



**UNIVERSIDAD JUÁREZ AUTÓNOMA DE TABASCO**  
**DIVISIÓN ACADÉMICA DE CIENCIAS AGROPECUARIAS**

---

---

**Auxinas y citocininas en la respuesta morfogénica *in vitro***  
**de saramuyo (*Annona squamosa*)**

**T E S I S**

**Que para obtener el grado de:**

**MAESTRO EN CIENCIAS AGROALIMENTARIAS**

**PRESENTA**

**I.B.T. José Ignacio Valenzuela Castillo**

**Villahermosa, Centro, Tabasco, a 18 de septiembre de 2023**



**UNIVERSIDAD JUÁREZ AUTÓNOMA DE TABASCO**  
**DIVISIÓN ACADÉMICA DE CIENCIAS AGROPECUARIAS**



**Auxinas y citocininas en la respuesta morfogénica *in vitro*  
de saramuyo (*Annona squamosa*)**

**T E S I S**

**Que para obtener el grado de:**

**MAESTRO EN CIENCIAS AGROALIMENTARIAS**

**PRESENTA**

**I.B.T. José Ignacio Valenzuela Castillo**

**Directores**

**Dr. César Márquez Quiroz**

**Dr. José Javier Hujara Vasconcelos**

**Villahermosa, Centro, Tabasco, a 18 de septiembre de 2023**



UNIVERSIDAD JUÁREZ  
AUTÓNOMA DE TABASCO

"ESTUDIO EN LA DUDA. ACCIÓN EN LA FE"



Jefatura de  
Posgrado



Villahermosa, Tabasco a 11 de octubre de 2023

Of. No. 465 /JP/2023

Asunto: Autorización de impresión de Tesis

MATRÍCULA 212C26001

MTRA. MARIBEL VALENCIA THOMPSON  
JEFE DEL DEPTO. DE CERTIFICACIÓN  
Y TITULACIÓN DE LA U. J. A. T.  
P R E S E N T E

En conformidad con lo establecido en el Artículo 77 fracción III del Reglamento de Titulación de la U. J. A. T., me permito comunicar a Usted que la **Dr. César Márquez Quiroz (Director)** y el **Dr. José Javier Hujara Vasconcelos (Codirector)**, dirigieron y supervisaron el Trabajo Recepcional de Tesis denominada "**Auxinas y citocininas en la respuesta morfogénica *in vitro* de saramuyo (*Annona squamosa*)**", elaborado por el **C. José Ignacio Valenzuela Castillo** egresado de la **Maestría en Ciencias Agroalimentarias**. El jurado para el examen profesional conformado por el **Dr. Efraín de la Cruz Lázaro, Dr. Eduardo Campos Rojas, Dr. César Márquez Quiroz, Dra. Angélica Alejandra Ochoa Flores y el Dr. Armando Gómez Vázquez**, revisaron y señalaron las modificaciones pertinentes al trabajo recepcional y que al interesado ha llevado a efecto. Por lo tanto, el trabajo recepcional Tesis de Investigación puede **imprimirse**.

Sin otro particular, aprovecho la ocasión para enviarle un afectuoso saludo.

ATENTAMENTE

M. V. Z. JORGE ALFREDO THOMAS TÉLLEZ  
DIRECTOR

U.J.A.T.



DIVISIÓN ACADÉMICA DE  
CIENCIAS AGROPECUARIAS  
DIRECCIÓN

c.c.p. M. C. Irma Gallegos Morales – Coordinadora de Investigación y Posgrado de la DACA  
Dra. Magally Guadalupe Sánchez Domínguez – Jefa de Posgrado de la DACA  
Dr. Aldenamar Cruz Hernández – Coordinador del Programa Maestría en Ciencias Agroalimentarias  
Dr. César Márquez Quiroz – Director de Tesis.  
Interesado.  
MGSD/aemh

Km 25, Carretera Villahermosa-Teapa  
Ra. La Huasteca, 2ª sección, 86298, Centro, Tabasco, México  
Teléfono 993 358 1500 EXT 6607  
Correo electrónico: posgrado.daca@ujat.mx

www.ujat.mx

### CARTA DE CESIÓN DE DERECHOS

El que suscribe, autoriza por medio del presente escrito a la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco para que utilice tanto física como digitalmente la tesis de grado denominada "**Auxinas y citocininas en la respuesta morfogénica *in vitro* de saramuyo (*Annona squamosa*)**", de la cual soy autor y titular de los derechos de autor. La finalidad del uso por parte de la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco de la tesis antes mencionada, será única y exclusivamente para difusión, educación y sin fines de lucro; autorización que se hace de manera enunciativa mas no limitada para subirla a la red abierta de bibliotecas digitales (RABID) y a cualquier otra red académica con las que la universidad tenga relación institucional.

Por lo antes mencionado, libero a la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco de cualquier reclamación legal que pudiera ejercer respecto al uso y manipulación de la tesis mencionada y para los fines estipulados en este documento.

Se firma la presente autorización en la ciudad de Villahermosa, Tabasco, a los 18 días del mes de octubre del año 2023.

Autoriza

  
José Ignacio Valenzuela Castillo  
Nombre y firma

## **DEDICATORIAS**

Quiero dedicar este proyecto a las plantas, por su maravillosa capacidad de adaptarse y sobrevivir.

A la biotecnología, por abrirnos las puertas de la aplicación científica en nuestra realidad, naciendo desde una idea hasta hacerla realidad.

A Banoor, porque la transferencia de tecnología permite a todo científico mejorar nuestro mundo.

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.  
México.

## AGRADECIMIENTOS

A Dios, cuya creación nos permite ver lo increíble que tenemos en nuestra vida diaria.

A mi familia, porque creen en mí y me dan ánimos para alcanzar mis metas.

A mis amigos, por acompañarme en esta aventura.

Al Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY), el laboratorio de clonal, de marcadores moleculares y el Jardín Botánico. Al equipo de trabajo del Dr. Felipe, al Maestro Miguel, al Ing. Gabriel, por asesorarme, guiarme y vigilar el proyecto.

Al maestro Daniel Cituk del Instituto Tecnológico de Conkal, por apoyar con su trayectoria y conocimiento en Anonáceas.

