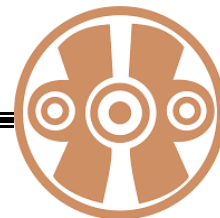




UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE
MORELOS



FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**MICROPROPAGACIÓN Y PROCESO DE ACLIMATACIÓN
DE PLANTAS DE *Bouvardia ternifolia*.**

TESIS PROFESIONAL POR ETAPAS

Seminario 3

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I O L O G O

P R E S E N T A:

JESUS ARELLANO FERRER

DIRECTOR: DR. JORGE HUMBERTO MUNDO ARIZA.

CUERNAVACA, MORELOS

FEBRERO, 2024

INTRODUCCIÓN.....	7
2. ANTECEDENTES.....	11
2.1 Las plantas medicinales como fuente de compuestos de interés farmacológico.....	11
2.2 Metabolitos secundarios.....	12
2.3 Aplicación de la biotecnología como estrategia para la producción de moléculas bioactivas.....	13
2.4 Reguladores de crecimiento vegetal.....	15
2.5 Procesos morfogénicos vegetales para la clonación y regeneración de plántulas.....	18
2.6 Embriogénesis (cigótica y somática).....	18
2.7 Organogénesis (directa e indirecta).....	19
2.8. Micropropagación.....	20
2.9 Proceso de endurecimiento.....	22
2.10 Proceso de aclimatación.....	23
2.11 Sustratos.....	24
2.12 Planta de estudio: <i>Bouvardia ternifolia</i>	25
2.13 Usos etnomedicos y fitoquímica de <i>Bouvardia ternifolia</i>	26
2.14 Farmacología de <i>Bouvardia ternifolia</i>	27
2.15 Cultivo <i>in vitro</i> de <i>Bouvardia ternifolia</i>	28
3. Justificación.....	29
4. Hipótesis.....	30
5. Objetivo general.....	30
5.1 Objetivos particulares.....	30
6. Metodología.....	31
6.1 Material vegetal.....	31
6.2 Medios de cultivo.....	32
6.3 Medio de desinfección.....	32
6.4 Medio para la inducción de callogénesis.....	32
6.5 Medio para la inducción de micropropagación por organogénesis indirecta.....	32
6.6 Medio de inducción a enraizamiento en plántulas.....	32
6.7 Medio para el proceso de endurecimiento en plántulas.....	32
6.8 Método de desinfección en explantes de <i>B. ternifolia</i>	33
6.9 Proceso de inducción callogénesis en <i>Bouvardia ternifolia</i>	33
6.10 Proceso de inducción a organogénesis indirecta en <i>Bouvardia ternifolia</i>	34
6.11 Proceso de inducción a enraizamiento en plántulas de <i>Bouvardia ternifolia</i>	34
6.12 Propuestas para obtención de raíces en plántulas de <i>Bouvardia ternifolia</i>	35

6.13	Proceso de endurecimiento de plántulas <i>in vitro</i> de <i>Bouvardia ternifolia</i>	36
6.14	Acondicionamiento <i>ex vitro</i> de plántulas de <i>B. ternifolia</i> aclimatadas en diferentes sustratos.	36
7	RESLTADOS Y DISCUSION	37
7.1	Desinfección de explantes	37
7.2	Proceso de inducción a callogénesis en <i>Bouvardia ternifolia</i>	38
7.3	Proceso de inducción a organogénesis indirecta.....	40
7.4	Proceso de inducción a enraizamiento de plántulas de <i>B. ternifolia</i>	43
7.5	Proceso de endurecimiento de plántulas <i>in vitro</i> de <i>Bouvardia ternifolia</i>	46
7.6	Acondicionamiento <i>ex vitro</i> de plántulas de <i>B. ternifolia</i> en diferentes sustratos.....	48
7.	Conclusiones.....	51
9.	Perspectivas	52
10.	Referencias	44

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Distribución de <i>Bouvardia ternifolia</i> en la Republica Mexica.....	26
Figura 2. Estrategia experimental	23
Figura 3. Explantes desinfectados de <i>Bouvardia ternifolia</i> colocados en frascos con medios MS basal por 7 días.....	37
Figura 4. Callos organogénicos de <i>Bouvardia ternifolia</i> obtenidos a partir del tratamiento número 2 (ANA 1mg/L/BAP 0.01mg/L) de inducción a callogénesis	30
Figura 5. Callo friable de <i>Bouvardia ternifolia</i> obtenido a partir del tratamiento número 3 (AIA 5mg/L /KIN 0.01) de inducción a callogénesis.....	31
Figura 6. Proceso de organogénesis indirecta de <i>Bouvardia ternifolia</i> durante un periodo de 42 semanas. A) Callo organogénico expuesto por 1 semana a reguladores de crecimiento. B) Callo organogénico expuesto por 2 semanas a reguladores de crecimiento con la generación de un mayor número de brotes. C) Callo organogénico expuesto por 3 semanas a reguladores de crecimiento con elongación de los brotes generados. D) Callo organogénico expuesto por 4 semanas a los reguladores de crecimiento.	33
Figura 7. Proceso de individualización de plántulas de <i>B. ternifolia</i> obtenidas por organogénesis indirecta	34
Figura 8. Plántulas de <i>B. ternifolia</i> con la formación de callo friable en tratamiento de enraizamiento de los tratamientos 2, 3, 6 y 7.	46
Figura 9. Plántulas de <i>B. ternifolia</i> sin respuesta a la formación de raíz en los tratamientos 1, 4, 5, 8, 9, 11, 12, 13 y 14.	46
Figura 10. Plántulas de <i>B. ternifolia</i> con respuesta a la formación de raíz del tratamiento numero 10.....	46
Figura 11. Plántulas de <i>B. ternifolia</i> sometidas a estrés nutricional.	47
Figura 12. Plántulas de <i>B.ternifolia</i> colocadas en los sustratos perlita y vermiculita al 100% en proceso de intercambio gaseoso	48
Figura 13. Plántulas de <i>Bouvardia ternifolia</i> trasplantadas a condiciones <i>ex vitro</i> de 1 mes	

de edad.....	50
--------------	----

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Metabolitos secundarios y su actividad biológica.	12
Tabla 2. Metabolitos secundarios con actividad biológica producidos a partir de cultivos vegetales.....	14
Tabla 3. Principales reguladores de crecimiento y sus efectos <i>in vitro</i>	16
Tabla 4. Ensayos de aclimatación y propagación en diferentes especies vegetales	20
Tabla 5. Características de sustratos activos e inertes	24
Tabla 6. Actividades biológicas de <i>Bouvardia ternifolia</i>	27
Tabla 7. Tratamientos para el establecimiento de cultivos <i>in vitro</i> de <i>Bouvardia ternifolia</i> . Auxinas: (2.4D) Acido 2,4 Diclorofenoxiacetico, (ANA) Acido naftalenacético, (AIA) Acido indolacético, (KIN) Kinetina y (BAP) Bencilaminopurina.....	28
Tabla 8. Medio basal MS con reducción gradual en la concentración de sacarosa	32
Tabla 9. Proceso de desinfección de explantes de <i>Bouvardia ternifolia</i>	33
Tabla 10. Tratamientos para la obtención de callo tipo compacto a partir de explantes de hoja de <i>B ternifolia</i>	34
Tabla 11. Tratamientos para la inducción a enraizamiento de plántulas de <i>B. ternifolia</i>	35
Tabla 12. Producción de callo compacto u organogénico durante el periodo de evaluación en los diferentes tratamientos de inducción a callogénesis en <i>B. ternifolia</i>	40
Tabla 13. Tratamientos de enraizamiento en plántulas de <i>B. ternifolia</i> . ANOVA: F (12,52)= 101.9 p<0.05 (*), p<0.01 (**) contra el control negativo (prueba de Dunnett's)	46

Abreviaturas

B. ternifolia: *Bouvardia ternifolia*

2, 4D: Ácido 2,4-diclorofenoxiacético

ANA: Acido naftalenacético

AIA: Acido indol acético

KIN: Kinetina

BAP: 6-N-Bencilaminopurina

OMS: Organización Mundial de la Salud

SNC: Sistema Nervioso Central

TPA: Tetradecanoilforbolo acetato

ADN: Ácido desoxirribonucleico

MS: Murashige y Skoog

IBA: Acido indolbutirico

UV: Ultra violeta

Spp: Sin especie

VPH: Virus del Papiloma Humano

BA: Benciladenina

pH: potencial de hidrogeno

C.I.C.: Capacidad de intercambio catiónico

mm: Milímetro

cm: Centímetro

g/L: Gramos/ litro

mg/L: Miligramo/ litro

RESUMEN

Bouvardia ternifolia, mejor conocida como trompetilla, es una especie vegetal perteneciente a la familia de las *Rubiácea*. En la medicina tradicional es utilizada contra varios tipos de infecciones, dolores, fiebre, inflamación, trastornos neuronales, hemorragias, hematomas, asma, dolor de cabeza, picadura de serpientes, escorpiones y arañas, nervios, disentería, infecciones estomacales, anti inflamatorio para golpes y como fortificante. Su interés ha crecido enormemente gracias a la producción de metabolitos secundarios como lo son hexapéptidos cíclicos (bouvardin, deoxibouvardin y 6-O-metilbouvardin), flavonoides, ácido clorogénico, 3-O quercetina ramnopiranososa, 3-O quercetina glucopirinososa, kaempferol, rutina, triterpenos, ácido ursólico, oleico, cumarinas, escopoletina, estas moléculas producidas por *Bouvardia ternifolia* presentan diversas actividades farmacológicas como neuro-protectora, fungicida, anti-cancerígena, anti-pancreática, anti-alacranica, sedante, homeostática y analgésica. El objetivo de este proyecto fue establecer un protocolo de micropropagación y aclimatación de plántulas de *Bouvardia ternifolia* generadas por organogénesis indirecta. Se obtuvieron hojas jóvenes de plantas cultivadas en invernadero de *Bouvardia ternifolia* realizando un proceso de desinfección con 7 lavados continuos, para después colocar los explantes en medio basal MS. Las hojas desinfectadas fueron expuestas a los reguladores de crecimiento ANA, BAP, AIA, KIN y 2,4-D en 33 tratamientos para la inducción a callogénesis. Los callos generados fueron inducidos a un proceso de organogénesis mediante la exposición a los reguladores AIA y BAP a una concentración de 0.1 mg/L. Para la inducción a rizogénesis, las plántulas obtenidas fueron expuestas a las auxinas 24D, IBA, ANA y AIA a diferentes concentraciones, probando 12 tratamientos. Para realizar el proceso de endurecimiento de las plántulas se utilizó un procedimiento de reducción de la fuente de carbono (sacarosa) hasta el 0%, y el aumento gradual del intercambio gaseoso. Finalmente, para el proceso de aclimatación fueron utilizados los sustratos vermiculita/tierra y perlita/tierra en diferentes porcentajes de combinación. La desinfección obtuvo un porcentaje del 95-98% de efectividad utilizando tal proceso, en el proceso de callogénesis, el tratamiento número 2 (ANA 1 mg/L y BAP 0.01 mg/L) indujo una mayor producción de callo de tipo organogénico con un 29.16% de respuesta. En el proceso de organogénesis, al utilizar los reguladores AIA y BAP en una concentración de 0.1mg/L se observó la proliferación de brotes y su crecimiento y elongación con la formación de hojas. Por su parte el tratamiento número 10 del proceso de enraizamiento (AIA a 0.5mg/L) obtuvo el mayor porcentaje de respuesta con el 80%, durante el proceso de endurecimiento, al realizar la reducción gradual de la sacarosa se observó crecimiento de las raíces,

alargamiento del tallo y la formación de nuevas hojas. En el proceso de aumento del intercambio gaseoso y adaptación a sustratos, los resultados mostraron resistencia al factor de estrés y aumento de las funciones fisiológicas de las plantulas, observando crecimiento de la raíz, elongación del tallo y formación de nuevas hojas. Finalmente, en el proceso de acondicionamiento ex vitro, la combinación de 75% vermiculita / 25% tierra presentó una tasa de supervivencia del 50%, donde se observó buena área foliar y desarrollo de la raíz, lo que hace de éste tratamiento el de mejores características para la adaptación de *Bouvardia ternifolia* al medio ambiente. Estos resultados permitieron el desarrollo de un protocolo de micropropagación de plántulas de *Bouvardia ternifolia* por organogénesis indirecta, además de la descripción del proceso de aclimatación, lo cual permitirá la obtención de material vegetal de forma continua y uniforme de esta especie para el desarrollo de futuras investigaciones.

INTRODUCCIÓN.

Desde épocas antiguas, la medicina tradicional se ha implementado para aliviar malestares del ser humano, utilizando partes de plantas como hojas, flores, tallos y raíces, consumiéndolas de forma directa o en infusiones, por lo tanto, el estudio de las plantas con potencial medicinal es una opción importante para la búsqueda de nuevas moléculas activas y el alivio de múltiples enfermedades (OMS, 2000; OMS, 2014).

Existen especies vegetales, las cuales tienen una importancia etnomédica y farmacéutica, algunas de ellas pertenecientes a la familia *Rubiáceae* que son utilizadas por sus propiedades químicas y farmacológicas: *Faramea occidentalis*, se emplea tradicionalmente como astringente, galactógena y otras enfermedades de la piel, principalmente erupciones cutáneas (Bullain *et al.*, 2014); *Arnica montana* es utilizada en cuadros inflamatorios, contusiones, hematomas y dolores; la hierbabuena (*Mentha spicata*) es empleada para aliviar problemas estomacales como náuseas, vómito y diarrea; la manzanilla (*Chamomilla nobile*) se utiliza para tratar padecimientos como la fiebre, inflamación, desordenes menstruales, insomnio y úlceras (Escamilla-Moreno., 2015). Dentro de estas especies pertenecientes a la familia *Rubiaceae*, *Bouvardia ternifolia* es reconocida como una planta utilizada contra varios tipos de infecciones, dolores, fiebre, inflamación, trastornos neuronales, hemorragias, hematomas, asma, dolor de cabeza, picadura de serpientes, escorpiones y arañas, nervios, disentería, infecciones estomacales, anti inflamatorio para golpes y como fortificante (Hernández-Olivares., 2017) (Zapata *et al.*, 2023). Su interés ha crecido enormemente gracias a la producción de metabolitos secundarios como lo son hexapéptidos cíclicos bouvardin, deoxibouvardin y 6-O-metilbouvardin (Robert. *et al.*, 1976.; Jolad *et al.*, 1977; Herrera-Morales., 2012; Zapata *et al.*, 2023), flavonoides, ácido clorogénico, 3-O quercetina ramnopiranososa, 3-O quecertina glucopirinososa, kaempferol, rutina, triterpenos, ácido ursólico, oleico, cumarinas, escopoletina, estas moléculas producidas por *Bouvardia ternifolia* presentan diversas actividades biológicas como neuro-protectora, fungicida, anti-cancerígena, anti-pancreática y anti-alacranica (Jiménez *et al.*, 2004; Herrera-Ruiz., 2012; Jolad *et al.*, 1977; García *et al.*, 2015; Gamboa *et al.*, 2003; Cornejo-Garrido *et al.*, en 2012; Zapata *et al.*, 2022)

La Biotecnología es el conjunto de técnicas que involucran la manipulación de organismos vivos o sus componentes, para producir sustancias, desarrollar procesos o proporcionar servicios; que hace uso de conocimientos generados por ramas como la biología, química, agronomía, bioquímica y biología molecular (Casa Nova., 2014; Newell *et al.*, 2000).

Una de las tantas herramientas de la Biotecnología es el cultivo de tejidos vegetales en la investigación de diversas especies de plantas medicinales. Las aplicaciones del cultivo de tejidos son variadas: producción de metabolitos secundarios, mejoramiento de especies vegetales, estudios metabólicos, mejoramiento genético, plantas libres de patógenos, preservación de germoplasma, producción de semillas sintéticas (Pérez., 2015). Dentro de estas aplicaciones, la micropropagación es utilizada para obtener plantas libres de enfermedades, ofrece una tasa superior y rápida del material vegetal, obtención de material para el análisis de los metabolitos secundarios, teniendo un proceso que va desde la selección y preparación de la planta madre, desinfección de semillas, desinfección de explantes, introducción *in vitro* del material seleccionado, inducción a brotación, multiplicación de brotes, enraizamiento y por último los procesos de aclimatación (Castillo, 2004). Dentro de las ventajas de la micropropagación, se puede llegar a la regeneración de plantas superiores, rescatando especies en peligro de extinción, en la agricultura se utilizan para la producción de cultivos más beneficiosos, en la industria alimenticia para la producción de alimentos más saludables y en la agronomía en busca de herbicidas e insecticidas. Se puede aplicar también para la comercialización de plantas o para la búsqueda de diversos compuestos bioactivos denominados metabolitos secundarios; estos compuestos tienen una aplicación en campos como la medicina y farmacia para la producción de nuevos fármacos o como moldes para llevar a cabo la producción de drogas sintéticas (Calva Pérez, 2015; Mendoza *et al.*, 2016).

Debido a las características etnomédicas, químicas y farmacológicas de *Bouvardia ternifolia*, en este proyecto de investigación se realizó el establecimiento de un protocolo de micropropagación y aclimatación de plántulas de *Bouvardia ternifolia* generadas por organogénesis indirecta para el establecimiento de un cultivo de plantas en condiciones de invernadero, el cual permitirá el desarrollo de futuras investigaciones, ya que gracias a la micropropagación podemos obtener material vegetal de una manera continua, evitando afectar los recursos existentes en la naturaleza (Herrera-Ruiz., 2012; Fernández-Sánchez., 1981).

