpsycZngllLnSGQrBS5+VyF7PXPlol4nabnM4LDD1vip7n5JuxKqe8VN+ETIRnkJDsOdNU1TErgfBHzeZRCeuT4I1NooP8wFRf4BE/yCkZMbx1qztDAHJy2tFBN0  
vQVnmBnK8tU3/rYvOFmqXvqFq9RolpPc91Q7vB+FmnCElszOVHqYVLEmo29Ok16wY/VdWV6ZBWPumznUwnXDw4iH2/qMfgjtcESul+OSoDi98fX3Cy2vZquPJE3TXQBU6Mwy  
fA/LjDL8fs6txEgMEX825icZ2jyP4MMDRnsQwAwT2cN/rZwoHnYT1ju7TRF1zb0ncnmk+3Q==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o  
escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[62luTyZhm](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/sUZ0Jh7SkFwf0ZmCglnmvwlOmY1qE3XL>





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS



FACULTAD DE CIENCIAS  
AGROPECUARIAS

**FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS**  
**JEFATURA DE PROGRAMAS EDUCATIVOS DE POSGRADO**

Cuernavaca, Morelos, 16 de noviembre de 2021.

**Asunto:** Voto Aprobación de Tesis.

**MTRO. JESÚS EDUARDO LICEA RESÉNDIZ**  
**DIRECTOR DE LA FACULTAD DE CIENCIAS**  
**AGROPECUARIAS.**  
**P R E S E N T E.**

Por medio del presente informo a usted que después de revisar el trabajo de tesis titulado: **EVALUACIÓN Y DETERMINACIÓN DE TÉCNICAS DE CULTIVO *IN VITRO* PARA LA PROPAGACIÓN DE FILODENDRO XANADU (*Philodendron xanadu*)** que presenta el **M. en C. MOISES LARA ASCENCIO**, mismo que fue desarrollado bajo la dirección de la **DRA. MARÍA ANDRADE RODRÍGUEZ**, y que servirá como requisito parcial para obtener el grado de **DOCTOR EN CIENCIAS AGROPECUARIAS Y DESARROLLO RURAL**, lo encuentro satisfactorio, por lo que emito mi **VOTO DE APROBACIÓN** para que el alumno continúe con los trámites necesarios para presentar el examen de grado correspondiente.

Sin más por el momento y agradeciendo de antemano su valiosa colaboración, quedo de usted.

Atentamente  
*Por una humanidad culta*

**DRA. TERESA DE JESÚS RODRÍGUEZ ROJAS**  
**Comité Evaluador**

C.i.p. Archivo

Av, universidad 1001 Col. Chamilpa, Cuernavaca, Morelos, México 62209  
Tel (777)3297046, 3297000 Ext. 3304. fagropecuarias@uaem.mx





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

### Sello electrónico

TERESA DE JESUS RODRIGUEZ ROJAS | Fecha:2021-11-16 19:17:09 | Firmante

WA7mB5gQy/Uhc79jCm6gGouGowEgixZ43/0umxhuimuS8Wwu0v+QjLZPR0RoohCElc15uxqTqyOMTFYvMfAl3X4Twb9ecqKPDWuBFbuAfojnNzTsgn1sLds4b80ISis7e29yR2waxN/CxRw1jE2msUvWHskvNUVeHEQYwOs4M8ojYwV95ZzUysCQrVQV8E0rd/K3ZTFZv0k7RNajTFyB4eUzkDSiB4HVi4143rGbBY00JK2/AqtBBQfKEIMi19XAbJUdwmrHk34wZIAMNpOl6lbsTx6ghpB4kbOeaC+Z1/yYldSMYN2iCz3xTV/SlsIfYoXoX03562+jQTCdzrw==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[pC5AhJ7uT](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/ejpPw9S1jWdMGPxQU7zAx8mzf2JSLu9B>