Al Dr. Eduardo Campos, por incentivar este proyecto desde la Red Mexicana de Anonáceas por en la clave 2015-4-266891/SADER/CONACyT “Aprovechamiento del germoplasma, desarrollo tecnológico e innovación en cadenas de valor de anonáceas en México”.

A los Doctores Javier Huijara y César Márquez, por dirigir este proyecto, al equipo del Dr. César, la Dra. Sayi y Sam, que se hicieron amigos y familia durante el posgrado.

A mi comité revisor, por guiar la redacción de esta tesis.

A la beca CONACYT de solicitud 2021-000018-02NACF-19032 al CVU 1067852 por apoyarme en la manutención de estos dos años de proyecto.

## Índice de contenido

1. Introducción .....	1
2. Antecedentes .....	4
2.1. Saramuyo.....	4
2.1.1. Origen del saramuyo .....	4
2.1.2. Descripción botánica.....	5
2.1.3. Taxonomía del saramuyo .....	6
2.2. Cultivo de tejidos vegetales <i>in vitro</i> .....	6
2.2.1. Germoplasma y micropropagación <i>in vitro</i> .....	7
2.2.1.1. Reguladores de crecimiento vegetal.....	8
2.2.1.2. Auxinas y citocininas .....	9
2.2.1.2. Efectos <i>in vitro</i> de las auxinas y citocininas .....	11
2.2.2. Morfogénesis.....	11
2.2.2.1. Organogénesis.....	12
2.2.2.2. Embriogénesis somática.....	12
3. Planteamiento del problema y justificación del estudio.....	14
4. Objetivos e hipótesis .....	22
4.1. Objetivo general.....	22
4.2. Objetivos específicos .....	22
4.3. Hipótesis.....	22
5. Materiales y métodos .....	23
5.1. Descripción del área de estudio.....	23
5.2. Diseño experimental.....	23
5.2.1. Establecimiento <i>in vitro</i> .....	24
5.2.2. Inducción morfogénica.....	25
5.3. Flujograma del experimento .....	26
5.3.1. Elaboración del medio de cultivo ms.....	27
5.3.2. Colecta del material vegetal .....	27
5.3.3. Establecimiento de los explantes .....	29
5.3.4. Evaluación de establecimiento <i>in vitro</i> .....	29
5.3.5. Siembra de explantes en medio adicionado con rcv's .....	30
5.3.6. Modelo estadístico y análisis de resultados .....	30

6. Resultados y discusión .....	33
6.1. Establecimiento <i>in vitro</i> de los explantes de saramuyo .....	33
6.1.1. Descontaminación de explantes .....	33
6.1.2. Supervivencia de explantes .....	37
6.1.3. Selección del protocolo de establecimiento .....	39
6.2. Balance de auxinas y citocininas sobre la respuesta morfogénica <i>in vitro</i> de los explantes de saramuyo .....	45
7. Conclusiones .....	58
8. Referencias .....	59

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.  
México.



## Índice de cuadros

<b>Cuadro 1.</b> Agentes utilizados en algunos establecimientos <i>in vitro</i> de anonáceas. ..	15
<b>Cuadro 2.</b> Algunos reportes de morfogénesis exitosa en anonáceas <i>in vitro</i> .....	16
<b>Cuadro 3.</b> Contenido nutrimental de saramuyo y otros frutos tropicales (USDA, 2021). .....	21
<b>Cuadro 4.</b> Diseño del establecimiento <i>in vitro</i> de saramuyo. ....	24
<b>Cuadro 5.</b> Diseño para la respuesta morfogénica <i>in vitro</i> de saramuyo. ....	25
<b>Cuadro 6.</b> Disposición de explantes en el diseño morfogénico global. ....	26
<b>Cuadro 7.</b> Análisis de varianza del efecto del factor en la descontaminación de los explantes.....	34
<b>Cuadro 8.</b> ANAVA del efecto del factor en la supervivencia de los explantes. ....	38
<b>Cuadro 9.</b> Respuesta de los explantes a los tratamientos utilizados. ....	39
<b>Cuadro 10.</b> Efecto de los factores en el establecimiento <i>in vitro</i> de saramuyo. ....	43
<b>Cuadro 11.</b> Correlación de factores del experimento sobre los explantes <i>in vitro</i> . ..	43
<b>Cuadro 12.</b> ANAVA de la morfogénesis de explantes juveniles durante la etapa de establecimiento sin reguladores exógenos y con medio de cultivo MS al 50% de concentración. ....	46
<b>Cuadro 13.</b> Porcentaje morfogénico por tratamiento.....	49
<b>Cuadro 14.</b> ANAVA de la etapa 2; para la evaluación del efecto de los RCV y explantes en la respuesta morfogénica <i>in vitro</i> de saramuyo.....	52
<b>Cuadro 15.</b> ANAVA de la callogénesis por tipo de explante en explantes adultos..	54
<b>Cuadro 16.</b> Matriz de las mejores respuestas estadísticamente distintas por tratamiento y tipo de explante. ....	56

## Índice de figuras

<b>Figura 1.</b> Estructura química de algunas auxinas.....	9
<b>Figura 2.</b> Estructura química de algunas citocininas.....	10
<b>Figura 3.</b> Flujograma del experimento.....	27
<b>Figura 4.</b> Selección y colecta de explantes. ....	28
<b>Figura 5.</b> Protocolo de establecimiento <i>in vitro</i> de explantes de saramuyo.....	29
<b>Figura 6.</b> Crecimiento de la contaminación fúngica en los tres tipos de explante de saramuyo utilizados.....	35
<b>Figura 7.</b> Histogramas de medias totales de a) descontaminación y b) daño al explante por tratamiento.. ....	41
<b>Figura 8.</b> Histogramas de la respuesta frente a los factores por tipo explante .....	42
<b>Figura 9.</b> Morfogénesis en explantes juveniles.. ....	45
<b>Figura 10.</b> Porcentaje de morfogénesis de acuerdo con el explante en MS al 50% de concentración iónica sin RCV's en forma de: a) callos, y b) brotes. ....	47
<b>Figura 11.</b> Efecto de los factores a (concentración de NaClO) y b (tiempo de exposición) sobre la respuesta morfogénica total de los explantes juveniles de saramuyo. ....	48
<b>Figura 12.</b> Efecto de los tratamientos en el porcentaje de morfogénesis en forma de a) callos y b) brotes en cada tipo de explante. 1-16 representan el tratamiento.....	50
<b>Figura 13.</b> Efecto del tipo de explante en la calogénesis obtenida de explantes adultos. ....	52
<b>Figura 14.</b> Respuesta global de explantes adultos a los niveles de RCV's.....	53
<b>Figura 15.</b> Respuesta global de los explantes a los efectos del tratamiento.....	53
<b>Figura 16.</b> Calogénesis en explantes adultos según el tipo de explante por el efecto de los tratamientos.....	55