2. ANTECEDENTES.

2.1 Las plantas medicinales como fuente de compuestos de interés farmacológico.

Las plantas medicinales son importantes para la investigación farmacológica y el desarrollo de nuevos medicamentos, se considera que existen alrededor de 250,000 especies vegetales en todo el planeta, de las cuales 12,000 presentan actividad terapéutica, teniendo conocimiento científico solo de un 10%, es decir; 1200 especies (Luque., 2016).

En México existen alrededor de 23,000 especies de plantas, de las cuales alrededor de 11,600 son endémicas. La Organización Mundial de la Salud (OMS) presenta en su página oficial un compendio de cuatro volúmenes de monografías de plantas utilizadas a nivel mundial con parámetros para su uso seguro, donde México destaca en ser uno de los países con mayor biodiversidad de especies. A las plantas medicinales, siendo una fuente rica de metabolitos secundarios se les han atribuido propiedades benéficas y diversos fármacos utilizados en la actualidad tienen su origen en el estudio de éstas, como, por ejemplo el paclitaxel , fármaco utilizado para tratar algunos tipos de cáncer, originado de la corteza del árbol conocido como tejo del Pacífico (*Taxus Brevifolia*) la especie *Erythroxylon coca*, utilizado como anestésico tópico, también es un estimulante del Sistema Nervioso Central (SNC) y bloqueante adrenérgico, además de ser una droga de abuso, otro ejemplo, *Papaver somniferum* produce morfina, alcaloide que tiene diversos usos como un potente analgésico a nivel del SNC, anticonvulsivo y antiespasmódico (Avalos-Pérez., 2009; OMS., 2014).

Estas sustancias provienen del metabolismo celular de las plantas, como sabemos los metabolitos primarios como los aminoácidos, nucleótidos, azúcares y lípidos son compuestos producidos por todas las plantas, esenciales para las vías bioquímicas que controlan el crecimiento de la planta, como la fotosíntesis, la respiración, transporte y asimilación de nutrientes (Taize-Zeiger 2010). Además del metabolismo principal que existe en todos los seres vivos, las plantas también presentan un metabolismo secundario que les permite producir y acumular compuestos con una gran variedad de propiedades químicas. Estas moléculas derivadas del metabolismo secundarios se denominan metabolitos secundarios o productos naturales, se distribuyen diferencialmente entre grupos taxonómicos y presentan características biológicas que son de interés para el humano (Sierra *et al.*, 2018).

En las plantas, los metabolitos secundarios no son requeridos para el crecimiento y desarrollo normal, pero pueden ser utilizados como mecanismo de defensa o para fines reproductivos (Stewart, 2009).

2.2 Metabolitos secundarios.

Las plantas han jugado un papel fundamental en la vida del ser humano, utilizándolas para cubrir necesidades básicas como alimentación, medicación, vivienda, vestimenta y control de plagas. A diferencia de otros organismos, las plantas asignan una cantidad significativa de carbono y energía asimilados a la síntesis de una amplia variedad de moléculas orgánicas que no parecen desempeñar un papel directo en procesos biológicos como la fotosíntesis, la respiración, la asimilación de nutrientes o su síntesis, estos son llamados metabolitos secundarios, los cuales son químicamente distintos a los metabolitos primarios, acumulándose en tejidos y estructuras específicas como vacuolas, glándulas especializadas y tricomas, se han identificado más de 200,000 estructuras químicas diferentes (Ojito-Portal., 2017; Sariol-Aponte., 2019). Estas moléculas se pueden clasificar en cuatro grupos principales: terpenoides, compuestos fenólicos, alcaloides y glucosinolatos (tabla 1) (Guerrier *et al.*, 2018).

Tabla 1. Metabolitos secundarios y su actividad biológica (Avalos-Pérez, 2009) (Mitra *et al.*, 2022).

Tipo de metabolitos	Actividad biológica
Terpenos	Antioxidante, anti carcinogénica, antiviral, antimalarial, antimicrobiana, anticonvulsiva, actividad sedante, , inmunosupresoras y anticoagulantes.
Alcaloides	Efecto sobre el SNC, relajante muscular, tranquilizante , analgésica, antihipertensiva, empleado en el tratamiento de leucemia y actividad citotóxica.
Glucosinolatos	Anticancerígena, antiséptica, vasodilatadoras, hepatoprotectora, gastroprotectora, osteoprotectora, antioxidante y vasodilatador.
Compuestos fenólicos	Antioxidante, prevención de enfermedades cardio vasculares, prevención de cáncer (estomago, pulmón) , disminución del colesterol, estrogenica, neuroprotectora y antimicrobianas.
Flavonoides	Actividad anticancerígena , neuroprotectora, ansiolítico, hepatoprotectora, antialérgica, anti diabética, antiadipogénica, termogénico, antioxidantes y antiinflamatorias.

La producción de los metabolitos secundarios constituyen una parte importante de la respuesta a diferentes formas de estrés como herbívoría causada por depredadores o plagas, defensa contra patógenos, estrés ambiental como sequía, alta humedad, baja concentración de nutrientes en el suelo, alta salinidad, así como defensa contra la luz UV, proporcionan aroma, comunicación química entre especies y hasta pueden influir en el crecimiento, reproducción y

supervivencia de otras plantas, ya sea beneficiándola o perjudicándolas (Avalos-Pérez, 2009). En las plantas, los metabolitos están involucrados en condiciones relacionadas con los mecanismos reproductivos, atrayendo insectos para promover la polinización y el establecimiento de simbiosis (Sierra *et al.*, 2018). Es importante destacar que muchos de los metabolitos secundarios producidos por las plantas son utilizados por la industria farmacéutica, ya que estos compuestos presentan diversos efectos farmacológicos en humanos y animales (tabla 1). Además de su uso farmacéutico, son utilizados para la producción de test de diagnóstico, fragancias, aditivos alimentarios, suplementos dietéticos, colorantes, insecticidas, herbicidas cosméticos, impermeabilizantes y abrillantadores, por lo tanto, el interés científico e industrial por los metabolitos secundarios es enorme (Gonçalves-Romano., 2018; Mitra *et al.*, 2022).

2.3 Aplicación de la biotecnología como estrategia para la producción de moléculas bioactivas.

El cultivo *in vitro* de tejidos vegetales es una herramienta proporcionada por la biotecnología, mediante la cual podemos obtener la producción de células, órganos o plantas completas a partir de explantes de una planta madre, estos tejidos se encuentran en medios que contienen soluciones nutritivas, reguladores del crecimiento y condiciones controladas. Esta técnica está orientada a obtener material vegetal continuo con mayores rendimientos metabólicos y un alto valor agregado (Cardozo-Osorio., 2015, Newell *et al.*, 2000).

El cultivo de células y tejidos vegetales ha surgido como una alternativa para la obtención de metabolitos de interés farmacológico y gracias a los avances en las ciencias biológicas se ha hecho posible realizar estudios en condiciones de laboratorio, reproduciendo todos los factores que pueden incidir en el crecimiento y desarrollo de las plantas, estas metodologías se basan en el principio de totipotencia, que es la capacidad de una célula vegetal de producir réplicas del organismo del que proviene, conteniendo cada célula una copia completa del material genético de la planta a la que pertenece, independientemente de su función o posición en ella y por lo tanto el potencial para la regeneración de una planta completamente nueva.

Los procesos que se pueden llevar a cabo en el cultivo *in vitro* son variados: cultivo de callos, células en suspensión, células inmovilizadas, micropropagación, cultivo de raíces pilosas, producción de metabolitos secundarios, producción de semillas sintéticas, obtención de plantas libres de virus, conservación de germoplasma, mejoración genética de plantas y germinación de semillas (tabla 2) (Castillo, 2004; Arias *et al.*, 2008; Segretín., 2015).

Tabla 2. Metabolitos secundarios con actividad biológica producidos a partir de cultivos vegetales (Gonçalves-Romano., 2018; Fowler-Stafford, 1992; Ruiz *et al.*, 2016;Rodríguez *et al.*,2014

Especie vegetal	Compuesto	Actividad biológica	Sistema de cultivo
<i>Taxus spp.</i>	Taxol	Anticancerígena (tratamientos para cáncer de mama, ovario, pulmón, vejiga)	Células en suspensión
<i>Catharanthus roseus</i>	N-metilajmalina	Anti-hipertensiva	Células en suspensión
<i>Daucus carota</i>	Pseudoindoxil-ajmalicina	Cardiotónica	Células en suspensión
<i>Beberis stolonifera</i>	Ajmalicina	Antihipertensivo	Células en suspensión
<i>Corylus avellana L.</i>	Taninos y flavonoides	Anti-inflamatoria, hemorroides, epistaxis y anti-flebitis.	Células es suspensión
<i>Linum album</i>	Podofilotoxina	Tratamiento tópico para verrugas en los genitales por causa del VPH.	Células en suspensión
<i>Moringa oleifera</i>	Glucosinolatos	Antioxidante, ansiolítica y gastroprotectora.	Micropropagación
<i>Ugni molinae</i>	Polifenoles	Antioxidante	Micropropagación
<i>Curcuma zedoaria</i>	Sesquiterpeno	Gastroprotectora y diurética.	Micropropagacion
<i>Gatharantus roseus L.</i>	Ajmalicina	Antihipertensiva	Cultivo de raíces pilosas
<i>Ophiorrhiza pumila</i>	Camptotecina	Anticancerígena (cáncer de pulmón, de colon y de mama).	Cultivos de raíces pilosas

Estos procesos son dados gracias a un fenómeno llamado plasticidad celular, donde las células madre tienen la capacidad de generar grupos celulares diferentes a los del tejido de origen. Entonces, el primer paso consiste en la selección de una planta donante y de un explante a partir del cual se desarrollarán estrategias para la multiplicación de individuos con características idénticas. La planta seleccionada debe encontrarse libre de enfermedades y con una buena

nutrición (Calva-Pérez, 2005). Es primordial evitar la proliferación de microorganismos que puedan afectar el desarrollo de las especies vegetales, los microorganismos presentes en la superficie del material vegetal y las fallas en el procedimiento de cultivo en el laboratorio son las principales fuentes de contaminación y pérdida de material, por lo cual es indispensable desarrollar estrategias de desinfección altamente eficiente (Téllez-Casanova., 2014).

Se deben considerar condiciones de crecimiento para tener una buena estrategia de cultivo *in vitro*, como lo son: el explante, agente gelificante inerte, agua destilada, temperatura, pH, macro y micronutrientes, fotoperiodo, concentración de sacarosa, vitaminas y la mezcla de hormonas para su desarrollo, además se necesitan equipamientos que tengan condiciones necesarias de esterilidad como, la autoclave, campana de flujo laminar, que son estaciones de trabajo que hacen circular aire filtrado y estéril, potenciómetro, balanza digital analítica, protegiendo y cuidando así los cultivos (Segretín., 2015; Viñas-Jiménez., 2011).

Debido a que los cultivos de plantas son plásticos y versátiles, su desarrollo y crecimiento pueden ser manipulados por reguladores de crecimiento que son compuestos sintetizados químicamente y naturalmente obtenidos. (Stewart, 2009). Según sea el balance hormonal y otras condiciones de cultivo, se puede propiciar la regeneración de distintos órganos vegetales, por ejemplo, si el balance de citoquininas es mayor a las auxinas, se favorece la generación de brotes; si la concentración de auxinas es mayor, se lleva a cabo la regeneración de raíces; y si las concentraciones son iguales, la formación de callo, esto siempre va a depender la especie. Cada planta requiere condiciones de crecimiento específicas, los reguladores de crecimiento pueden ser producidos por la planta o ser productos sintéticos adicionados que se han convertido en la primera herramienta para controlar el crecimiento vegetal (Alcántara *et al.*, 2019; Gonçalves-Romano., 2018).

2.4 Reguladores de crecimiento vegetal.

Los reguladores de crecimiento son compuestos orgánicos que fomentan, inhiben o modifican el crecimiento de los tejidos vegetales, ejerciendo una profunda influencia en los procesos fisiológicos. Una hormona vegetal es un compuesto producido internamente por una planta, que ejerce su función en muy bajas concentraciones y cuyo principal efecto se produce a nivel

celular, permitiendo su control, mientras que los reguladores de crecimiento vegetales son compuestos sintetizados químicamente u obtenidos de otros organismos y son, en general, mucho más potentes que los análogos naturales (Azcon-Talon., 2008; Alcántara-Godoy., 2019).

Las hormonas vegetales están involucradas en muchos procesos que permiten que las plantas reaccionen ante estímulos internos y externos. Los grupos "clásicos" de hormonas vegetales son las auxinas, giberelinas, citoquininas, ácido abscísico y etileno, estas hormonas vegetales se pueden formar en diferentes sitios citológicos o morfológicos, sus principales sitios de producción son meristemos y frutos en crecimiento (Redamacher., 2015)

La adición de reguladores de crecimiento en medios de cultivo es utilizada para optimizar el crecimiento y desarrollo de plántulas, aunque no siempre es favorable, ya que puede haber respuesta de callogénesis, es decir la formación de callo, retardo en el crecimiento y excesiva elongación de los tallos, entre otras, por lo que debemos tomar en cuenta la concentración, tipo y combinación óptima de éstos (tabla 3) (Ávila-Salgado., 2014).

Tabla 3. Principales reguladores de crecimiento y sus efectos *in vitro* (Jordan-Caserato., 2006) (Alcantara *et al.*, 2019).

Fitohormonas	Variedades encontradas	Efecto a nivel vegetal
Auxinas	AIA, IBA, 2,4-D Y ANA	Formación y elongación de tallos, producción de raíces adventicias.
Citoquininas	KIN, cZ, BA , 4-hidroxifeniletíl alcohol y TDZ	Induce la iniciación y elongación de raíces, estimula la generación de brotes axilares, estimula el desarrollo fotomorfo-genético de las hojas.
Giberelinas	GA1, GA2, GA3	Aumenta el desarrollo de tejido vegetal de manera constante, induce a la germinación de semillas, alargamiento de segmentos nodales.
Ácido abscísico	No presenta	Estimula la maduración de la semilla, puede inducir a la senescencia y floración vegetal.

Las auxinas es un grupo de hormonas vegetales naturales que pueden regular muchos aspectos del crecimiento y desarrollo de las plantas. La forma principal en las plantas es el ácido indol acético (IAA), que es muy activo en los bioensayos y generalmente existe en concentraciones nanomolares (nM). Las formas naturales de las auxinas son ácido 4-cloroindol acético (4-ClIAA), ácido fenilacético (PAA), ácido indol butírico (IBA) y otras formas sintéticas, como ácido naftaleno acético (NAA), ácido 3,6-diclorobenzoico (dicamba), ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) y ácido 2,4,5-triclorofenoxiacético (2,4,5-T). Sus funciones fisiológicas son promover el crecimiento del tallo, hojas, la formación de raíces adventicias,

activar el dominio del ápice de las raíces, inducir la floración y la diferenciación vascular (Jordan-Casaretto., 2006; García *et al.*, 2006). El grado de acción de las auxinas va a depender de la concentración de la hormona y del órgano del que se trate, por ejemplo, el crecimiento del tallo de una planta será proporcional al aumento de la concentración de auxina hasta alcanzar un máximo, si la concentración sigue aumentando el crecimiento se reduce en intensidad hasta llegar a inhibirlo (Curtis-Sue, 2013).

Las técnicas biotecnológicas del cultivo *in vitro* de tejidos vegetales son una alternativa para la conservación de plantas endémicas, en peligro de extinción y medicinales, entre estas técnicas la más usada es la micropropagación porque permite producir en corto tiempo y en gran número de plantas uniformes y libres de patógenos. Es así que los medios para el cultivo *in vitro* pueden contener sustancias sintéticas similares a las hormonas vegetales denominadas reguladores de crecimiento vegetal, los cuales son importantes en el metabolismo, distribución de los solutos, en el crecimiento y fisiología de la planta regulando la expresión genética interna al igual que las hormonas naturales, porque controlan la ramificación de los brotes, la formación y mantenimiento de los meristemos y la formación de raíces. (Laguna *et al.* 2019).

Las citoquininas, su nombre proviene del término “citocinesis” que se refiere al proceso de división celular y son un grupo de hormonas vegetales que tienen la capacidad de estimular e inducir una alta proliferación celular, suelen inducir la iniciación y elongación de las raíces al igual que pueden activar la senescencia de las hojas, permitiendo estimular el desarrollo fotomorfogénico vegetal y jugar un rol importante en el aumento y generación de la producción de brotes a nivel vegetal. Su efecto en el sistema vegetal casi siempre suele acompañarse de la presencia de auxinas debido a su alta complementariedad en la estimulación del crecimiento y desarrollo vegetal (Vera-Millones., 2020) (Alcántara *et al.*, 2019).

La aplicación externa de citoquinina en tejidos que requieren hormonas como lo son los tejidos *in vitro*, promueve el mecanismo de autoinducción de la síntesis de citoquininas, mediante este mecanismo, el contenido y los efectos fisiológicos de las citoquininas pueden exceder su sitio de aplicación y producir efectos más amplios en la planta. Según sus fuentes, se pueden distinguir dos tipos de citoquininas: citoquininas naturales como la Trans-Zeatina (Tz), cis-zeanina (cZ) Isopentiladenina (Ip) y dihidrozeatina (DZ) producidas por plantas y otras

citoquininas artificiales sintetizadas por humanos, como 4-hidroxifeniletíl alcohol, benciladenina (BA), kinetina (KIN) y Tidiázuron (TDZ) (Cossio., 2013).

2.5 Procesos morfogénicos vegetales para la clonación y regeneración de plántulas.

La morfogénesis se define como la formación de órganos y comprende el crecimiento y diferenciación celular. En las células o tejidos cultivados *in vitro*, el proceso de morfogénesis se induce gracias a que, las células vegetales son capaces de diferenciarse bajo determinados estímulos, a esto se le conoce como totipotencia celular. La morfogénesis tiene 2 rutas: La embriogénesis somática y la organogénesis, que son procesos muy frecuentes en el cultivo *in vitro* (Domenech-Carmina, 2011).

La embriogénesis somática es un proceso mediante el cual se puede obtener una estructura similar a un embrión cigótico sin fertilización de gametos, la cual nos permite saltar las etapas de formación de yemas y enraizamiento, regenerando plantas en una forma mucho más rápida y eficiente, en la organogénesis se pueden obtener tallos, raíces, brotes, células en suspensión, callo y plántulas a través de un explante, cuanto más joven es el tejido, mayor es la respuesta a los tratamientos que conducen a la organogénesis (Jhong *et al.*, 2019).

Estas técnicas tienen muchas ventajas como la propagación clonal, debido a que se lleva en condiciones controladas es un sistema independiente que no se ve afectado por las condiciones externas, el número de plantas disponibles es ilimitado, requieren muy poco espacio, el proceso es relativamente corto produciendo suficiente material vegetal para desarrollar el análisis químico o farmacológico que demuestre la producción de metabolitos secundarios con actividad biológica (Stewart, 2009; Eloísa- Hernández, 2016).

2.6 Embriogénesis (cigótica y somática).

La embriogénesis cigótica es el proceso donde el gameto masculino fecunda un gameto femenino dando origen al cigoto, comprende cambios morfológicos, estructurales y de expresión genética que tienen lugar desde la formación del cigoto hasta el final de su desarrollo y la maduración del embrión, para esto sufrirá una serie de divisiones celulares reconocibles y conocidos como globular, corazón, torpedo y cotilénodar, nombres que se les da debido a sus formas. (Azcón- Talón, 2008)

La embriogénesis somática *in vitro* es un proceso biológico mediante el cual las células somáticas desarrollan embriones similares a los embriones cigóticos y estos embriones se regeneran en plantas que son genéticamente idénticas a la planta madre (Sánchez-Cabrera., 2019). Los embriones somáticos pueden derivarse a partir de células que han estado en el pasado en un proceso de diferenciación, como células producidas en cultivos de callos o suspensión celular, la llamada embriogénesis indirecta, o células que no se someten al proceso de dediferenciación; directamente de explantes, la cual se denomina embriogénesis directa. Desde un punto de vista comercial, los embriones pueden llegar a ser utilizados para la producción de plantas completas, establecimiento de cultivos en biorreactores o la producción de semillas artificiales (Campos *et al.*, 2017).

De esta forma, las células somáticas pueden regenerar una planta completa, aunque no existe un proceso de recombinación y fusión de gametos, pero al ser un proceso de clonación, retienen por completo el genotipo de la planta donante (Viñas-Jiménez., 2011; Martín., 2017).

2.7 Organogénesis (directa e indirecta).

En la regeneración *in vitro*, la organogénesis es de gran importancia para el desarrollo de nuevos tejidos, la organogénesis hace referencia a la capacidad que tienen las células vegetales para reprogramar su desarrollo hacia la formación de tejidos y órganos nuevos. Este procedimiento requiere que las células sean susceptibles a la reprogramación genética, sean competentes y por ende receptivas a procesos de dediferenciación y diferenciación celular lo cual permita el desarrollo de órganos y así la obtención de una plántula completa (Rodríguez *et al.*, 2014).

La organogénesis se puede dividir en directa e indirecta, la producción directa de brotes a partir de un tejido consiste en la propagación sin la etapa de callo, por esta vía asegura la estabilidad genética de las plantas regeneradas, mientras que, en la organogénesis indirecta, se desarrollan masas de células desorganizadas en proceso de dediferenciación, con el fin de llevar a cabo la rediferenciación y así, la formación de órganos. Las mutaciones clonales somáticas suelen estar relacionadas directamente con el proceso de la vía indirecta y permiten diferentes características que normalmente no se expresan en la naturaleza, los cambios visibles más comunes, son deformaciones del fruto, generación de plantas albinas y la inestabilidad de algunos clones (Randel *et al.*, 2015; Domínguez-Gonzales, 2008).

Debido a diversos factores, la respuesta *in vitro* puede variar, debiendo tomar en cuenta: contenido endógeno, edad fisiológica del explante y especie estudiada. En la micropropagación, la organogénesis es un método alternativo ampliamente utilizado para la producción masiva de plantas en un corto período de tiempo, es una herramienta muy utilizada para la propagación de plantas ornamentales y otros cultivos de jardinería, frutales, industriales y forestales (Eloísa-Hernández 2016).

2.8. Micropropagación.

Tabla 4 . Ensayos de aclimatación y propagación en diferentes especies vegetales (Castillo, 2004; Aguilar-.Rodriguez 2018; Lara-Valverde, 2003; M. Valencia *et al.*, 2019; E. Rangel-E.Hernandez 2016; L. Osuna *et al.*, 2006; Inamine- Moretti 2004; A. Ruiz *et al.*, 2016; Komalavalli-Rao 2000).

Espece	Trabajo	Tipo de explante
<i>Fragaria x ananassa</i>	Aclimatación <i>ex vitro</i> de plántulas de <i>Fragaria x ananassa</i>	Yemas apicales
La familia Orchidaceae <i>Encyclia adenocaula</i> , <i>Epidendrum radicans</i> , <i>Euchile citrina</i> , <i>Laelia albida</i> , <i>Laelia autumnalis</i> , <i>Oncidium cavendishianum</i> , y <i>Oncidium</i>	Propagación y mantenimiento <i>in vitro</i> de orquídeas mexicanas para su conservación.	Segmentos de hojas, protocormos y pseudobulbos
<i>Saccharum officinarum</i> L	Micropropagación de variedades de caña de azúcar cultivadas en México.	Meristemos apicales
<i>Psychotria acuminata</i>	Micropropagación de la planta medicinal <i>Psychotria acuminata</i> .	Yemas axilares
<i>Agave marmorata</i> Roetzl	Micropropagación y aclimatación de maguey pitzometl en la mixteca poblana.	Brotos <i>in vitro</i>
<i>Lepidium virginicum</i>	Micropropagación de <i>Lepidium virginicum</i> (<i>brassicaceae</i>), planta con actividad antiprotozoaria.	Semillas
<i>Curcuma zedoaria</i>	Establecer un protocolo <i>in vitro</i> para micropropagación y callogénesis de <i>Curcuma zedoaria</i> para la producción de plantas.	Ápices de brotes
<i>Moringa oleifera</i>	Propagación <i>in vitro</i> de cultivares de <i>Moringa oleifera</i> .	Semillas
<i>Gymnema sylvestre</i>	Micropropagación <i>in vitro</i> de <i>Gymnema sylvestre</i> .	Nódulos axilares

La micropropagación es un proceso que implica el uso de medios nutritivos adecuados para propagar plantas en un ambiente artificial controlado, es una herramienta muy útil, porque tiene el potencial de seleccionar genotipos específicos, teniendo una tasa de reproducción ilimitada. por lo que se pueden producir plantas de calidad uniforme y un alto número de individuos (Castillo, 2004). Esto es posible gracias a la propiedad de totipotencia que tienen las células vegetales, teniendo la capacidad de regenerar tallos, raíces, embriones somáticos y hasta una planta completa, según sus capacidades y a los estímulos adecuados (Tabla 4) (Díaz *et al.*, 2010).

Hay cuatro etapas principales de la micropropagación: 1) Establecimiento del cultivo, lo más importante es la calidad de los explantes, lo que nos ayudará a tener un buen desarrollo del proceso, la edad fisiológica, época de recolección, tamaño y salud general de las plantas donantes. Las condiciones bajo las cuales crece el explante son el resultado de la interacción de tres factores: la condición del explante, que está determinada en parte por el medio de cultivo, el recipiente de cultivo y el ambiente externo o las condiciones de crecimiento del espacio de cultivo. El objetivo de esta etapa es establecer un cultivo factible y apropiado, el principal proceso de control es la selección, separación y esterilización de los explantes. 2) Desarrollo y reproducción de yemas: en esta etapa, el objetivo es mantener y aumentar el número de brotes para nuevos ciclos de multiplicación continuo y que las etapas posteriores de producción puedan continuar, este proceso lo podemos obtener a través de vías regenerativas como la organogénesis y la embriogénesis y pueden ocurrir directa o indirectamente, teniendo como ayuda el uso de fitohormonas, que permitido controlar de manera específica procesos como la producción de metabolitos secundarios, el tiempo de crecimiento y mejoramiento de especies vegetales (George *et al.*, 2008; Randel *et al.*, 2015).

3) Formación de raíces: en esta etapa se produce la formación de raíces adventicias y el fortalecimiento de la raíz principal, este proceso se realiza en condiciones *in vitro* utilizando diferentes tipos de reguladores de crecimiento (principalmente auxinas). 4) Endurecimiento y aclimatación: estos procesos aumentarán la resistencia de las plantas y restablecerán las características morfológicas y fisiológicas normales. Se puede decir que, es un proceso de adaptación donde el organismo se adecuará a los cambios de su entorno, como lo son cambios de temperatura, humedad, fotoperiodo o pH. La supervivencia de las plántulas regeneradas en el período de adaptación depende fundamentalmente de las características fisiológicas, estructurales y anatómicas, con buena apariencia, buen número de raíces y hojas y un tamaño

mayor a 10 cm en las plántulas que puedan desarrollar en el proceso de micropropagación (Levitus *et al.*, 2010; Escamilla-Moreno., 2015; Indacochea *et al.*,2017). La correcta selección y preparación del explante repercute directamente sobre la calidad del mismo y su respuesta frente a los dos principales problemas que afectan al establecimiento del cultivo que son la contaminación por microorganismos y la oxidación del explante (Eloísa- Hernández 2016).

2.9 Proceso de endurecimiento.

El proceso de endurecimiento es una etapa de la micropropagación donde una planta aumenta su resistencia estando expuesta a un estrés determinado, sometiéndola a dosis subletales de ese mismo estrés. Durante esta etapa se produce un retorno gradual al funcionamiento autotrófico, así como la recuperación de las características morfológicas y fisiológicas, como la producción de cera de las hojas en la parte externa, apertura de estomas, funcionamiento de raíces, asimilación de nutrientes (Díaz *et al.*, 2010; Sánchez *et al.*, 2012).

En el cultivo *in vitro* se potencian los mecanismos biológicos de las plantas relacionados con la resistencia a factores de estrés como el hídrico, térmico, nutricional y mecánico. Las plántulas que sufren un estrés por cambios en las condiciones de su entorno, deberán ser transferidas de forma gradual para que el endurecimiento llegue a ser efectivo (Osuna *et al.*, 2016). El endurecimiento de las plantas es un proceso que ocurre espontáneamente en la naturaleza y gracias a el, las plantas se aclimatan para sobrevivir o crecer bajo situaciones de estrés. Un ejemplo de endurecimiento es el aumento de la resistencia a las heladas que experimentan muchas especies leñosas del mundo templado y boreal al acercarse la época fría del año (Cortina *et al.*, 2006).

Durante la fase de endurecimiento *in vitro*, las plantas se someten a un estrés sucesivo y creciente para inducir respuestas de tipo morfológico, fisiológico y del comportamiento, que les permitirá tener un desarrollo adecuado. Se requiere la selección de plántulas con desarrollo foliar y radicular adecuado, lo cual permitirá su mayor resistencia a los cambios en las condiciones ambientales y su crecimiento autótrofo (Sánchez *et al.*, 2012). La sacarosa es el azúcar más utilizado en el cultivo *in vitro* ya que aporta carbono e induce la morfogénesis, su presencia en el medio de cultivo, es esencial para el desarrollo de una planta *in vitro* debido a que la fotosíntesis en estas condiciones de cultivo suele ser insuficiente para satisfacer la

demanda de carbono de la planta, sin embargo, cuando las concentraciones de sacarosa son bajas, se tiende a incrementar la capacidad fotosintética, funcionamiento de los estomas, engrosamiento de la cutícula y con ello se reducen las características fisiológicas anormales de la planta para adaptarse al suelo con lo que mejora su respuesta al trasplante (Silva-Villegas., 2009).

2.10 Proceso de aclimatación.

La aclimatación comienza cuando un organismo se adapta a un cambio en su entorno, cambio de temperatura, humedad, fotoperiodo o pH, el cual se lleva en un periodo que puede tardar días o semanas, esto permite que la planta vaya teniendo buen desarrollo y así retorno del funcionamiento autotrófico (Indacochea *et al.*,2017).

La aclimatación de las plantas consiste en el paso de las condiciones *in vitro* a las condiciones *ex vitro*, por lo que se debe tener un método estandarizado y así preparar las plántulas para su trasplante final (Lalam *et al.*, 2016). Durante este período se pretende corregir las anomalías fisiológicas y morfológicas como el desarrollo deficiente de la cutícula cerosa, el funcionamiento deficiente del sistema estomático, aparato fotosíntesis insuficiente y la baja eficiencia de absorción y transporte de agua, las cuales causarán el mayor porcentaje de pérdida de plantas. Cualquier estrategia desarrollada para la fase de adaptación debe asegurar una alta tasa de supervivencia y un rápido crecimiento de la misma especie, un número apropiado de ramas, área foliar y sistema de raíces, considerando el número y longitud de estas. La aclimatación es una etapa fundamental en un sistema de micropropagación porque dependen de ella la eficiencia del proceso y la calidad final de las plantas producidas *in vitro* (Díaz *et al.*, 2010; Castillo, 2004). La supervivencia de las plántulas regeneradas durante el periodo de adaptación depende fundamentalmente de las peculiaridades fisiológicas, estructurales y anatómicas que las plántulas pudieran desarrollar durante este proceso. Por esta razón, es necesaria la aplicación de técnicas de adaptación, para el cambio de las condiciones *in vitro* a *ex vitro*. Es fundamental apoyarse de sustratos, los cuales son uno de los materiales más usados para cultivos de invernadero. Debido a la diversidad de sustratos que puede haber, es todo un desafío seleccionar la mejor mezcla para sus cultivos (López *et al.*, 2014; Escamilla-Moreno, 2015).

2.11 Sustratos.

Los sustratos son materiales sólidos colocados en un recipiente que puede anclar el sistema de raíces de la planta y sostenerla, estos deben tener buenas características para el desarrollo de la planta en el cultivo (Hidalgo *et al.*, 2009), se pueden utilizar solos o combinados, dependiendo de sus propiedades físicas, químicas y biológicas, por otro lado, el sistema de producción, manejo del cultivo y el tipo de contenedor debe ser adecuado para cada especie (Gayosso *et al.*, 2016; Cortina *et al.*, 2006). Al determinar la elección del sustrato, se deben considerar ciertas propiedades físicas como: porosidad, retención de humedad, densidad aparente, distribución del tamaño de partículas y espacio de gas y propiedades químicas como: baja capacidad de intercambio catiónico, suficiente cantidad de nutrientes asimilables, bajo contenido de sal y mínima tasa de descomposición. Estas características están determinadas por los componentes que se usan y la proporción en la que se encuentran en la mezcla (Hidalgo *et al.*, 2009; Baixauli-Aguilar, 2000).

Los sustratos pueden clasificarse según el origen de sus materiales, tipo, degradabilidad y propiedades, en consecuencia, se pueden dividir en inertes y activos, cuyas diferencias se deben a la capacidad de intercambio catiónico o la capacidad de almacenamiento de los nutrientes por parte del sustrato con respecto al consumo de estos por la planta (Tabla 5) (López *et al.*, 2014). Los materiales químicamente activos acumulan los nutrientes y forman una reserva de la cual los va tomando la planta, por lo tanto, como un colchón nutritivo, esto va a depender de las necesidades de la planta, algunos ejemplos de estos sustratos son las turbas rubias y negras, orujos, residuos de la industria maderera, vermiculita, la corteza de pino, fibra de coco y cascarilla de arroz. Cuando la capacidad de intercambio catiónico (CIC) es casi nula, el material actúa exclusivamente como medio de soporte físico para el cultivo, sin ejercer influencia sobre el intercambio de minerales de los que se alimenta la planta, algunos ejemplos de estos sustratos son la grava, roca volcánica, perlita, arcilla y lana de roca (Martínez-Roca., 2011).