## RESUMEN

El saramuyo es una anonácea de interés productivo nacional e internacional que presenta dificultades en su producción y propagación por métodos tradicionales. A diferencia de otros países, nacionalmente no se cuenta con la estandarización de plantaciones o cultivares selectos de esta especie para su producción, a pesar de que el país es parte de su centro de origen. El objetivo fue establecer un protocolo base para estandarizar líneas selectas de saramuyo *in vitro* para su micropropagación en la etapa de establecimiento y morfogénesis a partir de tres tipos de explantes (nudos, entrenudos y hojas) en medio de cultivo Murashige y Skoog con modificaciones. El experimento se realizó en dos etapas, en la primera etapa se evaluó la descontaminación y el daño, mientras que en la segunda etapa se evaluó la morfogénesis obtenida. Para el establecimiento se utilizó como factores de estudio la concentración de hipoclorito de sodio y el tiempo de exposición para cada tipo de explante. En la morfogénesis se utilizaron los reguladores de crecimiento vegetal ácido 6-bencilaminopurina y ácido 1-naftalenacético en bloques determinados por los tres tipos de explantes. Bajo las condiciones en las que se desarrolló el estudio se encontró que, en la etapa de establecimiento, la descontaminación varió por tipo de explante. El 100% se reportó para nudos y hojas, en tanto que para entrenudos se obtuvo 90.48%. Por otra parte, la morfogénesis recurrente fue en forma de callo en los tres tipos de explantes, en tanto que en nudos juveniles se presentaron brotes, por lo que estos últimos se seleccionaron como el mejor protocolo de establecimiento para propiciar la clonación de plántulas. La axenificación se logró en los tres tipos de explantes, no se presentó contaminación bacteriana, sin embargo, se presentaron hongos aparentemente endófitos dentro de las pruebas, por lo que la hipótesis del presente estudio fue rechazada. La respuesta morfogénica se atribuyó a los reguladores de crecimiento endógenos de los explantes juveniles, de los cuales, los nudos presentaron la única respuesta de organogénesis directa mientras los tres tipos de explantes generaron callogénesis.

**Palabras clave:** *Annona squamosa*, descontaminación, clonación, desinfestación, reguladores de crecimiento.

## ABSTRACT

Saramuyo is a fruit with significant national and international economic importance. However, its production and propagation through traditional methods are complicated. Unlike other countries, there is no national standardization of plantations or selected cultivars of this species for production, even though the country is considered to be part of its center of origin. The goal was to develop a primary protocol for standardizing specific saramuyo lines in vitro, with regards to micropropagation during the establishment and morphogenesis phases from three types of explants (nodes, internodes, and leaves) within modified Murashige and Skoog culture medium. The experiment was executed in two stages: the initial phase evaluated decontamination and damage while the subsequent stage examined the obtained morphogenesis. Sodium hypochlorite concentration and exposure time were considered as study factors for each type of explant during the establishment phase. The plant growth regulators 6-benzylaminopurine acid and 1-naphthaleneacetic acid were employed in blocks determined by the three types of explants during morphogenesis. The findings revealed that under the study's conditions, decontamination varied based on explant type during the establishment stage. 100% was reported for nodes and leaves, while 90.48% was obtained for internodes. Recurrent morphogenesis took the form of callus in all three explant types, but juvenile nodes produced shoots, making them the preferred establishment protocol for promoting seedling cloning. Axenification was accomplished in all three types of explants with no bacterial contamination detected. However, endophytic fungi were present during the tests, resulting in the rejection of the study's hypothesis. The morphogenic response observed was attributed to the juvenile explants' endogenous growth regulators, with direct organogenesis observed solely in the nodes, while callogenesis was generated in all three types of explants.

**Keywords:** *Annona squamosa*, axenification, cloning, desinfestation, growth regulators.

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.  
México.

## 1. INTRODUCCIÓN

El cultivo *in vitro* de saramuyo (*Annona squamosa* L.) puede permitir la generación masiva de plantas en tiempos cortos al inducir la morfogénesis en explantes provenientes de germoplasma seleccionado, a través de la evaluación de un balance de reguladores de crecimiento vegetal. El saramuyo es una planta de interés debido a sus propiedades, entre los frutos de la familia de las anonáceas, es la de mayor contenido de Vitamina C (36.3 mg por cada 100 g de pulpa), un alto contenido de proteínas, también aminoácidos esenciales, vitaminas del complejo B (B1, B2, B3 y B9) y minerales como el fósforo, potasio, hierro, calcio, magnesio, sodio, cobre, selenio y zinc, así como la de mayor dulzura (Kumar *et al.*, 2021).

Su interés comercial y alimenticio se debe a su sabor exótico, los derivados que pueden obtenerse de sus frutos, su valor nutrimental y sus compuestos bioactivos con aplicaciones medicinales, que en conjunto le han brindado un sitio dentro del mercado internacional (León-Méndez *et al.*, 2020). Países como Brasil, Filipinas e India comercializan internacionalmente frutos de saramuyo, obtenidos a partir de cultivares de alta calidad y plantaciones especializadas, además de comercializarlo en forma de subproductos (Sakazaki *et al.*, 2019; Farooq *et al.*, 2001).

Mientras que, en México solo se comercializa de manera local en mercados regionales de Yucatán, Campeche y Chiapas (Bolívar-Fernández *et al.*, 2009) a pesar de tener un gran potencial para su aprovechamiento y producción en las regiones tropicales, incluyendo el estado de Tabasco. Su aprovechamiento requiere de la selección meticulosa del germoplasma, a través de la identificación genotipos, selecciones o materiales que logren satisfacer las necesidades productivas, posean un adecuado comportamiento agronómico, fisiológico, postcosecha y con excelente calidad de fruto de acuerdo con su aceptación por los consumidores.