Tabla 5. Características de sustratos activos e inertes (Martínez-Roca., 2011; Baixauli- Aguilar., 2000; Gayosso *et al.*, 2016)

Tipos de sustratos	Características
Activos	
Vermiculita	Material muy ligero de elevada porosidad y niveles de retención de agua del 45 al 50%, su capacidad de intercambio catiónico es muy alta.
Fibra de coco	La fibra de coco es hidrófila, absorbe el agua con facilidad y no sufre contracción o expansión que afecte a su capacidad de aireación, contando con buen CIC.
Corteza de pino	Tiene alta capacidad de aireación, pH de 5,0 a 6,0 y bajo contenido de sales, es utilizado principalmente en cultivos ornamentales.
Inertes	
Perlita	Este sustrato presenta densidad baja, porosidad elevada, cuenta con baja capacidad de aireación y la mayor retención de agua.
Arcilla	La capacidad de retención del agua es pequeña, según su granulometría presenta aireación alta y baja capacidad de intercambio catiónico, lo que significa que, casi no retiene minerales.
Lana de roca	Sustrato sintético, presenta baja densidad aparente, alta porosidad y alta retención de agua, pH alto y puede liberar cantidades significativas de cationes especialmente de hierro y manganeso.

2.12 Planta de estudio: *Bouvardia ternifolia*.

Bouvardia ternifolia, mejor conocida como trompetilla, donita, candelilla, hierba de indio, hierba del pasmo, tlacoxochitl o mirto es una especie vegetal perteneciente a la familia de las Rubiácea. Crece en bosques templados, matorrales y pastizales de nuestro país y se distribuye en los estados de Durango, Hidalgo, Jalisco, Estado de México, Morelos, Nayarit, Oaxaca, Puebla, Querétaro, San Luis Potosí, Sonora, Tamaulipas, Veracruz, y Chiapas (figura 1) (Jiménez *et al.*, 2006; Herrera *et al.*, 2012).

Es un arbusto perene que puede llegar a medir hasta 3 metros de altura, su tallo cuenta con ramas con pelos blancos cortos en la juventud, 3 a 4 hojas verticiladas por nodo, estípulas pequeñas, pecíolos de 0.5 a 11 mm de largo, láminas extremadamente variables (lineares, lanceoladas, elípticas, ovadas u obovadas) con mayor frecuencia elíptico-lanceoladas de 1 a 10 cm de largo y 0.2 a 2.5 cm de ancho, ápice agudo, base cuneiforme, nerviación pinnada, con o sin pelos, inflorescencia generalmente en forma de cima terminal con 3 a 40 flores, pedicelos de 2 a 14 mm de largo, flores con corola tubular de color salmón, rojo o naranja, el tubo de 5 a 30 mm de

largo, con un anillo vellosos interno hacia la base, lóbulos ovados a oblongos, de 1.5 a 3.5 mm de largo, anteras de 2 a 4 mm de largo, lóbulos del cáliz lanceolados a lineares de 2 a 10 mm de largo, el fruto es una cápsula de 4.5 a 9 mm de largo y 5 a 10 mm de ancho, con 10 a 30 semillas de 2 a 3.5 mm de ancho (Jiménez *et al.*, 2006).



Figura 1. Distribución de *Bouvardia ternifolia* en la República Mexicana (Villaseñor y Espinosa., 1998).

2.13 Usos etnomedicos y fitoquímica de *Bouvardia ternifolia*.

En la medicina tradicional la raíz es utilizada en la reducción del efecto del veneno de escorpiones, insectos y serpientes, también se llega a utilizar para tratar problemas en el sistema digestivo (diarrea, disentería e infecciones), circulatorio (sangrado, hemorragias nasales y hematomas), respiratorio (asma) y nervioso (dolor, desórdenes mentales y nervios), al igual que fatiga, fiebre, como tónico cardiaco, para problemas en la piel como prurito o erisipela, problemas en el embarazo y parto, cólicos, para tratar la diabetes y la inflamación (Delgado-Altamarino., 2017; García *et al.*, 2015; Ferrer *et al.*, 2004; Herrera-García *et al.*, 2012; Fernández y Sánchez., 1981 ; Herrera-Morales., 2012; Jolad *et al.*, 1977; Mendoza *et al.*, 1997; Argueta-Villamar *et al.*, 1994; Pérez *et al.*, 1998).

Los estudios fitoquímicos han revelado diferentes componentes en esta planta como los hexapéptidos cíclicos bouvardin y deoxibouvardin con actividad antitumoral (Robert. *et al.*, 1976; Jolad *et al.*, 1977), ursólico y ácido oleanólico analizando la actividad hipoglucemiante

(Pérez *et al.*, 1998), ácido ursólico. y ácido oleanólico, determinaron la toxicidad aguda y subaguda (Cornejo-Garrido *et al.*, en 2012), bouvardin, desoxi-bouvardin y 6-O-metilbouvardin, actividad de inhibición competitiva de la enzima acetilcolinesterasa, además, las partes aéreas de la planta han mostrado actividad antioxidante y antiinflamatoria (Zapata *et al.* 2023), rutina, quercetina y kaempferol, analizando el efecto de inhibición de la enzima acetilcolinesterasa (Herrera-Ruíz *et al.*, 2012) escopoletia, en efecto antiinflamatorio (García *et al.*, 2015), extracto metanólico de hojas de *B. ternifolia*, para la inhibió del crecimiento micelial de *Rhizoctonia solani* y *Phytophthora infestans* (Gamboa *et al.*, 2003) y extractos hexánico y metanólico de raíces de *B. ternifolia* efecto sobre la inflamación aguda del páncreas (Jiménez *et al.*,2004)

2.14 Farmacología de *Bouvardia ternifolia*.

Se han realizado diversos estudios de actividades biológicas sobre *Bouvanifolia ternifolia*, los cuales se describen en la siguiente tabla.

Tabla 6. Actividades biológicas de *Bouvardia ternifolia*.

Extracto/ Compuesto	Actividad biológica	Modelo	Referencia
Extracto hexanico y matanolico de raíz de <i>B. ternifolia</i>	Actividad anti-toxica Actividad anti pancreática	Efecto inhibitorio de la acción toxica del veneno de <i>Centruroides limpidus limpidus</i> .	Jiménez <i>et al.</i> ,2004
Extracto hidroalcohólico de partes aéreas y sus fracciones (flavonoides)	Inhibición de la actividad de la acetilcolinesterasa	Inhibición de la enzima acetilcolinesterasa en homogenizado de cerebro de ratón.	Herrera-Ruiz 2012
Deoxibouvardin	Citotóxica	Inhibición de células tumorales de leucemia linfocítica P388.	Jolad <i>et al.</i> , 1977
Bouvardin	Citotóxica	Inhibición de células tumorales para sarcoma 180. Inhibición de la síntesis de proteínas de células tumorales (proliferación de células tumorales).	Chitnis <i>et al.</i> , 1985 Robert. <i>et al.</i> , 1976
Extracto hidroalcohólico de partes aéreas	Fungicida	Actividad fungicida contra <i>Rhizoctonia solani</i> Kühn.	Gamboa <i>et al.</i> , 2003
Extracto metanólico de raíz	Actividad anti-hiperglucémica.	Inhibición de hipoglucemia de los con constituyentes aislados en ratones diabéticos por aloxano.	Pérez <i>et al.</i> , 1998

Extracto hidroalcohólico de partes aéreas	Anti-alzhéimer (Inhibición de la actividad de la acetilcolinesterasa, antiinflamatoria, antioxidante y neuro protectora)	Inhibición de la actividad de la acetilcolinesterasa, edema de oído en ratones inducido por 2-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA), inhibición de peroxidación lipídica en homogenizado de cerebro de ratón e inhibición de neurotoxicidad inducida por β -amiloides.	García <i>et al.</i> , 2015
Extractos de raíz	Nueroprotectora	evaluar los efectos protectores de los extractos de raíz de <i>B. ternifolia</i> en ratones macho sobre la barrera hematoencefálica y la regulación positiva de las citocinas IL-1 β , IL-6 y TNF- α , y la caracterización de compuestos presentes en el diclorometano (BtD) y extractos de hexano (BtH)	Zapata <i>et al.</i> , 2023
Extractos y fracciones de raíz	Antiinflamatoria e inmunomoduladora	Modelo completo de adyuvante de Freund (CFA) en ratones e inhibición de NF- κ B en macrófagos RAW 264.7.	Zapata <i>et al.</i> , 2022

2.15 Cultivo *in vitro* de *Bouvardia ternifolia*.

Para la especie *Bouvardia ternifolia* se han empleado diferentes técnicas de cultivo *in vitro*, los cuales se mencionan en la siguiente tabla.

Tabla 7. Tratamientos para el establecimiento de cultivos *in vitro* de *Bouvardia ternifolia*. Auxinas: (2.4D) Acido 2,4 Diclorofenoxiacético, (ANA) Acido naftalenacético. (AIA) Acido indolacético, (KIN) Kinetina y (BAP) Bencilaminopurina.

Explante	Reguladores de crecimiento	Respuesta	Referencia
Tejido foliar	AIA/BAP	Organogénesis indirecta (formación de plántulas)	(Fernández-Sánchez., 1981)
Tejidos radiculares y foliares	ANA/BAP	Formación de callo	(Fernández-Sánchez., 1981)
Tejidos radiculares y foliares	AIA/KIN	Formación de callo	(Fernández-Sánchez., 1981)
Tejidos radiculares y foliares	KIN/24D	Formación de callo	(Fernández-Sánchez., 1981)
Células en suspensión	ANA/ BAP	Protoplastos	(Fernández-Sánchez., 1981)
Tejido foliar	BAP/ANA	Formación de callo	(Sánchez., 1983)
Radículas	KIN/24D	Formación de callo	(Sánchez., 1983)
Tejido foliar	KIN/24D	Formación de callo	(Murillo-Sánchez, 1985)
Tejido radicular y foliar	KIN/24D	Suspensiones celulares	(Murillo-Sánchez, 1984)
Tejido foliar	KIN/24D	Formación de callo	(Hernández-Olivera., 2017)
Tejido foliar e inflorescencias	KIN/24D	Suspensiones celulares	(Hernández-Olivera., 2017)
Tejido foliar	24D/KIN	Formación de callos	(Robert. <i>et al.</i> , 1976)

Tejido foliar	24D/KIN	Suspensiones celulares	(Robert. <i>et al.</i> , 1976)
Semillas	KIN/BAP	Formación de brotes	(García <i>et al.</i> , 2009)

3. Justificación

Desde épocas muy antiguas, las plantas se han utilizado como agentes importantes con fines terapéuticos, de acuerdo con la OMS, existe un incremento de personas utilizando la medicina tradicional para el tratamiento de diversos malestares. Como consecuencia, el interés científico en compuestos bioactivos obtenidos a partir de plantas medicinales ha ido en aumento, sin embargo, la extracción de estos a partir de material silvestre y las colectas intensivas podrían poner en riesgo las poblaciones naturales y perturbar su hábitat. *Bouvardia ternifolia* conocida como “trompetilla” tiene usos etnomédicos para tratar úlceras genitales, disentería, dolor de estómago, diarrea, rabia, fiebre, dolores articulares, como fortificante, para mordeduras de serpientes, abejas, escorpiones y arañas, curar llagas y detener el sangrado, tos, tosferina, en el tratamiento de espinillas o abscesos vaginales, moretones, controlar nervios y cansancio. Se le han otorgado actividades farmacológicas como citotóxicas, antitumorales, antiveneno, antiinflamatorias, neuroprotectora, antioxidante, hepatoprotectora, analgésica, homeostática y sedantes. Sus principales efectos se le atribuyen a diversos grupos de metabolitos secundarios como hexapéptidos cíclicos bouvardin, deoxibouvardin y 6-O-metilbouvardin, flavonoides como la rutina, quercetina, kaempferol, escopoletina, la presencia de ácidos triterpénicos, como el ácido ursólico y el ácido oleanólico. Estos datos comprueban el gran potencial de aplicación farmacológica de *Bouvardia ternifolia* y hablando a favor del empleo de estrategias biotecnológicas para establecer un protocolo eficiente que permita la producción de compuestos bioactivos. La micropropagación *in vitro* permite la obtención masiva de plántulas mediante un sistema de propagación clonal como alternativa a la colecta de ejemplares silvestres, por lo cual; tener la disponibilidad de material todo el año es factible ya que algunas especies solo están presentes en cierta época del año, teniendo un sistema independiente de las condiciones externas donde el número de plantas que se puede obtener es ilimitado para el desarrollo de análisis químicos y/o farmacológicos. En la presente propuesta de investigación se planteó realizar el establecimiento de un protocolo de micropropagación y de aclimatación de plántulas de

Bouvardia ternifolia generadas por organogénesis indirecta como posible fuente de producción de metabolitos secundarios con aplicación farmacológica.

4. Hipótesis

El implemento de un protocolo de micropropagación y aclimatación de plántulas de *Bouvardia ternifolia* generadas por organogénesis indirecta permitirá el establecimiento de un cultivo de plantas en condiciones de invernadero.

5. Objetivo general

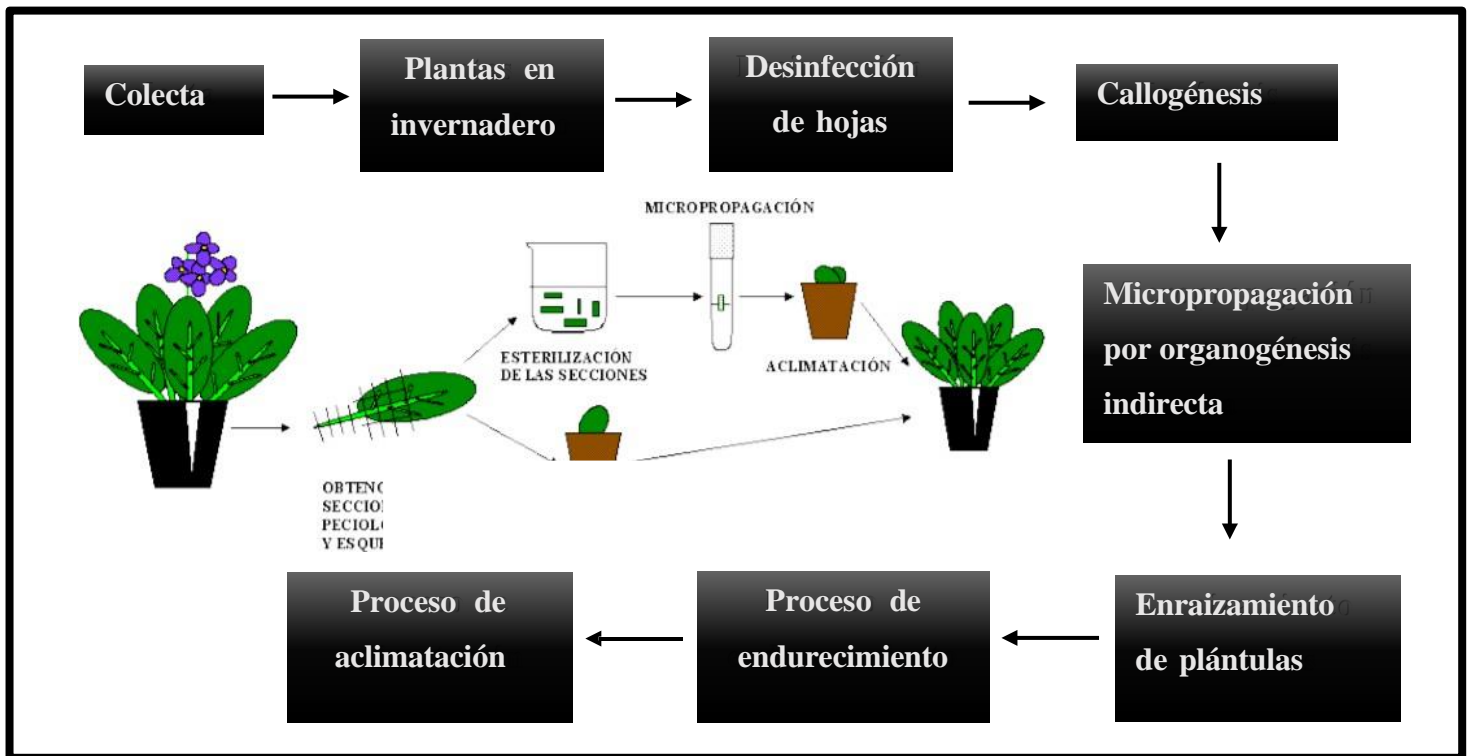
Establecer un protocolo de micropropagación y aclimatación en plántulas de *Bouvardia ternifolia* generadas por organogénesis indirecta

5.1 Objetivos particulares

1. Evaluar diferentes concentraciones y combinaciones de reguladores de crecimiento en la inducción a callogénesis en *Bouvardia ternifolia*.
2. Generar plántulas de *Bouvardia ternifolia* a través de un proceso de micropropagación por organogénesis indirecta.
3. Evaluar diferentes concentraciones y combinaciones de reguladores de crecimiento en la inducción a enraizamiento de plántulas en *Bouvardia ternifolia*.
4. Desarrollar un método de endurecimiento de plántulas y aclimatación en *Bouvardia ternifolia*.
5. Evaluar el porcentaje de supervivencia de plántulas de *Bouvardia ternifolia* en diferentes sustratos.

6. Metodología.

Figura 2. Estrategia experimental.



6.1 Material vegetal.

Plantas de *Bouvardia ternifolia* (Cav.) Schlechter (*Rubiaceae*) se colectaron en agosto del 2018 en la comunidad de Coajomulco, Municipio de Huitzilac Morelos (19° 01' 37.94" N; 99° 12' 39.57" W con 2589 msnm) en temporada de sequía. Un ejemplar fue llevado al herbario del Centro Médico Siglo XXI (IMSSM) para su autenticación por la Dra. Abigail Aguilar Contreras, registrándolo con el número HPMIMSS13596.

6.2 Medios de cultivo.

Para la realización de los ensayos de cultivo *in vitro* de *Bouvardia ternifolia* se utilizó el medio basal de Murashige y Skoog (MS) (1962) modificado al 50% de sus macro y micronutrientes. Se utilizaron sacarosa al 3% como fuente de carbono y 0.1 g/L mio-inositol con un pH ajustado a 5.75 ± 0.1 previo a la esterilización en autoclave por 25 min a 121°C.

6.3 Medio de desinfección.

Medio basal MS complementado 1 g/L con carbón activado y 3 g/L de Phytigel® (Sigma) (medio semisólido) (tabla 9).

6.4 Medio de inducción a callogénesis.

Medio basal MS complementado con los reguladores de crecimiento ácido α -naftalenacético (ANA), 6-bencilaminopurina (BAP), ácido indol-3-acético (AIA), 6-furfurilaminopurina (KIN) y ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) a diferentes concentraciones y combinaciones (tabla 10).

6.5 Medio de inducción a micropropagación por organogénesis indirecta.

Medio basal MS complementado con los reguladores de crecimiento ácido indol-3-acético (AIA) y 6-bencilaminopurina (BAP) a una concentración de 0.1 mg/L.

6.6 Medio de inducción a enraizamiento en plántulas.

Medio basal MS complementado con los reguladores de crecimiento ácido 2,4-diclorofenoxiacético (24D), ácido indolbutírico (IBA), ácido α -naftalenacético (ANA) y ácido indol-3-acético (AIA) a diferentes concentraciones y combinaciones (tabla 11).

6.7 Medio para el proceso de endurecimiento en plántulas.

Tabla 8. Medio basal MS con reducción gradual en la concentración de sacarosa.

Reducción gradual de la concentración de sacarosa

Concentración de sacarosa	Tiempo (semanas)
20 g/L Sacarosa	1
10 g/L Sacarosa	2
5 g/L Sacarosa	3
0 g/L Sacarosa	4

6.8 Método de desinfección en explantes de *B. ternifolia*.

Para la desinfección de explantes de *B. ternifolia* se llevó a cabo el siguiente protocolo (Tabla 9). El proceso se llevó a cabo dentro de una campana de flujo laminar (marca VECO). Se colocaron 5 hojas en frascos que tenían 250 ml que contenían 25 ml de medio basal MS. Los frascos fueron depositados en un cuarto de cultivo a temperatura de 25°C y fotoperiodo de 16h luz/8h oscuridad por un periodo de 7 días.

Tabla 9. Proceso de desinfección de explantes de *Bouvardia ternifolia*.

N° Lavado	Tratamiento	Tiempo(minutos)
1	Agua estéril	2
2	Agua estéril	2
3	Etanol al 70%	6
4	Agua estéril	1
5	Hipoclorito de sodio	12
6	Agua estéril	1
7	Agua estéril	1

6.9 Proceso de inducción a callogénesis en *Bouvardia ternifolia*.

Frascos con 250 ml que contenían 25ml de medio basal MS adicionado con los reguladores de crecimiento ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2.4D), ácido naftalenacético (ANA), ácido indolacético (AIA), kinetina (KIN) y 6-bencilaminopurina (BAP) a diferentes concentraciones y combinaciones (tabla 10), fueron utilizados para la inducción a la formación de callo tipo compacto con 6 repeticiones por tratamiento (4 explantes para cada tratamiento). La incubación de los explantes tomó un periodo de 28 días a temperatura de 25°C y fotoperiodo de 16h luz/8h. Después de un periodo de 3 semanas se registraron los cambios en las características físicas y el número de explantes con formación de callo compacto.

Tabla 10. Tratamientos para la inducción a callogenesis de tipo compacto a partir de explantes de hoja de *B. ternifolia* con los reguladores de crecimiento 4 diclorofenoxiacetico, ácido naftalenacético, ácido indolacético, kinetina y 6-bencilaminopurina.

Tratamiento	Reguladores de crecimiento (mg/L)	Referencia
1	ANA 2mg/L / BAP 0.002	(Fernández y Sánchez 1981)
2	ANA 1mg/L /BAP 0.01	(Sánchez., 1983)
3	AIA 5mg/L /KIN 0.01	(Fernández y Sánchez., 1981)
4	KIN 1mg/L/24D 0.005	(Murillo-Sánchez, 1985)
5	KIN 1mg/L/24D 0.05	(Hernández-Vázquez., 2017)

6.10 Proceso de inducción a organogénesis indirecta en *Bouvardia ternifolia*.

Se utilizaron los reguladores de crecimiento ácido indolacético y 6-bencilaminopurina a una concentración de 0.1mg/L, tomando como referencia a Fernández y Sánchez., 1981 para la inducción a organogénesis indirecta a partir de los callos compactos obtenidos en ensayos anteriores y el desarrollo de las plántulas generadas.

En frascos que tenían 250 ml que contenían 25 ml de medio basal MS. Los frascos fueron depositados en un cuarto de cultivo a temperatura de 25°C y fotoperiodo de 16h luz/8h oscuridad por un periodo de 4 semanas.

6.11 Proceso de inducción a enraizamiento de plántulas de *Bouvardia ternifolia*.

Se emplearon las auxinas ácido 2,4 diclorofenoxiacetico (2,4-D), ácido naftalenacético (ANA), ácido indolacético (AIA) y ácido indolbutírico (IBA) a diferentes concentraciones y

combinaciones para la inducción a la formación de raíces en los brotes desarrollados. Se establecieron 12 tratamientos (tabla 11) con 5 repeticiones cada uno (4 plántulas por repetición). Después de un periodo de 8 semanas se determinó el número de plántulas por tratamiento con la formación de raíces. En frascos que tenían 250 ml que contenían 25 ml de medio basal MS. Los frascos fueron depositados en un cuarto de cultivo a temperatura de 25°C y fotoperiodo de 16h luz/8h oscuridad por un periodo de 8 semanas.

Tabla 11. Tratamientos para la inducción a enraizamiento de plántulas de *B. ternifolia* ácido 2,4 diclorofenoxiacético, ácido naftalenacético, ácido indolacético y ácido indolbutírico.

Tratamientos	Reguladores de crecimiento (mg/L)			
	2.4-D	IBA	ANA	AIA
1	0.5mg/L			
2	0.25mg/L			
3	0.125mg/L			
4		0.5mg/L		
5		0.25mg/L		
6		0.125mg/L		
7			0.5mg/L	
8			0.25mg/L	
9			0.125mg/L	
10				0.5mg/L
11				0.25mg/L
12				0.125mg/L

6.12 Optimización de proceso de enraizamiento en plántulas de *Bouvardia ternifolia*.

Posterior a obtener los resultados de enraizamiento de los 12 tratamientos propuestos, se agregaron dos tratamientos más con 50 repeticiones con 4 plántulas cada uno, modificando las concentraciones de los reguladores de crecimiento utilizados en el tratamiento número 10, el cual fue el de mayor respuesta a la formación de raíces en plántulas de *Bouvardia ternifolia*. Las plántulas utilizadas fueron obtenidas a partir del proceso de micropropagación en ensayos anteriores. Estos tratamientos fueron propuestos con la finalidad de potenciar la respuesta a la formación de raíz, incrementando las concentraciones de la auxina AIA (Ácido indol-acético), ya que se ha observado que, en concentraciones elevadas, este regulador provoca una respuesta positiva a la formación de raíz en plántulas de *Bouvardia ternifolia* (Alcántara-Godoy., 2019). Las plántulas con formación de raíz fueron utilizadas en el proceso de endurecimiento.

6.13 Proceso de endurecimiento de plántulas *in vitro* de *Bouvardia ternifolia*.

Para iniciar el proceso de endurecimiento se utilizaron las plántulas provenientes del tratamiento de enraizamiento empleando medio MS basal sin la adición de reguladores de crecimiento, con una reducción gradual de la fuente de carbono (sacarosa): 20 g/L en la primera semana, 10 g/L en la segunda semana, 5 g/L en tercera semana y 0 g/L en la cuarta semana. Se utilizaron frascos de 250 ml con 25 ml de medio MS, los frascos se esterilizaron en autoclave a 120°C por 20 minutos. En frascos que tenían 250 ml que contenían 25 ml de medio basal MS. Los frascos fueron depositados en un cuarto de cultivo a temperatura de 25°C y fotoperiodo de 16h luz/8h oscuridad por un periodo de 4 semanas.

La transferencia del material vegetal se realizó después de una semana de haber terminado el proceso reducción de sacarosa. Posteriormente se colocaron en frascos con 25 gr de los sustratos perlita y vermiculita al 100% esterilizados 3 veces a 120°C por 20 minutos en autoclave, se dejaron en condiciones de cuarto de cultivo a temperatura de 25°C y fotoperiodo de 16h luz/8h con riego con agua destilada cada 7 días por un periodo de 4 semanas para finalizar con el endurecimiento.

6.14 Acondicionamiento *ex vitro* de plántulas de *B. ternifolia* en diferentes sustratos.

Los sustratos vermiculita, perlita y tierra se colocaron en macetas de 20 cm de largo, 20 cm ancho y 20 cm alto, con las siguientes combinaciones: Tratamiento 1: 25% vermiculita / 75% tierra. Tratamiento 2: 50% vermiculita / 50% tierra. Tratamiento 3: 75% vermiculita / 25% tierra. Tratamiento 4: 25% perlita / 75% tierra. Tratamiento 5: 50% perlita / 50% tierra. Tratamiento 6: 75% perlita / 25% tierra.

Para la transferencia de las plántulas a los sustratos, las raíces se lavaron en agua destilada estéril, las plántulas tuvieron un proceso de selección con base a ciertos criterios: número de hojas, presencia de raíces laterales y una estatura promedio de 5 a 6 cm. Las macetas se mantuvieron en un cuarto de cultivo a temperatura de 25°C y fotoperiodo de 16h luz/8h,

realizando riegos diarios con 100 ml de agua estéril durante las primeras semanas para mantener una alta humedad, para posterior realizar riegos cada tercer día.

7 RESULTADOS Y DISCUSION.

7.1 Desinfección de explantes.



Figura 3. Explantes desinfectados de *Bouvardia ternifolia* colocados en frascos con medios MS basal por 7 días.

Para obtener explantes y plántulas libres de patógenos se requiere del implemento de diferentes métodos de desinfección, etapa crucial para el establecimiento de cultivos *in vitro* viables. El lavado de los explantes con productos desinfectantes bajo condiciones asépticas, elimina patógenos superficiales, sin embargo puede ocasionar daños en las células, produciendo necrosis y afectando eventualmente los procesos *in vitro* (Ticona-Triguero, 2019), por lo cual es necesario desarrollar un tratamiento óptimo para cada especie, de acuerdo a la superficie de contacto y naturaleza del explante, existen tratamientos que vinculan concentraciones óptimas de usar para cada desinfectante versus tiempo de exposición, lo cual proporcione una cantidad aceptable de explantes viables (Eloísa- Hernández., 2016).

Se realizó el método de desinfección descrito en la tabla 9 sobre explantes de hojas de *Bouvardia ternifolia*, obteniendo un porcentaje del 98% de efectividad, logrando observar posterior a 7 días del ensayo, explantes sin daño, fenolización, muerte o contaminación por bacterias u hongos (figura 3), por lo que el método utilizado fue determinado como idóneo sobre esta especie. El método fue similar al utilizado por Fernández y Sánchez (1981) sobre *Bouvardia ternifolia*, donde trabajó con explantes como hojas, tallos, peciolo y raíces, sumergiendo en etanol al 70%, hipoclorito de sodio y agua destilada estéril, obteniendo un 80% de efectividad. Los explantes desinfectados fueron utilizados para la inducción a la formación de callo tipo organogénico.

7.2 Proceso de inducción a callogénesis en *Bouvardia ternifolia*.

Los reguladores de crecimiento son las principales herramientas para el cultivo de tejidos y células vegetales, estos pueden ocasionar varias respuestas como la producción de células no organizadas denominadas callos, esto puede suceder siempre y cuando se llegue a utilizar la concentración y combinación correcta para la especie de estudio (Cossío., 2013). Las auxinas y citoquininas como reguladores de crecimiento importantes en el crecimiento y la morfogénesis en el cultivo *in vitro*. La producción de callo puede generarse por los efectos de las auxinas y las citoquininas en conjunto ya que gracias a que sus funciones promotoras de división celular se puede obtener este cumulo de células no diferenciadas, se requiere de un explante inicial, el que pueda tener una alta diferenciación de sus tejidos, como raíz, tallo u hoja, en cualquier caso, la inducción de callo representa un proceso de desdiferenciación y división celular intensa, el cual depende principalmente del explantes, genotipo, medio de cultivo, tipo de regular de crecimiento como también su concentración y combinación (Randel *et al.*, 2015) (Beraut *et al.*, 2014)

Para el cultivo de callo se utilizaron 24 explantes de hoja de *B. ternifolia* desinfectados por tratamiento, expuestos a diferentes combinaciones y concentraciones de reguladores de crecimiento como se muestra en la tabla 10, dando como resultados lo siguiente: A 3 semanas de haber iniciado el proceso de inducción callogénesis, el tratamiento 2 (ANA 1mg/L/BAP 0.01mg/L) produjo una mayor cantidad de callo compacto u organogénico (29.16% de respuesta) (figura 4) en comparación con los otros tratamientos, donde se obtuvieron porcentajes de respuesta entre el 4.16 y el 16.66 % (tabla 12). Los callos obtenidos mostraron una consistencia dura y coloración verde intenso, sin embargo, también se dio la formación de callo de tipo friable, el cual presentó una consistencia disgregable y coloración beige claro (figura 5). El callo compacto u organogénico fue utilizado en la siguiente fase de este proyecto, la inducción a organogénesis para la generación de plántulas. La formación de callos depende en gran medida de los tipos de explantes y hormonas utilizadas (Rodríguez *et al.*, 2014). En *Bouvardia ternifolia*, cuando los explantes fueron expuestos a ANA 1 mg / L / BAP 0,01 mg / L, la formación de callo organogénico aumentó significativamente, mientras que en el tratamiento 1 ANA 2/BAP 0.002 mg/L dio un resultado del 16.66%, el tratamiento 3 AIA 5/KIN

0.01 mg/L dio un resultado del 4.16%, el tratamiento 4 KIN 1/24D 0.005 mg/L dio un resultado del 8.33% y el tratamiento 5 KIN 1/24D 0.05 mg/L dio un resultado del 16.66%, mostrando un bajo resultado para la formación de callo tipo organogénico.

Los resultados observados son similares a los obtenidos por Sánchez en 1983, donde al utilizar los mismos reguladores de crecimiento en iguales condiciones (ANA 1mg / L / BAP 0.01mg /L), indujeron la formación de callo tipo organogénico.

Por otro lado, Fernández y Sánchez en 1981 mencionan que, al utilizar los reguladores de crecimiento ANA (2 mg / L) y BAP (0.002mg/L), se da la formación de callo de tipo compacto, sin embargo, al utilizar el mismo tratamiento en este proyecto, no se mostró respuesta positiva a la formación de callo compacto, pero sí a la de callo friable.



Figura 4. Callos organogénicos de *Bouvardia ternifolia* obtenidos a partir del tratamiento número 2 (ANA 1mg/L/BAP 0.01mg/L) de inducción a callogénesis.



Figura 5. Callo friable de *Bouvardia ternifolia* obtenido a partir del tratamiento número 3 (AIA 5mg/L /KIN 0.01) de inducción a callogénesis.

Los callos compactos obtenidos fueron utilizados para la inducción a organogénesis y la obtención de plántula a partir de la exposición con los reguladores AIA y BAP a una concentración de 0.1mg/L cada uno.

Tabla 12. Producción de callo compacto u organogénico durante el periodo de evaluación en los diferentes tratamientos de inducción a callogénesis en *B. ternifolia*.

Tratamiento	Nº de explantes con formación de callos organogénicos	Porcentaje de respuesta
1 ANA 2mg/L / BAP 0.002 mg/L	4 de 24	16.66%
2 ANA 1mg/L / BAP 0.01 mg/L	7 de 24	29.16%
3 AIA 5mg/L / KIN 0.01 mg/L	1 de 24	4.16%
4 KIN 1mg/L / 24D 0.005 mg/L	2 de 24	8.33%
5 KIN 1mg/L / 24D 0.05 mg/L	4 de 24	16.66%

7.3 Proceso de inducción a organogénesis indirecta.

Debemos de tener en cuenta los tipos de reguladores, su combinación y rangos de concentración que deben ser optimizados para cada especie, genotipo y etapa de multiplicación determinada. Las condiciones de incubación de los cultivos *in vitro* dependerán de la especie con la que se trabaje (Segretín., 2015). La función principal de las auxinas y citoquininas es la de ejercer múltiples efectos sobre el crecimiento y desarrollo de órganos vegetales, la presencia de citoquininas provoca la formación de nuevos brotes, permitiendo así la aparición de nudos y a su vez nuevas hojas mientras que las auxinas promueve la división celular estimulando el crecimiento vegetativo de los explantes, la relación entre auxinas y citoquininas son la explicación de una serie de procesos fisiológicos, incluida la regulación de la división celular y así la multiplicación de brotes (Jordan-Casserato., 2006; Eloísa,-Hernández., 2016; Azcón-Talón., 2013).