Debido a la variación entre plantaciones causada por su reproducción sexual, el cultivo *in vitro* puede facilitar la selección y producción de material vegetal uniforme de alta calidad (Bolívar-Fernández *et al.*, 2009), abriendo la posibilidad de su mejoramiento genético y la producción masiva de estas selecciones, materiales o plantas élite para competir en el mercado (Ba *et al.*, 2021). El cultivo *in vitro* de tejidos vegetales (CTV) es el conjunto de técnicas que bajo condiciones controladas permite la diferenciación, crecimiento y desarrollo de tejidos, órganos y plántulas a partir de un tejido inicial al

que se le denomina explante (entrenudos, yemas axilares, hojas, meristemos, nudos, entrenudos, entre otros) (Gupta et al., 2020).

El CTV se considera una herramienta biotecnológica que permite satisfacer la demanda productiva de plántulas de interés comercial (Ba et al., 2021). Seleccionar una planta con características de interés, permite su clonación masiva al aplicar cuatro etapas principales: 1) establecimiento del explante en condiciones axénicas; 2) inducción de embriones y/o brotes directamente del explante o indirectamente pasando por la formación de callos en el explante; 3) germinación, elongación y/o enraizamiento; 4) aclimatación (Loyola-Vargas y Ochoa-Alejo, 2018).

Existen estudios sobre el cultivo *in vitro* de varias especies de anonáceas, principalmente dentro del género *Annona*, en India, África y Sudamérica que fueron sometidas a distintos balances de reguladores de crecimiento vegetal (RCV's) (Abubacker y Deepalakshmi, 2017; Ba et al., 2021; Encina et al., 2014; Kudikala et al., 2020; Orantes-Ramos y López-Ventura, 2019). Los RCV's son compuestos orgánicos que desempeñan distintos efectos sobre el desarrollo, crecimiento y comportamiento vegetal (Roychoudhury y Aftab, 2021).

Las auxinas y citocininas son reconocidas como los principales RCV's (Su et al., 2011) y se utilizan con frecuencia en el cultivo *in vitro* para regenerar brotes o diferenciar células, así como establecer protocolos de micropropagación (Agudelo-Morales et al., 2021). Cuando los balances de auxinas y citocininas se evalúan en distintas concentraciones *in vitro*, es posible inducir respuestas morfogénicas en plantas de interés comercial que da pauta a su propagación clonal (Hussain et al., 2021).

Para la propagación *in vitro* de saramuyo no existe mucha información disponible, mientras que para otras especies del mismo género aún no se tienen datos sobre la aplicación de tecnologías modernas en su industrialización nacional como el cultivo de tejidos vegetales o métodos agrobiotecnológicos. Específicamente en México no existen protocolos de micropropagación para esta o alguna otra especie dentro de la familia de las anonáceas, excepto para la guanábana (*Annona muricata* L.), que tiene un reporte realizado en 2020 (Judith et al., 2020).

En la actualidad, la producción y propagación nacional de plantas de *Annona* spp. se mantienen por vías tradicionales. En Campeche, Colima, Guerrero, Jalisco, Michoacán, Morelos, Nayarit, Puebla, Tabasco, Veracruz y Yucatán se reportó, para Guanábana, 39'905.27 t de fruta cosechada, lo cual generó un valor de producción de \$361,773.95 MXN (\$18,510.71 USD).

De igual manera, en Michoacán y Morelos, para Chirimoya, se reportó un valor de producción de \$1,666.82 MXN (\$85.29 USD) obtenido de 263.56 t. Mientras que para ilama (*A. diversifolia* Saff.), producida en Guerrero, y otras especies (*A. lutescens* Saff., *A. diversifolia* Saff., o *A. purpurea* Moc. y Sessé ex Dunal) producidas en Chiapas y Oaxaca no se cuentan con los datos económicos. Mientras tanto, en el año 2021 el estado de Yucatán reportó un valor de producción de \$3,123.68 MXN (\$159.83 USD) con 422.04 t cosechadas en 47.71 ha de saramuyo (*A. squamosa* L.).

Estos datos indican que México es un país productor de *Annona* spp., capaz de generar rendimientos económicos por métodos tradicionales en estas especies de la familia, mismos que pueden ser mejorados al aplicar tecnologías de vanguardia para la producción y establecimiento de plantaciones más homogéneas que aún no se han probado en campo y de las cuales no se tienen datos, entre las que pueden resaltarse el uso de técnicas agrobiotecnológicas como el cultivo de tejidos vegetales *in vitro*. Cultivar tejidos obtenidos de plantas seleccionadas en condiciones *in vitro* permite obtener tejidos libres de contaminantes microbianos. Estos tejidos o explantes expuestos a diferentes condiciones y concentraciones de RCV's pueden permitir la obtención de callos u órganos discretos para producir plantas completas, este efecto se conoce como morfogénesis (Abubacker y Deepalakshmi, 2017). La morfogénesis, directa o indirecta, posibilita la generación de líneas clonales de germoplasma élite, fase conocida como micropropagación (Monja-Mio y Robert, 2013). Entre las diferentes especies del género *Annona*, el saramuyo destaca por el valor agregado y su demanda en el mercado estadounidense, donde para 2021 Estados Unidos de América fue el importador de mayor relevancia al importar 4.13 millones de dólares en saramuyo, con un precio por kilogramo de \$65.81 MXN (3.21 USD) frente a los \$20.00-30.00 MXN del mercado nacional (Tridge, 2023).

La respuesta morfogénica *in vitro* de cultivares de saramuyo se ha evaluado en India para generar plantaciones uniformes (Farooq *et al.*, 2001; Nagori y Purohit, 2004). Gracias a que es un medio a través del cual se pueden obtener plantas homogéneas (Ba *et al.*, 2021). Dichas plantas pueden aprovecharse para continuar procesos de micropropagación, fomentar su cultivo, es posible dirigir los resultados de este proyecto a los productores de anonáceas y agricultores de México con interés en su producción en zonas tropicales del país, la venta de plantas a consumidores minoristas y personas afines a la creación e implementación de huertos con plantas tradicionales.