Los resultados observados también guardan similitud con los descritos por diferentes autores durante la propagación *in vitro* de otras especies arbóreas como *Tectona grandis* L., *Pithecellobium dulce*, *Caesalpinia spinosa*, *O. Kuntz* y *C. officinalis*. Los autores refieren que con el empleo de estos reguladores de crecimiento en el medio de cultivo podemos obtener la formación de nuevos brotes, así como modelo para otras especies forestales de la familia *Rubiaceae* (Jiménez *et al.*, 2018).

La totalidad de callos compactos obtenidos en el proceso de callogénesis fueron colocados en tratamientos para la inducción a organogénesis indirecta y la producción de plántulas utilizando los reguladores de crecimiento AIA y BAP a una concentración de 0.1mg/L cada uno. Se logró observar la formación de brotes, nudos y hojas en un periodo de 30 días, donde se alcanzó mejores niveles de brotación en plántulas de *Bouvardia ternifolia* utilizando esta combinación y concentración. Durante la primera semana de exposición de los callos compactos a los reguladores de crecimiento, se observó un aumento de su volumen y la formación de brotes en algunas zonas del callo, a partir de la segunda semana de cultivo se observó un aumento en la proliferación de brotes y su elongamiento (figura 6).

A partir de la tercera semana se observó un mayor crecimiento de los brotes con la formación de hojas, obteniendo en la cuarta semana plántulas de aproximadamente 1 a 2.5 cm de diámetro con la presencia de 2 a 4 hojas, las cuales fueron individualizadas para llevar a cabo el proceso de enraizamiento (figura 7). El éxito radicó en varios factores para la manipulación de la organogénesis, entre ellos, se menciona el tamaño y la edad fisiológica de los explantes, genotipo, medio de cultivo, concentración y combinación de reguladores de crecimiento debido a que se ha comprobado que los tejidos juveniles tienen mayor respuesta a la formación de brotes, ya que explantes como hojas, tallos o raíces tienen alta diferenciación de sus tejidos (Pérez *et al.*, 2008) (Rodríguez *et al.*, 2018).

Los resultados obtenidos se compararon con los de Fernández-Sánchez., 1981, encontrándose similitud en la formación de brotes, que se llevó en un periodo de 20 días utilizando los reguladores AIA Y BAP en concentraciones 0.1 mg/L. Esto nos demuestra que las auxinas y las citoquininas en conjunto disparan la brotación de manera rápida y eficaz en comparación a otras

especies vegetales donde los tiempos de respuestas pueden alargarse a semanas y hasta meses, lo cual permitirá estandarizar en futuras investigaciones sobre *Bouvardia ternifolia*.

Las plántulas obtenidas fueron utilizadas para el proceso de enraizamiento a partir de la exposición a los reguladores de crecimiento, proponiendo 12 tratamientos con 4 auxinas en 3 diferentes concentraciones (tabla 11).

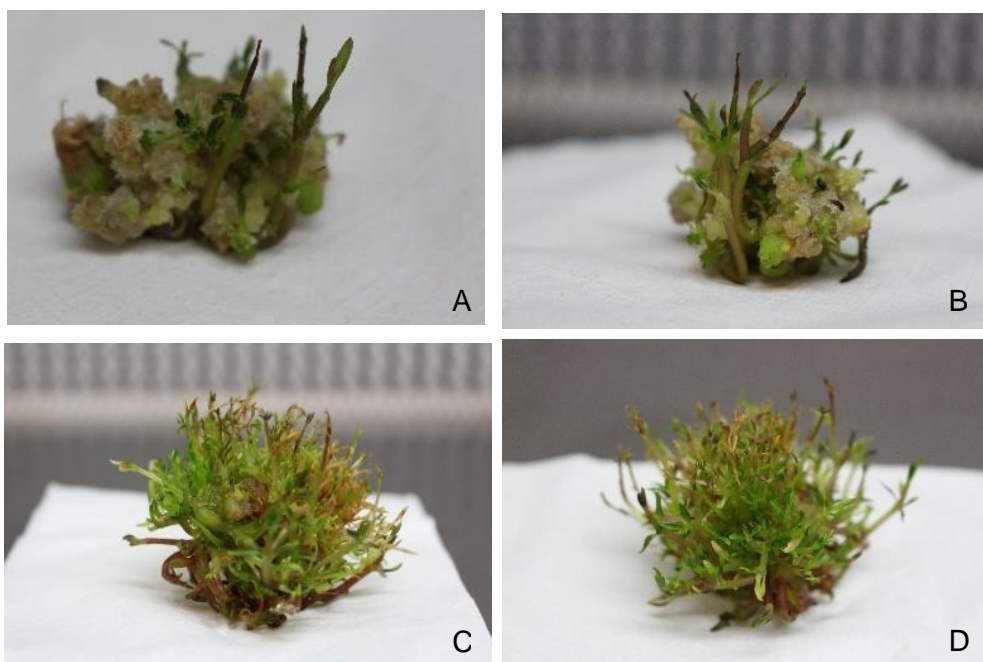


Figura 6. Proceso de organogénesis indirecta de *Bouvardia ternifolia* durante un periodo de 4 semanas. A) Callo organogénico expuesto por 1 semana a reguladores de crecimiento. B) Callo organogénico expuesto por 2 semanas a reguladores de crecimiento con la generación de un mayor número de brotes. C) Callo organogénico expuesto por 3 semanas a reguladores de crecimiento con elongación de los brotes generados. D) Callo organogénico expuesto por 4 semanas a los reguladores de crecimiento.



Figura 7. Proceso de individualización de plantulas de *B. ternifolia* obtenidas por organogénesis indirecta.

7.4 Proceso de inducción a enraizamiento de plántulas de *B. ternifolia*.

Para el proceso de enraizamiento se colocaron 12 tratamientos con 5 repeticiones cada uno (4 plántulas individualizadas por repetición), subcultivadas en medio MS basal con diferentes combinaciones y concentraciones de reguladores de crecimiento (tabla 11) para la inducción a la formación de raíces. Después de 21 días de exposición a los diferentes tratamientos, se observó la formación de raíces en los tratamientos número 9 (ANA a 0.125mg/L) y 10 (AIA a 0.5mg/L) con un porcentaje de respuesta del 10 y del 80 % respectivamente, posteriormente se realizaron 2 nuevos tratamientos modificando las concentraciones de reguladores de crecimiento del tratamiento número 10.

El tratamiento número 10 mostró la mejor respuesta respecto al grosor de la raíz, extensión y a la altura del brote, con diferencias significativas del resto de los tratamientos. El número de hojas y alargamiento del tallo fue superior con diferencias significativas en comparación con el resto de los tratamientos. Se probaron 2 tratamientos más (número 13 y 14) para mejorar la respuesta observada en el tratamiento número 10, aumentando la concentración del regulador de crecimiento AIA, sin embargo, estos tratamientos no mostraron los resultados esperados y fueron descartados por inducir solo la formación de callo de tipo friable en la parte inferior de las plántulas individualizadas, mostrando hinchamiento del tejido y proliferación celular

desorganizada (figura 9) al igual que en los tratamientos número 1,2,3,6,7 y 8. La formación de callo en la región basal de los brotes podría estar relacionado con el incremento exógeno de la concentración de auxina, ya que se reconoce que algunas plantas pueden tener un elevado contenido endógeno, provocando la división celular descontrolada dando lugar a la formación de masas callosas (Ruiz *et al.*, 2016).

En los tratamientos número 4,5,11 y 12 no se observó ningún cambio, es decir la formación de callo friable o la formación de raíz (figura 9), por lo que se determinó al tratamiento número 10 (AIA a 0.5mg/L) como el de mejores características para llevar a cabo el enraizamiento de plántulas de *B. ternifolia*. Dentro de las características más relevantes de las auxinas se encuentra su capacidad para inducir la formación y elongación de tallos en vegetales, promover la división celular en cultivos de callos y como principal, el promover la formación de raíces adventicias.

El AIA es un axina producida de manera natural por las plantas, pero también se puede producir de manera sintética con características potenciadas en comparación con la molécula natural, esta fitohormona es muy importantes en el desarrollo del sistema radicular primario, lateral y adventicio por lo que se les atribuye una actividad específica en la formación estructural de la raíz, además, tienen la capacidad de controlar y regular los factores dependientes del desarrollo radicular (crecimiento de ejes radiculares, aparición de raíces laterales y dirección y elongación de la raíz) (Alcántara-Godoy., 2019). Con el uso de esta auxina se obtuvo el mayor efecto sobre la formación de raíces en plántulas de *Bouvardia ternifolia*. Para lograr esto se tuvo que optimizar un protocolo para la especie, donde se procuró minimizar la formación de callo y maximizar la tasa de enraizamiento y supervivencia de las plantas.

Trabajando con *Bouvardia ternifolia* en 2009, García indujo la formación de raíces adventicias en brotes de *Bouvardia ternifolia* utilizando los reguladores IBA, AIA y ANA con 5 concentraciones diferentes para cada auxina, permitiendo así la formación de raíces de mayor longitud, grosor y vitalidad con el regulador de crecimiento ácido indolbutírico (IBA) en una concentración de 0.5 mg / L, sus resultados difieren con los obtenidos en este proyecto, ya que no se encontró formación de raíces en la concentración propuesta de (IBA). La diferencia en los resultados podría estar relacionada con el “ecotipo”, término utilizado para una subpoblación genéticamente diferenciada al resto de individuos de la misma especie. Esto plantea que los especímenes utilizados por García podrían diferir genéticamente a los utilizados en este

proyecto a pesar de tratarse de la misma especie, por lo que la respuesta a la formación de raíces adventicias se obtuvo al utilizar diferentes auxinas (Lara-Valverde., 2003).

Se realizó un análisis de varianza de 1 vía para posteriormente llevar a cabo el método estadístico de Dunnett para la determinar los 12 tratamientos de inducción a enraizamiento y ver si tienen una diferencia significativa versus el control, el método de Dunnett determina los niveles de confianza para cada tratamiento según corresponda, en los tratamientos número 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 11 y 12 obtuvieron una respuesta negativa por lo que no existe una diferencia significativa para generación de raíces respecto al control, en el tratamiento número 10 se obtuvo un resultado positivo, mostrando una producción significativa en el número de raíces respecto al control. Como resultado de este estadístico, los datos nos sugieren utilizar el tratamiento número 10 (AIA a .5mg/L) para la inducción a rizogénesis es el óptimo en *Bouvardia ternifolia*.

Tabla 13. Tratamientos de enraizamiento en plántulas de *B. ternifolia*. ANOVA: F (12,52)= 101.9 $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (***) contra el control negativo (prueba de Dunnett's).

Tratamientos	% de respuesta a la formación de raíz	% de respuesta a la formación de callo friable	% plántulas sin respuesta
T1 (2.4-D a .5mg/L)	0%	20%	80%
T2 (2.4-D a .25mg/L)	0%	25%	75%
T3 (2.4-D a .125mg/L)	0%	15%	85%
T4 (IBA a .5mg/L)	0%	0%	100%
T5 (IBA a .25mg/L)	0%	0%	100%
T6 (IBA a .125mg/L)	0%	35%	65%
T7 (ANA a .5mg/L)	0%	25%	75%
T8 (ANA a .25mg/L)	0%	10%	90%
T9 (ANA a .125mg/L)	10%	0%	90% *
T10 (AIA a .5mg/L)	80%	0%	20% ***
T11(AIA a .25mg/L)	0%	0%	100%
T12 (AIA a .125mg/L)	0%	0%	100%



Figura 8. Plantulas de *B. ternifolia* con la formación de callo friable en tratamiento de enraizamiento de los tratamientos 2, 3, 6 y 7.



Figura 9. Plantulas de *B. ternifolia* sin respuesta a la formación de raíz en los tratamientos 1, 4, 5, 8, 9, 11, 12, 13 y 14.

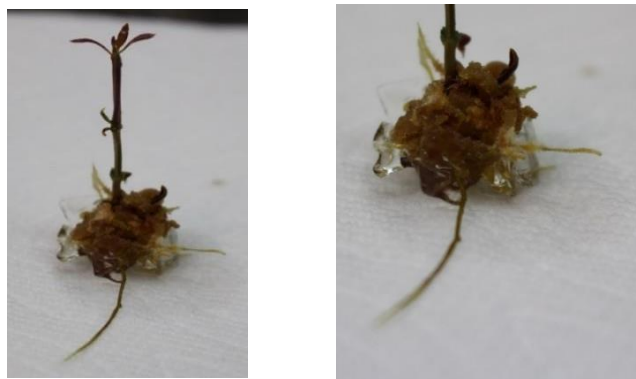


Figura 10. Plántulas de *B. ternifolia* con respuesta a la formación de raíz del tratamiento numero 10.

7.5 Proceso de endurecimiento de plántulas *in vitro* de *Bouvardia ternifolia*.

El proceso de endurecimiento se realiza en la última etapa del proceso de micropropagación, es el momento adecuado para "fortalecer" la planta y observar los mecanismos fisiológicos y morfológicos de su resistencia a los factores de estrés (Cortina *et al.*, 2006), asegurando así un óptimo desarrollo bajo condiciones *in vitro*. El método utilizado sobre las plántulas de *Bouvardia ternifolia* fue reducir gradualmente la concentración de sacarosa y aumentar gradualmente el intercambio gaseoso y sus funciones fisiológicas (figura 11). Durante este proceso se utilizaron 18 plántulas provenientes del proceso de enraizamiento y sometidas a estrés, mostrando cambios lentos y de forma gradual.



Figura 11. Plántulas de *B. ternifolia* sometidas a estrés nutricional.

Durante el proceso de eliminación gradual de la fuente de carbono (sacarosa) se observó el crecimiento de la raíz, elongación del tallo y formación de nuevas hojas. El endurecimiento es un proceso en el que se promueven los mecanismos de resistencia y según Azcon-Talon (2013), el concepto de resistencia o tolerancia al estrés hace referencia a la capacidad de una planta para sobreponerse a condiciones ambientales desfavorables. El logro se basa en la activación de la fotosíntesis durante la fase de endurecimiento que constituye una etapa decisiva en la adaptación a las condiciones naturales, de lo contrario ocurre la muerte de las plantas, principalmente por el bajo de la funcionalidad autotrófica, desarrollo brotes funcionales e incrementar la resistencia a la pérdida de agua y el ataque de patógenos, tienen una alta tasa de transpiración, que provoca una gran pérdida de agua, debido a que poseen una delgada capa de cera epicuticular y un anormal funcionamiento de los estomas, raíces poco funcionales, presentando epidermis no suberizada y pocos pelos radicales, los que generalmente mueren postranplante (Lalam *et al.*, 2016; Indacochea *et al.*, 2017).

En el proceso de aumento en el intercambio gaseoso y adecuación a sustrato se utilizaron 18 plántulas provenientes de la fase de reducción de sacarosa, se colocaron en frascos que contenían los sustratos perlita y vermiculita al 100% (25 gr) (figura 12). Cada tres días, las tapas de aluminio de los frascos que contenían a las plántulas en sustrato fueron perforadas y regadas con 5 ml de agua estéril. Durante este proceso se obtuvo un porcentaje de sobrevivencia del 88.8 % de las plántulas colocadas en perlita, mostrando una coloración verde intenso, la formación de nuevas hojas, elongamiento del tallo y crecimiento de la raíz, mientras que las plántulas

colocadas en vermiculita sufrieron un proceso de contaminación y muerte a partir de la segunda semana, teniendo un porcentaje de sobrevivencia del 11.1% de plántulas en mal estado.

La función de la perlita en las plantas es mejorar la aireación, esto les permite mantener la oxigenación en la raíz y retener la humedad, ayudar a sostener las plantas debido a su alta porosidad, y también puede actuar como aislante para que las plantas no sufran calor. En este caso, es muy útil por sus características tanto químicas como físicas, ayudando a las raíces a tener una mejor respiración, lo cual es imposible en una tierra compactada, de manera que la mezcla de perlita proporciona la aireación necesaria debido a la alta porosidad del material (Según López *et al.*, 2014; Valencia *et al.*, 2019). La vermiculita, por otro lado, es un sustrato con alta porosidad, con valores similares a la perlita, también tiene mayor retención de agua que la perlita, pero su capacidad de intercambio catiónico es muy alta, además cuenta con un nivel alto de humedad, esta propiedad podría ser una obstáculo para la finalización del proceso de endurecimiento debido a que las plántulas no pueden eliminar el vapor de agua acumulado por la humedad y por falta de espacio, escaseando el intercambio gaseoso, donde se pueden manifestar alteraciones o déficit en cuanto a su estructura anatómica, morfológica y fisiológica, debido al estrés hídrico provocado por la ausencia de regulación estomática (Martínez-Roca., 2011).

Se determinó que el sustrato perlita es el de mejores características para el proceso de endurecimiento de plántulas de *B. ternifolia*, obteniendo un mejor comportamiento que el observado con el sustrato vermiculita. Las plántulas de *Bouvardia ternifolia* pudieron sobreponerse al estrés nutricional al que fueron expuestas, acompañadas de un sustrato de tipo inerte y libre de cualquier contaminante, cuya función principal es proporcionar una mejor aeración radicular gracias a su porosidad, permitiendo el desarrollo radicular con buena retención de humedad.



Figura 12. Plántulas de *B. ternifolia* colocadas en los sustratos perlita y vermiculita al 100% en proceso de aumento de intercambio gaseoso.

7.6 Acondicionamiento *ex vitro* de plántulas de *B. ternifolia* en diferentes sustratos.

Las raíces desarrolladas *in vitro* son extremadamente frágiles, al ser colocadas en sustrato mueren, por lo que la elección de un sustrato con buenas características físicas y químicas es indispensable para el éxito de esta etapa. Para el trasplante, se debe elegir un sustrato suelto y poroso que permita un desarrollo y crecimiento óptimo de las raíces. Los sustratos se pueden utilizar solos o combinados, las mezclas son diferentes y muy variadas de acuerdo a la especie que se esté manipulando (Lalam *et al.*, 2016).

La transferencia de condiciones de cultivo *in vitro* a *ex vitro* de las plántulas endurecidas de *Bouvardia ternifolia* fue un proceso gradual y hubo que adoptar una serie de precauciones destinadas principalmente a evitar la deshidratación y contaminación del material vegetal (figura 13). Las plántulas obtenidas del proceso de endurecimiento se colocaron en diferentes combinaciones de sustratos con tierra (figura 13). Al colocar plántulas en una combinación de 25% vermiculita o perlita / 75% tierra, 50% vermiculita o perlita / 50% tierra y 75% perlita / 25% tierra, no se observó un buen desarrollo del área foliar ni radicular, teniendo una coloración amarillenta y registrando un porcentaje de sobrevivencia del 0%. Este bajo porcentaje puede deberse a que las plantas tuvieron que adaptarse de una nutrición heterótrofa a una autótrofa, aunque las plantas en el ensayo habían desarrollado raíces, tuvieron también que desarrollar brotes funcionales e incrementar la resistencia a la pérdida de agua y el ataque de patógenos (Indacochea *et al.*, 2017).

Al colocar plántulas en una combinación de 75% vermiculita / 25% tierra, se observaron mejores características de crecimiento, buena coloración verde de las plantas, mostrando un crecimiento lento pero constante y desarrollando área foliar, obteniendo un porcentaje de sobrevivencia del 50%, observando una buena adaptación fisiológica a los cambios de un medio ambiente en condiciones *ex vitro*, esto se debe a que estos sustratos tienen características y funciones diferentes como retención de agua, aeración radicular y uno de las más importantes es la capacidad de intercambio catiónico (CIC), este nos indica el potencial del sustrato para retener e intercambiar nutrientes con el suelo, por lo que al poner a vermiculita que tiene un alto índice de CIC y perlita un bajo índice de CIC en combinación igual observamos que vermiculita como sustrato óptimo para el desarrollo y aclimatación en plantas de *Bouvardia ternoflia*, sin embargo, debido a la contingencia provocada por el virus COVID-19, las plántulas fueron

perdidas antes de lograr colocarlas en un porcentaje del 100 % de tierra. La vermiculita ha sido el sustrato más exitoso gracias a su retención de agua y almacén de nutrientes, siendo adecuada para el crecimiento de las plantas en un porcentaje alto en combinación con tierra (López-Ruiz, 2014). Cada especie vegetal necesita nutrientes específicos, en el caso de *Bouvardia ternifolia*, el sustrato de vermiculita permitió un mejor desarrollo gracias a que la combinación de 25% tierra y 75% vermiculita, aporta los nutrientes necesarios para satisfacer las necesidades de la especie sin tener apelmazamiento gracias a su porosidad y así, ayudando a una correcta aeración de las raíces, evitando la deshidratación por retención elevada de agua y nutrientes e impidiendo la colonización de patógenos en la planta, lo que favorece la aclimatación de *B. ternifolia*.

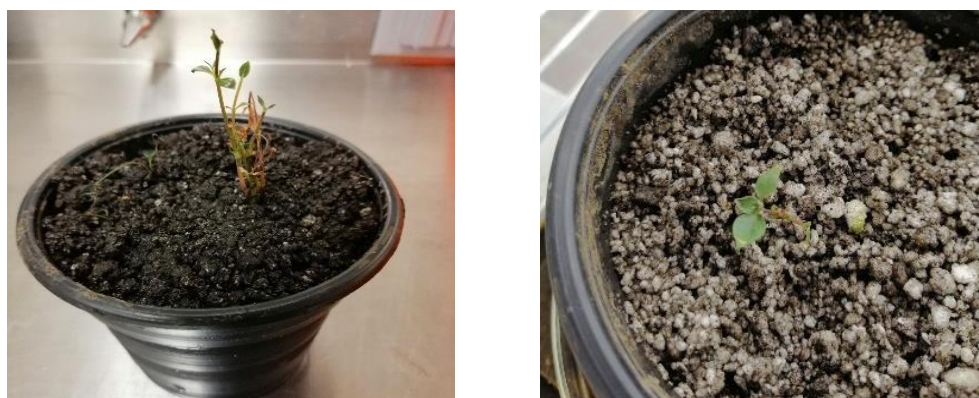


Figura 13. Plántulas de *Bouvardia ternifolia* transplantadas en sustrato perlita tratamiento en condiciones *ex vitro* de 1 mes de

Los resultados mostraron la factibilidad de establecer un protocolo de aclimatación para esta especie, desarrollándolo de forma paulatina se podría aumentar el porcentaje de sobrevivencia para la obtención de un mayor número de plantas aclimatadas como se observó en el proyecto realizado por G. García (2009), donde trabajó con *Bouvardia ternifolia* utilizando un sistema de cultivo por hidroponía, los tratamientos se colocaron en solución nutritiva de Hoagland al 25, 50, 75, 100 y 125% en un periodo de 10 semanas, se encontró plantas mejor desarrolladas en raíz y brotes el tratamiento con la solución nutritiva al 25% y con el tratamiento al 100% desarrollaron entrenodos más largos y por lo tanto un mayor número de nodos estos resultados corresponden a la octava semana de cultivo hidropónico.

7. Conclusiones.

Con la realización del presente proyecto y el planteamiento de los objetivos particulares para su desarrollo se puede concluir que:

- Se determinó al tratamiento número 2 (ANA 1mg/L/BAP 0.01mg/L) como el de mejores características para el establecimiento de un cultivo de callo de tipo organogénico de *B. ternifolia*, con un porcentaje de respuesta del 29.16%.
- En el proceso de inducción a organogénesis indirecta de *B. ternifolia*, los reguladores de crecimiento AIA y BAP a una concentración de 0.1mg/L provocaron una respuesta positiva a la formación de plántulas.
- Se determinó al tratamiento número 10 (AIA a 0.5mg/L) como el de mejores características en el proceso de inducción a enraizamiento de plántulas de *B. ternifolia* con un porcentaje de respuesta del 80 %.
- La disminución gradual de la fuente de carbono y el aumento en el intercambio gaseoso en frascos con sustrato perlita al 100 % mostró características deseables para llevar a cabo el proceso de endurecimiento de plántulas de *B. ternifolia*, con un porcentaje de sobrevivencia del 88.8 %.
- La combinación de 75% perlita / 25% tierra presentó las mejores características de crecimiento y sobrevivencia (50%) en el acondicionamiento *ex vitro* de plántulas de *B. ternifolia*.

Perspectivas.

- Realizar el establecimiento de un cultivo de plantas aclimatadas de *B. ternifolia* utilizando el protocolo descrito en este proyecto para la obtención de material vegetal, el cual pueda ser utilizado en futuras investigaciones.
- Desarrollar estrategias para el mejoramiento de los procesos de enraizamiento, endurecimiento y aclimatización de plántulas de *B. ternifolia* para optimizar los tiempos y porcentajes de respuesta.
- Evaluar la producción de metabolitos secundarios en plantas de *B. ternifolia* acondicionadas *ex vitro*.
- Realizar la evaluación de actividades farmacológicas reportadas para la especie de extractos de diferente polaridad producidos a partir de plantas acondicionadas *ex vitro* de *B. ternifolia*.

Protocolo de micropropagación de *B. ternifolia*.

1. Proceso de desinfección: implementar etanol al 70% e hipoclorito de sodio, para posteriormente implementar un cultivo de medio basal MS complementado con 1 g/L de carbón activado y 3 g/L de Phytigel® (Sigma).
2. Proceso de inducción a callogénesis: realizar medio basal MS complementado con los RCV ANA 1mg/L/ y BAP 0.01mg/L.
3. Proceso de inducción a organogénesis indirecta: realizar medio basal MS complementado los RCV AIA 0.1mg/L y BAP 0.1/L.
4. Proceso de inducción a enraizamiento: realizar medio basal MS complementado AIA 0.5mg/L.
5. Proceso de endurecimiento: realizar una disminución gradual de la fuente de carbono y el aumento en el intercambio gaseoso en frascos con sustrato perlita al 100 % (25 gr).
6. Proceso de aclimatación: utilizar la combinación de 75% perlita / 25% en el acondicionamiento *ex vitro*.

9. REFERENCIAS.

1. Aguilar, D y Rodríguez, L. (2018). Micropropagación y aclimatación de Maguey Pitzometl (*Agave marmorata Roetzl*) en la Mixteca Poblana. Rev. Colomb. Biotecnol, (20), 124 - 131.
2. Alcántara, C., J., Acero G., J., Alcántara J., & Sánchez R. (2019). Principales reguladores hormonales y sus interacciones en el crecimiento vegetal. NOVA, 17(32), 109-129.
3. Alfonso Lara y Roberto Valverde. (2003). Micropropagación de la planta medicinal *Psychotria acuminata*. Agronomía Costarricense, 27(35), 7-20.
4. Arias, M., Aguirre, A. y Angarita M. (2008). Aspectos ingenieriles del cultivo *in vitro* de células vegetales para la producción de metabolitos secundarios. Dyna, 157, 109 - 121.
5. Ávalos, A. y Pérez E. (2009). Metabolismo secundario de plantas. Serie Fisiología Vegetal, 2(3), 119-145.
6. Ávila, I y Salgado R. (2006). Propagación y mantenimiento *in vitro* de orquídeas mexicanas, para colaborar en su conservación. BIOLÓGICAS, No. 8, 138-149.
7. Azcón, J. and Talón, M. (2008) Fundamentos de Fisiología Vegetal -Editorial: Mc Graw-Hill Interamericana de España, S.A.U. - 2º Edición. pp 651-153
8. Baixauli, C. y Aguilar, J. (2020). Cultivo sin suelo de Hortalizas. Valencia: Generalitat valenciana. (pp 15-20).
9. Beraud, M. M. R., Vidal, M. I. L., Fuentes, M. A. C., & Brevis, P. K. A. (e). Inducción *in vitro* de callogénesis y organogénesis indirecta a partir de explantes de cotiledón, hipocotíleo y hoja en *ugni molinae*. Bosque, 35(1), 21-22.
10. Bullaín, M., Torres, E., Hermosilla. R. (2014). Phytochemical screening of e extrac from *F aramea occidentalis*. Revista Cubana de Plantas Medicinales, 19, 2-11.
11. Calva, G. y Pérez, J. (2005). Cultivo de células y tejidos vegetales: fuente de alimentos para el futuro. Digital Universitaria, 6, 6-9.
12. Campos, N., Panis, B. and Carpentier, S. (2017). Somatic embryogenesis in coffee: The evolution of biotechnology and the integration of omics technologies offer great opportunities. Frontiers in Plant Science 8: 1460.
13. Castillo, A. (2004). Propagación de plantas por cultivo *in vitro*: una biotecnología que nos acompaña hace mucho tiempo. Reduca, 4(10), 114-118.
14. Chitnis, M., Menon, R., Basrur, V., Adwankar, M. and Satyamoorthy, K. (1985). Reversal of Natural Resistance to Bouvardin (NSC 259968) in Sarcoma 180 Cells *in vitro* and *in vivo* by Verapamil. J Cancer Res Clin Oncol, 110, 221-224.
15. Cortina, J., Peñuelas, J. Puértolas, R., Savé, R. y Vilagrosa, A. (2006). Calidad de planta forestal para la restauración en ambientes mediterráneos. Madrid: Organismo autónomo parques nacionales ministerio de medio ambiente. (pp.119-140)
16. Curtis, H., Sue, N. (2013). Crecimiento y desarrollo de plantas. En Curtis Biología (891-892). Buenos Aires: Panamericana.

17. Díaz, L. P., Namur, J. J., Bollati, S. A., & Arce, O. E. (2010). Acclimatization of *Phalaenopsis* and *Cattleya* obtained by micropropagation. *Revista Colombiana de Biotecnología*, XII (2), 27-40.
18. Domenech, G. y Carmina A. (2011). Morfogénesis. La ruta organogénica versus la ruta embriogénica. *ETSIAMN*, 39, 1-5.
19. Domínguez, M., González, Ma. (2008). El cultivo *in vitro* como herramienta para el aprovechamiento, mejoramiento y conservación de especies del género *Agave*. *investigación y ciencia*, 41, 53-62.
20. E. Murillo and E. Sanchez. (1984). Alternative Pathways for Ammonium Assimilation in *Bouvardia ternifolia* Cell Suspension Cultures. *J Plant Physiol.*, 117, 57-68.
21. Eloísa, S. y Hernández, E. (2016). Micropropagación de variedades de caña de azúcar cultivadas en México. *Rev. Fitotec. Mex*, 39, 225 - 231.
22. Escamilla, B., Moreno, P. (2015). De la matamba y El piñonal del municipio de Jamapa, Veracruz. En *Plantas medicinales* (2, 108) Xalapa, Veracruz, México: Printed in México.
23. Fernandez L. & Sánchez, E. (1982). *In vitro* culture of *Bouvardia ternifolia*. *National Research Council of Canada*, 60, p.917.
24. Ferrer, I. Reynosa, Y. Pérez, J. (2004). The secretagogue effect of the poison from *Centruroides limpidus limpidus* on the pancreas of mice and the antagonistic action of the *Bouvardia ternifolia* extract. *Elsevier GmbH*, 12, 66.
25. Fowler, M y Stafford, A. (1992) Plant cell culture, process systems and product synthesis. In: *Plant Biotechnology: Comprehensive Biotechnology. Second Supplement*, (M Fowler, G Warren & M Moo-Young, eds.) pp.: 79-98. Pergamon Press. England
26. Gamboa, A., Hernández, R., Guerrero, R., Sánchez, A. y Lira, R. (2003). Inhibición del crecimiento micelial de *Rhizoctonia solani* Kühn y *Phytophthora infestans* Mont. (De Bary) con extractos vegetales metanólicos de hojaseñ (*Flourensia cernua* DC.), mejorana (*Origanum majorana* L.) y trompetilla [*Bouvardia ternifolia* (Ca.) Schlecht.]. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 21:13-18.
27. García, F., Roselló, C. and Santamarina, S. (2006). Introducción al funcionamiento de las plantas- Editorial: Universidad Politécnica de Valencia, España. 1ra Edición. pp 182-185.
28. García, G., Huerta, M., González, M., Zamilpa, A., Jiménez, E., Silva, R., Román, R., Aguilar, A. (2015). Anti-inflammatory, antioxidant and anti-acetylcholinesterase activities of *Bouvardia ternifolia*: potential implications in Alzheimer's disease. *The Pharmaceutical Society of Korea*, 38, 1369–1372.
29. Gayosso S., Borges L., Villanueva, E., Maximiano Estrada, A. (2018). Physical and chemical characterization of organic materials for agricultural substrates. *agrociencia*, 6, 639-651.
30. George, E.F.; Hall, M.A; Klerk, G.J. 2008 Micropropagation: Uses and methods. In: *Plant propagation by tissue culture*, 3rd edition. George, E.F.; Hall, M.A. and De Klerk, G.E. (eds.) Springer, The Netherlands: 29-64.
31. Gonçalves y Romano, A. (2018). Production of Plant Secondary Metabolites by Using Biotechnological Tools. En *Faculty of Sciences and Technology* (82-85). Portugal: IntechOpen.