## 2. ANTECEDENTES

### 2.1. Saramuyo

El saramuyo (*Annona squamosa* L.) es una planta de la familia de las anonáceas, distribuida por el sur de Asia y América (Liu *et al.*, 2017), identificada con distintos nombres alrededor del mundo. Su interés comercial radica en sus propiedades nutrimentales, sabor exótico y dulce; compuestos bioactivos con actividad nutracéutica y biomédica entre los que se han estudiado diterpenos, alcaloides, acetogeninas, ciclopeptidos, aceites esenciales (Ma *et al.*, 2017); flavonoides, fenoles, saponinas, glúcidos, taninos, sesquiterpenos, antocianinas, esteroides, terpenoides, quinonas, aminoácidos y ácidos orgánicos (Kumar *et al.*, 2021). En México el saramuyo tiene cuatro meses de brotación vegetativa y floración al inicio del año, desde enero hasta abril, aunque espontáneamente puede llegar a hacerlo también en junio y julio cuando se alcanza una temperatura de 38 °C, su floración dura de 20 a 25 días desde el botón floral hasta la apertura de la flor y la maduración del fruto dura 120 días desde la polinización, por lo que su fructificación se da durante primavera e inicio de verano, así como a principios de otoño (Cituk-Chan, 2021).

#### 2.1.1. Origen del saramuyo

El origen durante cierto tiempo ocasionó un debate dentro de la comunidad científica, pues no se tenía del todo claro, se asumían dos ideas principales, por un lado que los españoles fueron los responsables de su dispersión por América gracias al transporte de semillas desde las Filipinas; por otro lado, que los Portugueses introdujeron el fruto en el sur de India y desde entonces fue ampliamente distribuido por zonas tropicales de América y Asia (Ma *et al.*, 2017). Sin embargo, actualmente se toma como punto de origen el Trópico Americano, su esparcimiento se dio desde América gracias a los europeos, quienes dispersaron las semillas por Asia después de la colonización del nuevo continente, y se atribuye la llegada del fruto a India por los Portugueses, quienes lo introdujeron en las costas de Malabar a principios del siglo XVI (Singh, 2019). •

### 2.1.2. Descripción botánica

Se le considera un arbusto o árbol de porte bajo debido a su altura de 3 a 7 m, caducifolio con copa y ramas crecimiento irregular. Todas sus superficies (hojas, ramas, tallo, raíces, etc.) son olorosas al triturarlas. Presenta un sistema radicular ramificado y superficial con dos a tres niveles poco profundos, su madera es blanda, el tallo ramifica cerca de la base y su corteza externa es de color castaño, desde lisa hasta agrietada, con corteza interna de color amarillo-claro (León-Méndez *et al.*, 2020).

Las hojas tienen una forma elíptico-lanceoladas o lanceoladas, llegan a medir de 6 a 17 cm de largo con 3 a 5 cm de ancho, alternas y dispuestas en peciolo corto de corteza fina, presentan coloración verdosa y azul-verdosa o grises en el envés, grisáceo cerosas cuando son jóvenes y negruzcas al secarse (Gerrero y Fischer, 2007; Ma *et al.*, 2017). Las flores presentan órganos masculinos y femeninos en la misma flor, por lo que se reconocen como hermafroditas, surgen como brotes terminales o axilares, solitarias, en pares o tercias, se disponen como flores colgantes-pendulantes de tres pétalos de color pálido y exhiben dicogamia protógina (Kishore *et al.*, 2012). El fruto es redondeado, acorazado, ovado o cónico, tiene de 5 a 10 cm de diámetro y se compone de muchos carpelos en forma de protuberancias amorfas en el exocarpio y mesocarpio, las semillas en su interior miden de 1.3 a 1.6 cm, recubiertas por la pulpa fibrosa del fruto, son largas, lisas, brillantes y de coloración negruzca o marrón oscuro (Ma *et al.*, 2017).

De acuerdo a datos de Cituk-Chan (2021) recabados en Yucatán, México, su desarrollo se da en zonas tropicales con climas cálido seco o subhúmedo, necesita humedad relativa de entre 70 y 80%, soporta temperaturas de 18 °C a 40 °C a altitudes de entre 2 a 30 m.s.n.m. Es la anonácea con mayor tolerancia a periodos largos de sequía. Sin embargo, su mejor potencial productivo es en suelos de tipo rendzinas líticas, luvisol ródico, franco-arcillosos y franco-arenosos, donde el suelo luvisol ródico le permite un crecimiento y desarrollo más vigoroso, con pH óptimo neutro o ligeramente alcalino, de entre 7 y 8, con muy buen drenaje. Gerrero y Fischer (2007) mencionan que el saramuyo en condiciones de cultivo en Colombia, puede desarrollarse en altitudes desde los 0 a 1000 m.s.n.m., temperatura mínima de 10 °C, humedad relativa superior a 60% y precipitación anual de 750 a 1200 mm.

### 2.1.3. Taxonomía del saramuyo

**Reino:** Plantae

**División:** Magnoliophyta

**Clase:** Magnoliopsida (Dicotiledones) y Equisetopsida C. Agarddh

**Subclase:** Magnoliidae

**Familia:** Annonaceae (Anonáceas), Juss. Sub. Annonoideae

**Tribu:** Abreae

**Orden:** Magnoliales Bromhead

**Género:** *Annona*

**Especie:** *squamosa* (L.)

### 2.2. Cultivo de tejidos vegetales *in vitro*

El término de cultivo de tejidos vegetales *in vitro* (CTV) hace referencia al proceso de establecer cualquier parte de una planta (célula, tejido u órgano) en medios artificiales sometidos a condiciones asépticas y ambientales controladas (Loyola-Vargas y Ochoa-Alejo, 2018). De acuerdo a Thorpe (2007). Es una herramienta biotecnológica utilizada en ciencias básicas y aplicadas, propuesta por primera vez en 1902 por Gottlieb Haberlandt durante su discurso a la Academia Alemana de Ciencia (German Academy of Science); consiste en distintas técnicas que utilizan el cultivo de células, órganos, tejidos o sus componentes en condiciones controladas física y químicamente *in vitro* (dentro de recipientes de cristal y actualmente, de materiales similares) para generar conocimiento sobre las propiedades celulares, sus potencialidades, procesos y funcionamiento (Thorpe, 2007). Además, permite estudiar los procesos metabólicos involucrados en la señalización y relación intercelular de las plantas, su propagación clonal, mejora agronómica (calidad, rendimientos, productividad, resistencia, manejo) y genética, producción y mantenimiento de germoplasma selecto libre de patógenos. Así como el aprovechamiento y la generación de bioproductos vegetales y compuestos orgánicos bioactivos (Chaturvedi et al., 2007; Karakas, 2020; Pais, 2019).