32. Guerrier, G., Berni, R. and J. Muñoz, A. (2018). Production of Plant Secondary Metabolites: Examples, Tips and Suggestions for Biotechnologists. *Genes*, 9, 3-5.
33. Hernández L., M. Olivera. (2017). Obtención de dehidroisoeugenol por dimerización de isoeugenol con cultivos celulares de *Bouvardia ternifolia* (Trompetilla). *Rev.Esp.Cienc.Quím.Biol.*, 20, 17-19.
34. Herrera, M., García, G., A. Zamilpa, M. González, J. Tortoriello, E. Ventura, E. Jiménez. (2012). Inhibición of acetylcholinesterase activity by hidroalcoholic extract and their fractions of *Bouvardia ternifolia* (Cav.) Shcltdl (Rubiaceae). *Bol Latinoam Caribe Plant Med Aromat* 11(6): 526 – 541.
35. Hidalgo, P., Sindoni, M. y Méndez, J. (2009). Importance of the right selection and handling of substrates for the fruit nursery industry. *UDO Agrícola*, 9, 282-288.
36. Inamine, J. anda Moretti, L. (2004). Micropropagation and callogenesis of curcuma zedoaria roscoe. *Sci. Agric.*, 61, 427-432.
37. Indacochea, B., Parrales, J., Castro, C., Vera, M., Gabriel, J. (2017). *In vitro* acclimatization of native forest species from Manabí southern in danger of extinction. *Selva Andina Research Society*, 8, 124-134.
38. Jhong, Sánchez, Pintado, R. Cabrera, & D, J. Jiménez. (2019). Inducción de embriogénesis somática a partir de explantes foliares en tres variedades de café. *Scientia Agropecuaria*, 10(2), 259-264.
39. Jiménez, J., Perez-Teran, Y., Román, R. y Tortoriello, J. (2004). Antitoxin activity of plants used in Mexican traditional medicine against scorpion poisoning. *Phytomedicine*, 12, 116–122.
40. Jiménez, M., Hernández, N., Suárez, P., Romero, C., Castillo, L., Alcaraz y Abarca, C. (2006). El polimorfismo floral en dos especies diastólicas, *Bouvardia ternifolia* (rubiaceae) y *turnera diffusa* (turneraceae): un ejemplo de la dinámica evolutiva de los sistemas reproductivos en las angiospermas. *polimorfismo floral*, 5, 200-202.
41. Jiménez, N. R. L., Serrano, J. A., Guamán, V. H. E., Patiño, J. M., Zaruma, D. G., Arévalo, M. Y., & Ortega, C. V. (2018). Propagación *in vitro* de *cinchona officinalis* l a partir de semillas. *Revista de investigaciones altoandinas*.
42. Jolad, D., Hoffmann, J., Torrance J. and George R. Krieklb. (1977). Bouvardin and Deoxybouvardin, Antitumor Cyclic Hexapeptides from *Bouvardia ternifolia* (Rubiaceae). *Journal of the American Chemical Society*, 99, 8040.
43. Jordán, M. y Casaretto, J. (2006). Hormonas y Reguladores del Crecimiento: Auxinas, Giberelinas y Citocininas. *Fisiología Vegetal*, 15, 2-16.
44. Komalavalli, N., and Rao, M. (2000) Micropropagación *in vitro* de *Gymnema sylvestre* Una planta medicinal multipropósito. *Cultivo de células vegetales, tejidos y órganos* 61, 97.
45. Laguna-Ibarra, Y., Cueva-López, J., Tamariz-Angeles, C., & Olivera-Gonzales, P. (2019). Efecto de los reguladores de crecimiento vegetal en la multiplicación y enraizamiento *in vitro* de *senecio calvus* (asteraceae), planta medicinal altoandina, endémica del Perú. *Revista de investigaciones altoandinas*, 21(2), 111-121.

46. Leandro Cossío. (2013). Reguladores de crecimiento. 23 de enero del 2021, de FaCENA Sitio web: <http://exa.unne.edu.ar/biologia/fisiologia.vegetal/Guiadeestudio reguladoresdecrecimiento.pdf>.
47. Levitus, G., Echenique, V., Rubinstein, C. (2010). Morfogénesis *in vitro*. En Biotecnología y Mejoramiento Vegetal II (27-33). Argentina: INTA.
48. Lopera, Yury Maritza Zapata, Gabriela Trejo-Tapia, Manasés González-Cortazar, Maribel Herrera-Ruiz, Alejandro Zamilpa y Enrique Jiménez-Ferrer. 2023. "Hexapéptido cíclico de *Bouvardia ternifolia* (Cav.) Schltld. Y efectos neuroprotectores de extractos de raíces" Plantas 12, no. 14: 2600.
49. López, G., J. Ruíz y A. Masaguer. (2014). Evolución de sustratos orgánicos sostenibles en jardinería vertical. En Actas de Horticultura (67), 73-79 valencia, España: SECH.
50. Luque, M. (2016). Consumo de plantas medicinales en oficina de farmacia. *Phytochemistry*, 30, 30-36.
51. María Eugenia Segretín. (2015). Los cultivos celulares y sus aplicaciones II (cultivos de células vegetales). 2016, de INGEBI-CONICET Sitio web: http://www.argenbio.org/images/La_biotecnologia/Cap_2/Cultivos celulares II.pdf
52. Martin, D. (2017). Somatic embryogenesis: a biotechnological tool for *in vitro* propagation of guajava. *Biotecnología Vegetal*, 17, 209-220.
53. Martínez, P. y Roca, D. (2011). Sustratos para el cultivo sin suelo. Materiales, propiedades y manejo. En: Flórez R., V.J. (Ed.). Sustratos, manejo del clima, automatización y control en sistemas de cultivo sin suelo. Bogotá: Editorial Universidad Nacional de Colombia. pp. 37-77.
54. Mauricio, A., Sierra, R., Barros, A. y Gómez P. (2018). Productos naturales: metabolitos secundarios y aceites esenciales. 2018, de Fundación Universitaria Agraria de Colombia Sitio web: https://www.researchgate.net/publication/329197168_PRODUCTOS_NATURALES_METABOLITOS_SECUNDARIOS_Y_ACEITES_ESENCIALES.
55. Mendoza., I., Peña, M. and Aarland, C. (2016). Pharmacology and phytochemical potential study of plants collected in Amecameca, State of Mexico, Mexico. *Journal of Traditional Knowledge*, 15, 62-63.
56. Mitra, S., Lami, M. S., Uddin, T. M., Das, R., Islam, F., Anjum, J., Hossain, M. J., & Emran, T. B. (2022). Prospective multifunctional roles and pharmacological potential of dietary flavonoid narirutin. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 150, 112932.
57. Murillo, E. and Sanchez, E. (1985). Glutamate synthase in greening callus of *Bouvardia ternifolia* Schlecht. Springer-Verlag, 163, 448-452.
58. Newell-Mc Gloughlin, M., Burke, J. (2000). *Biotechnology: present position and future potential*, Ed. Teagasc, pp 126-128.
59. Ojito, K. y Portal, O. (2017). Metabolitos secundarios de las plantas, una alternativa para el manejo de enfermedades en cultivos de interés económico. Cuba: Academia Real Española. (pp 2-10)
60. Organización Mundial de la Salud. (2000). Situación reglamentaria de los medicamentos herbarios. OMS, 1, pp 1-5.

61. Organización Mundial de la Salud. (2014). Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional. OMS, 1, pp 11-28.
62. Osuna, H., Osuna, A. Y Fierro, A. (2016). Propagación vegetativa o asexual. En Manual de propagación de plantas superiores (1, 41-60) Unidad Xochimilco: UAM.
63. Osuna, L., Tapia, M., Figueroa, O. (2006). Micropropagación de *Lepidium virginicum* (Brassicaceae), una planta con actividad antiprotozoaria. *In Vitro Cell.Dev.Biol.-Plant* 42, 596–600
64. Pérez, M., Delgado, R. & Hernández, C. (2008). Organogénesis indirecta a partir de meristemas apicales caulinares de la variedad cubana de arroz Reforma. *Cultivos Tropicales*, 29(1), 23-28
65. Pérez. G., Pérez, C., Pérez, G. and Zavala, M. (1998). Effect of Triterpenoids of *Bouvardia terniflora* on blood sugar levels of normal and alloxan diabetic mice. *Phytomedicine*, 5, 475-478.
66. Randel, M., Chong, Borys. and Pérez, N. (2015). *In vitro* organogénesis in *Digitalis* genus. *Biotechnología Vegetal*, 15, 195-206.
67. Robert A. Tobey, D., Orlicky, J., Larry L. Deaven, B. and Richard J. (1978). Effects of Bouvardin (NSC 259968), a Cyclic Hexapeptide from *Bouvardia ternifolia*, on the ProgressionCapacity of Cultured Chinese Hamster Cells. *American Association for Cancer Research*, 38, 4415-4421.
68. Rodríguez, M., Latsague, M., Chacón, M. (2014). *In vitro* induction of callogenesis and indirect organogenesis from explants of cotyledon, hypocotyl and leaf in *Ugni molinae*. *BOSQUE*, 35, 111-118.
69. Ruiz, M., Betancourt, C., Pérez I. (2016). Propagación *in vitro* de cultivares de *Moringa oleifera* Lam. *Cultivos Tropicales*, 37(Supl. 1), 49-56. Recuperado en 20 de junio de 2020.
70. Sanchez, E. and Fernandez, L. (1983)). Biochemical parameters to assess cell differentiation of *Bouvardia ternifolia* Schlecht callus. *Planta*, 158, 377-383.
71. Sánchez, J. and Cabrera, R. (2019). Induction of somatic embryogenesis from foliar explants in three varieties of coffee. *Scientia Agropecuaria*, 10, 2-8.
72. Sánchez, L., Saavedra, A. & Romero, H. (2012). Aclimatación y endurecimiento de materiales de palma de aceite obtenidos mediante técnicas de cultivo de tejidos vegetales. *Revista Palmas*, 33, 41-52.
73. Sariol, M. and Aponte, R. (2019). Phytochemical analysis and *in vitro* insecticide activity of the watery extract of *Agdestis clematidea* in the handling of *Myzus persicae*. *educacional de la provincia Granma*, 15, 29-38.
74. Silva, R., Villegas, M. (2009). Niveles de sacarosa en el enraizamiento *in vitro* y aclimatación *ex vitro* de plántulas del portainjerto de vid r110 (*Vitis rupestris* × *Vitis berlandieri*). *Interciencia*, 34(12), 897-902
75. Silvia, J., Lalam, M., Echeverría, J., Salazar, S. (2016). Biotic and abiotic factors influencing acclimatization in the greenhouse. *Dom. Ciencias*, 2, 63-89.
76. Stewart, C.. (2009). *Plant Biotechnology and Genetics: Principles, Techniques, and Applications*. *The Quarterly Review of Biology*. (pp 113–134).

77. Taiz, L. and Zeiger, E. (2010) (Sinauer Associates). Secondary Metabolites and Plant Defense. En Plant physiology(284-300). United states: Sinauer Associates.
78. Téllez, D. y Casanova, L. (2014). El cultivo de tejidos vegetales: herramienta para la conservación de orquídeas amenazadas. CONABIO. Biodiversitas, 117:13-16.
79. Téllez, J., López, M., Hernández, E., Estrada, A., Zavaleta, H. & Livera, M. (2017). Morfogénesis *in vitro* de Mammillaria plumosa Weber. Revista mexicana de ciencias agrícolas, 8(4), 863-876.
80. Ticona, J. & Triguero, M. (2019). Evaluación de tres métodos de desinfección para el establecimiento *in vitro* de papaya (Carica papaya L.) En la estación experimental Sapecho. Revista de Investigación e Innovación Agropecuaria y de Recursos Naturales, 6(1), 24-29.
81. Valencia, M., Escobedo, D., López, L. y Espino Enrique González Pérez. (2019). Aclimatación ex vitro de plántulas de Fragaria x ananassa Duch.. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas, 10, 91-100.
82. Viñas, M. and V. Jiménez, M. (2011). Factors affecting *in vitro* somatic embryogenesis of palms (Arecaceae). Colomb. Biotecnol, 13, 229-242.
83. W. Rademacher. (2015). Plant Growth Regulators: Backgrounds and Uses in Plant Production. J Plant Growth Regul, 34, 845–872.
84. Zapata Lopera, Yury Maritza, Enrique Jiménez Ferrer, Maribel Herrera Ruiz, Alejandro Zamilpa, Manasés González Cortazar, Gabriela Rosas Salgado, Mayra Alejandra Santillán Urquiza, Gabriela Trejo Tapia y Antonio Ruperto Jiménez Aparicio. 2022. “Nuevas Cromonas de Bouvardia ternifolia (Cav.) Schltdl con Actividad Antiinflamatoria e Inmunomoduladora” Plantas 12, no. 1: 1.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



FACULTAD
DE CIENCIAS
BIOLÓGICAS

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
Secretaría de Extensión

Licenciatura en Biología, Programa Educativo de Calidad.

Cuernavaca, Mor., 21 de febrero del 2024

DRA. DULCE MARÍA ARIAS ATAIDE
DIRECTORA GENERAL DE SERVICIOS ESCOLARES

P R E S E N T E.

Por este conducto, los catedráticos suscritos comunicamos a Usted, que hemos revisado el documento que presenta la Pasante de Biólogo: **C. ARELLANO FERRER JESÚS**, con el título del trabajo: **MICROPROPAGACIÓN Y PROCESO DE ACLIMATACIÓN DE PLANTAS DE *Bouvardia ternifolia***. En calidad de miembros de la comisión revisora, consideramos que el trabajo reúne los requisitos para optar por la Modalidad de Titulación por Tesis Profesional por Etapas como lo marca el artículo 26° del Reglamento de Titulación Profesional vigente de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos.

Atentamente
Por una humanidad culta

JURADO REVISOR

PRESIDENTE: M. EN C. LAURA PATRICIA LINA GARCÍA

SECRETARIO: DR. JOSÉ DE JESÚS ARELLANO GARCÍA

VOCAL: DR. JORGE HUMBERTO MUNDO ARIZA

SUPLENTE: DRA. SUSANA VALENCIA DÍAZ

SUPLENTE: DR. ALFONSO LEIJA SALAS

FIRMA





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

JORGE HUMBERTO MUNDO ARIZA | Fecha:2024-02-21 12:39:12 | Firmante

kfwL89CoYARRCQv2+7IAYdm4ynVgntmCNaiBThBP3ycqvZNBwvfufVKd2KxZNG9uiMqK3jbQMSGQ0KmYXcix26as9W785Sjy6ZDW31hw6N0mojPPvo6yAfUDyUn+AnXBFVXzDk4LaYYNNCOKq9sXo+Y/u9PVlxz543EYa3L6b3O5TBhUlb6bfAsZfrUmf814EyYpxqLLUelRsnJOVHzseJ+S7YeAaLt+UVZJGoyksrlxQeDiecZOE3ADLpbyzaLlubRbRR1t2BJ8yY6egOVjNvXiA5uCDilylebPvlnrIOA5L5vEuAetPiObhDiTD0SnmNZSBBuNyqEHjJUFUibag==

ALFONSO LEIJA SALAS | Fecha:2024-02-21 12:39:16 | Firmante

1ffpG3mbRPVAop7/TTW9tvHrz91dkJm2N9eOR4Q83FKDLULWOCTa/cUh4rZM/5W9sTOPy3HIqHoawi8+NrmClzcrq7I8jDz4oGqPX9S7PWHI7TmLCzYQuG+nBIL91cUQ8rFpjoD286F9EzEKLCP7TuFiwifoQK/n1QpG7f+a4+gfAI0b3SgRvphHa7HMzEFY49gz+dl0kIAPOhukz0S27EZWNDI4W1MbQz2DWImcvcKPM85QLm5aNaXQiaFf82ZdkJyIfA6+ID/WroKRgllhSt7X86F5E4VWmy0Xjb9DqNlzFnuj3hUkJUzxtPgozNXSR0D77Jyh1GSR5KJGXUgg==

JOSE DE JESUS ARELLANO GARCIA | Fecha:2024-02-21 13:39:19 | Firmante

llg/3FyycTM/GxfyPICiG0rcd7erptmePXkweLvcC3F9BXUtMuBCY6e8cYoXRz8/lbFtPEVBOe8K8Lk0w0sNUr8p/x3l0kWWQ6RM01MsEpBwJU344CBqIUlflkJzpdqPwR6MBdZgt7v3MuKTfoOxZVlg5yYOBMskKT5TegKs5n7+wqq4SFJ0aTOSKpluvQQCvUglnW7h9gOT11Bgnwv05JNnd9lg6rmVR14AfHQOFSGTocx0N6jqx6AQOdT7/mTpRglvUR0qpwyF0iA8gWk30cgKeBII04zkJ283w2BWMV057a9rpg2do3nn2a6mMozUxwToRpc3QSON0ooWb2JHv9A==

SUSANA VALENCIA DIAZ | Fecha:2024-02-21 14:28:04 | Firmante

nDJT4Ejotp8dKXXAUtm7sy33TzYzr31FNObkqa2U6bRNJSXILRkmqCHSWEulVrzaNv0w1SpNjAH0YmU3Ftj+JdVSOHGeZLKU2vyYDuPpiywqrvuoupw6b7hDcjMIJRfBpMmLsCrUhyZOLaAT2bVvo9Q6Z04iSbpF1QF01qowlcNkOJsvjZ2ZtTqmutOw3Owg8OiEsaWPpFvtkMsNmEKH49BqV146n7jgYkNum3VhXjTLihVrnnYjr49/MvgTzlaekNEriEJX0Vsf48nvx0sN0+PMff0i7uMSNHcafnoT+9LPW3fMGIHdJ3GWhOQETCufu8E3h1WkzHn5StUdTVg==

LAURA PATRICIA LINA GARCIA | Fecha:2024-02-26 12:48:01 | Firmante

F6gKDCyAjoihNMOHIQexK10h0n0WIHjqpDVjrYaBN1fGoNulGSPof7P2L7IMJE/go2NTUAVB2p6VTpMSntJxZ13Cz3VDQG6JgcqjDPN/RKwzodwBd0Eya4wAOQmvZbtTDr/TN3h0y2Rg5fDDtkF2sEuMNSMUTIJDtp+j9XA9RjrmXqwhAla67ByDEulR0IWjezUqSrOFF2NoHpaCCY8K8ST7inxT4nM22GH73DoWoJ6UJCWI7+zELKxf7iYXki+ieXbG2H7iCACUR+txLH6289/JxG8jp9gi9jUOw362BXYcNH66FhOAaeX67c8f7hOIRubtOPIcWYOGsUh79A==

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



pcb904oJ7

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/b3KjuSdXmaB4dvAqk1X4KenkOwznJJE>



UAEM
RECTORÍA
2023-2029