### 2.2.1. Germoplasma y micropropagación *in vitro*

El CTV debe su éxito a la totipotencia de las células de las plantas, consiste en la capacidad de la reprogramación de las células diferenciadas obtenidas de algún tejido vegetal de una planta adulta o de germoplasma para generar nuevos órganos, callos o embriones (Abubacker y Deepalakshmi, 2017; Loyola-Vargas y Ochoa-Alejo, 2018; Méndez-Hernández *et al.*, 2019; Phillips y Garda, 2019).

Dentro de las investigaciones enfocadas al cultivo *in vitro* de anonáceas para su micropropagación se encuentran trabajos en guanábana (*A. muricata* L.), anona (*A. reticulata* L.) (Kudikala *et al.*, 2020), saramuyo (*A. squamosa* L.) y otras especies (Abubacker y Deepalakshmi, 2017). Además de estudios sobre la micropropagación de chirimoya africana o sunkungo (*A. seleganensis* Pers.) (Ba *et al.*, 2021), y en América del Sur, varios frutos de esta familia (*A. senegalensis* Pers., *A. scleroderma* Saff., *A. montana* Macfad., *A. reticulata* L., *A. glabra* L. y *A. diversifolia* Saff.) (Encina *et al.*, 2014; Orantes-Ramos y López-Ventura, 2019). En tanto que en México solo se ha reportado para la guanábana (*A. muricata* L.) (Judith *et al.*, 2020).

Las bases del cultivo *in vitro* para la regeneración celular comenzaron entre las décadas de los 40's y 60's, con el descubrimiento de los RCV's y el cultivo de plantas en condiciones axénicas, poco después, la aplicación del cultivo *in vitro* para propagación clonal se convirtió en una de las más usuales para obtener germoplasma libre de patógenos y sometido a RCV's para micropropagarlo (clonarlo *in vitro*) (Thorpe, 2007). La micropropagación es una etapa que permite clonar material vegetal idéntico genéticamente, su éxito necesita de la respuesta morfogénica del tejido vegetal cultivado *in vitro* directa o indirectamente por embriogénesis somática u organogénesis (Randel *et al.*, 2015).

El hipoclorito de sodio comercial (cloro), es el agente de desinfección más utilizado durante el establecimiento de explantes en protocolos de establecimiento *in vitro*, su éxito en el establecimiento requiere de concentraciones y tiempos de exposición adecuadas (Quezada y Ayra, 2020). Funciona para introducir explantes en condiciones axénicas, ya que libera a los explantes de microorganismos, actúa en la oxidación e hidrólisis de las proteínas de las membranas celulares microbianas, de manera que las

cadena polipeptídicas se disuelven y crean desorden en su estructura celular, deshidrata a las células contaminantes mediante acción osmótica y las intoxica a partir de la formación de ácido hipocloroso, formaldehído y acetaldehído (Sánchez Ruiz *et al.*, 2009).

La propagación *in vitro* de plantas requiere de protocolos específicos para cada especie, cultivares o razas, aun así, de manera general, posterior a la selección de la planta madre siempre se encuentran cuatro etapas: 1) establecimiento de los explantes; 2) multiplicación de brotes; 3) elongación y enraizamiento; y 4) aclimatización. El establecimiento y cultivo axénico de los explantes da pauta al éxito en la micropropagación de material vegetal y permite diseñar experimentos morfogénicos para evaluar tipos de morfogénesis, por ello se considera que su objetivo es producir plantas estandarizadas, es decir, de una calidad sanitaria, morfológica específica con una genética similar entre todas las plantas que pueden ser cultivadas en los campos productivos (Sivaji *et al.*, 2020).

#### **2.2.1.1. Reguladores de crecimiento vegetal**

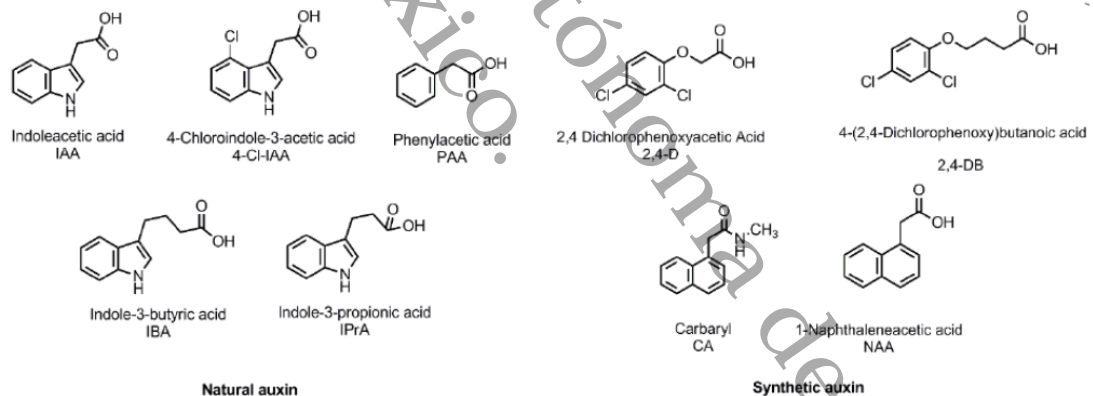
Los RCV's son compuestos químicos que pueden originarse tanto biológicamente como sintéticamente y causan o promueven un efecto sobre la actividad fisiológica de las plantas (Hussain *et al.*, 2021). Se encuentran endógenamente en los tejidos vegetales aunque al exponer las plantas a RCV's exógenos, estos afectan sus estados fisiológicos (Kumari *et al.*, 2018). La respuesta de los tejidos vegetales a RCV's se da mediante la señalización a través de la red celular del sistema vascular de las plantas (Hussain *et al.*, 2021) que puede ser el aceleramiento de su desarrollo, aumento de productividad, estimulación del enraizamiento, inhibición de dormancia en semillas, promoción de la floración, aceleramiento o disminución de la maduración de frutos, aumento en la cantidad o tamaño de brotes, etc. (Agudelo-Morales *et al.*, 2021).

Los diferentes tipos de RCV's se clasifican de acuerdo con los efectos que causan en las plantas, también pueden diferenciarse por su origen sintético o biosintético. Los más importantes y ampliamente utilizados para su aplicación *in vitro* son las auxinas y citocininas (AX's y CK's) (Phillips y Garda, 2019). Aun así, existe una gran variedad de compuestos conocidos como RCV's con aplicaciones en el cultivo *in vitro* y en los campos de producción como parte del manejo integrado de cultivos, tales como

giberelinas, etileno (o anti-etileno), ácido abscísico (Thakur, 2022), aquellos que apenas comienzan a estudiarse o son recién descubiertos, como los brasinoesteroides, triacontanol, ácido salicílico, jasmonatos, cloruro de clormecuat, óxido nítrico y poliaminas (Chugh y Kumar, 2022; Kumar *et al.*, 2022).

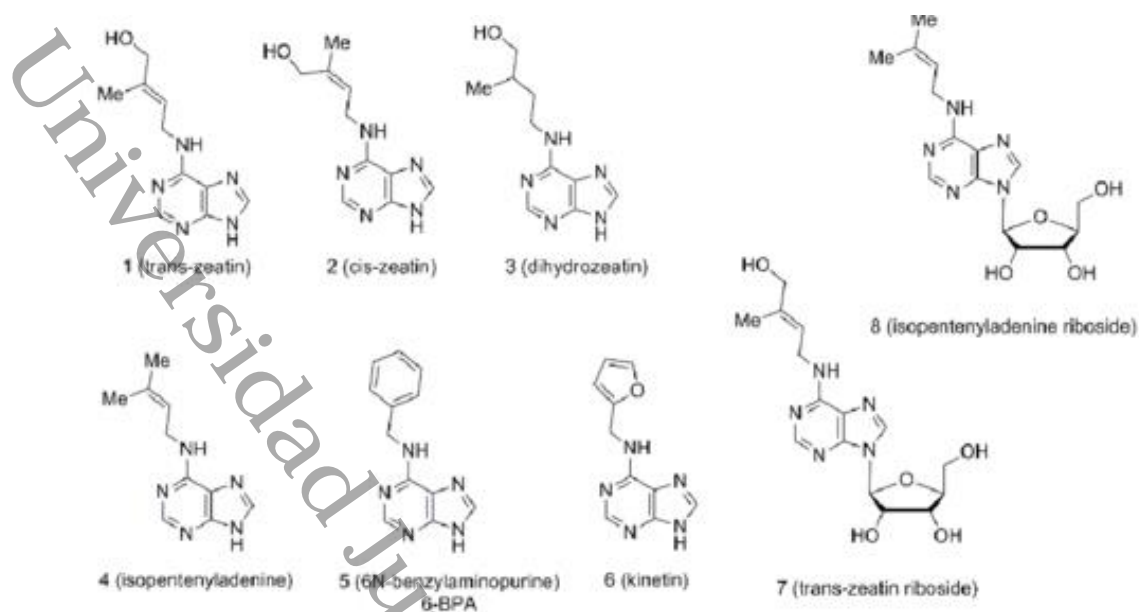
### 2.2.1.2. Auxinas y citocininas

Las auxinas (AX's) fueron descubiertas por Charles Darwin en 1881, su biosíntesis no puede ser generalizada, pero se atribuye al metabolismo del triptófano por su naturaleza heterocíclica con presencia de un grupo indol y un grupo alquilo carboxílico en el carbono 3 de su estructura (Figura 1). Su actividad fisiológica impacta en división celular y mantenimiento de regiones meristemáticas, germinación, elongación de tallos, desarrollo de raíces adventicias, dominancia apical, partenocarpia, abscisión y caída de frutos, así como otros fenómenos relacionados con el desarrollo vegetal (Agudelo-Morales *et al.*, 2021; Thakur, 2022). De forma *in vitro*, estimulan formación de callos y la proliferación celular, siendo reguladores capaces de inducir embriogénesis somática (Phillips y Garda, 2019).



**Figura 1.** Estructura química de algunas auxinas (Agudelo-Morales *et al.*, 2021).

Las citocininas (CK's) fueron descubiertas durante la década de los 50's por Miller-Skoog (Miller *et al.*, 1955). Son moléculas derivadas de la adenina y suelen presentarse con el Nitrógeno 6 (N<sup>6</sup>) reemplazado por un isoprenoide o una cadena aromática (Figura 2).



**Figura 2.** Estructura química de algunas citocininas (Agudelo-Morales *et al.*, 2021).

Su efecto fisiológico es sobre el crecimiento vegetal como germinación de semillas, generación de brotes y raíces, división celular, desarrollo de cloroplastos y sistema vascular de las plantas, diferenciación celular, elongación de tejidos, senescencia de las hojas, fotosíntesis, envejecimiento vegetal, floración, distribución foliar y respuestas ante el estrés abiótico (Li *et al.*, 2021; Thakur, 2022). Los roles principales del desarrollo, crecimiento y regulación de la actividad vegetal se llevan a cabo por las auxinas (AX's) y citocininas (CKs), estos RCV's actúan sinérgicamente para un buen funcionamiento de los sistemas vegetales, por lo que se les determina como los principales RCV's y han sido los más estudiados hasta la fecha (Hussain *et al.*, 2021).

En saramuyo se ha reportado morfogénesis exitosa con el uso de AX's como AIA (ácido indol-3-acético) en concentraciones de 0 a 100 mg/L, IBA (ácido indol-3-butírico) en concentraciones de 0 a 500 mg/L, ANA (ácido 1-naftalenacético) en concentraciones de 0 a 50 mg/L y 2-4D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) en concentraciones de 0 a 10 mg/L. También se han utilizado CK's tales como Kin (Kinetina) en concentraciones de 0 a 0.8 mg/L, y 6-BAP (ácido 6-Bencilaminopurina, o BAP) en concentraciones de 0 a 4 mg/L, así como distintas interacciones entre estos RCV's, que se han probado en explantes nodales y hojas para generar brotes y callos a partir de la aplicación de diferentes concentraciones en ecotipos de India (Farooq *et*

*al.*, 2001; Nagori y Purohit, 2004). Estos estudios permiten desarrollar metodologías escalables y estandarizadas con clones de élite, preparados para trasladarse al campo en forma de plántulas de alta calidad (Gupta *et al.*, 2020). Sin embargo, los ecotipos mexicanos no han sido reportados en ningún tipo de investigación en área de CTV *in vitro*.

#### **2.2.1.2. Efectos *in vitro* de las auxinas y citocininas**

En condiciones *in vitro*, las AX's estimulan la formación de callos y la proliferación celular, por lo que se les atribuye la inducción de embriogénesis somática *in vitro* (Phillips y Garda, 2019). Las CK's *in vitro* suelen utilizarse para propiciar la aparición de brotes mediante la diferenciación celular, esencialmente en el diseño de protocolos de micropropagación (Agudelo-Morales *et al.*, 2021) e inclusive se ha demostrado que su utilización individual puede inducir eficientemente la organogénesis directa (Nagori y Purohit, 2004; Randel *et al.*, 2015). La combinación entre AX's y CK's promueve procesos como la formación y el crecimiento de callos, generación de brotes y diferenciación de órganos, establecimiento de suspensiones celulares (Randel *et al.*, 2015), embriogénesis somática (Jiménez-Terry & Agramonte, 2013). Utilizar concentraciones de estos RCV's en el cultivo *in vitro* de tejidos vegetales promueve los efectos morfogénicos sobre distintos tipos de explantes (Hussain *et al.*, 2021).

#### **2.2.2. Morfogénesis**

La morfogénesis de plantas *in vitro* engloba a todos los efectos regenerativos causados por el CTV sobre los explantes, se conforma por el cultivo de células vegetales, su división y multiplicación, diferenciación y desdiferenciación, generación de protoplastos, tejidos y órganos en medios de cultivo sólidos o líquidos específicos, condiciones asépticas y ambientes controlados (Kumar y Kumar-Srivastava, 2015). Su control se lleva a cabo por el balance de diferentes niveles de RCV's que influyen en la diferenciación y desarrollo de las plantas, generando sistemas de desdiferenciación y diferenciación celular de especies vegetales, útiles para su aprovechamiento en distintas áreas (Loyola-Vargas y Ochoa-Alejo, 2018).



De acuerdo con Thorpe (2007), la morfogénesis tiene dos vías: puede ser directa, cuando embriones somáticos (embriogénesis somática), brotes u órganos diferenciados (organogénesis) se obtienen directamente de los explantes establecidos. Y puede ser indirecta, cuando los explantes producen células desdiferenciadas en forma de callos (callogénesis) que se usan diferenciarse posteriormente (generando organogénesis o embriogénesis somática) mediante subcultivos con nuevos balances de RCV's (Thorpe, 2007). De cualquier manera, la respuesta tiene orígenes adventicios a los explantes los explantes utilizados (Cui et al., 2019).

#### **2.2.2.1. Organogénesis**

Toda célula vegetal es capaz de regenerar órganos u organismos completos diferenciados desde tejidos somáticos al exponerse a RCV's *in vitro* con las condiciones adecuadas, esta generación de brotes u órganos es conocida como organogénesis (Su *et al.*, 2011). La organogénesis en sí, es una capacidad conferida por la totipotencia o pluripotencia celular de las plantas para regenerarse (Phillips & Garda, 2019).

La organogénesis puede presentarse tanto de manera directa como indirecta, es una respuesta inducida por concentraciones de AX's y CK's; la organogénesis directa suele ser aprovechada para la elaboración de protocolos de micropropagación, consiste de la generación de brotes directamente de un explante establecido *in vitro* (Ba *et al.*, 2021). En anonáceas existen reportes sobre el uso de 6-BAP de manera aislada en la inducción de organogénesis directa (Farooq *et al.*, 2001; Ba *et al.*, 2021).

La organogénesis indirecta, requiere que los explantes *in vitro* primeramente generen callos (células desdiferenciadas) que posteriormente sean diferenciados como brotes en forma de hojas, peciolos, nudos, raíces o cualquier otro órgano, dependiendo del tipo de explante y las concentraciones de RCV's utilizadas (Adams *et al.*, 2021).

#### **2.2.2.2. Embriogénesis somática**

Los embriones obtenidos de explantes se denominan embriones somáticos, debido a su naturaleza proveniente de un tejido extraído de otro ser vivo, generalmente en presencia de AX's, morfogénesis conocida como embriogénesis somática (ES) (Méndez-Hernández *et al.*, 2019). Estos embriones pueden regenerar plantas completas y se aprovecha en el mantenimiento de germoplasma, establecimiento de

protocolos de producción y maduración embrionaria, clonación masiva de plantas y mejoramiento genético; especialmente en plantas leñosas con ciclos de vida perennes (Pais, 2019).

La capacidad de cada especie vegetal para presentar “ES” es variable, puede presentarse de dos maneras: 1) directa cuando los explantes generan embriones directamente desde el tejido establecido; 2) indirecta cuando inicialmente se produce la formación de callos y a partir de estos surgen los embriones somáticos (Liu *et al.*, 2021). En ambos casos, el embrión comienza a formarse por una división celular asimétrica de dos ejes organizados, uno que establece lo que ha de convertirse en el eje apical y el otro en el eje basal (Su *et al.*, 2011).

### 3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

El presente trabajo buscó establecer *in vitro* a la especie vegetal saramuyo (*A. squamosa* L.) y sentar las bases para un protocolo de micropropagación. Se realizó un análisis de diferentes protocolos de establecimiento *in vitro* de anonáceas (Cuadro 1) donde se usa NaClO, como agente desinfectante, a concentraciones entre 0% y 15%, en tiempos de 10 a 15 min. Así mismo, puede apreciarse la repetitividad en el uso de alcohol 70° y tensoactivo para obtener resultados exitosos en la descontaminación de explantes, los mismos que pueden mejorarse.

Los resultados superiores al 85% de rendimiento utilizaron hipoclorito de sodio junto a otros agentes desinfectantes, lo que dio pauta para diseñar un protocolo de establecimiento para explantes de saramuyo. El protocolo utilizado para este experimento incluyó la adición del tensoactivo Tween 20® (polisorbato 20).

Tween 20® es un detergente ampliamente utilizado para permeabilizar las células vegetales, permite que se produzcan interacciones moleculares hidrofóbico-hidrofílicas en los fosfolípidos de distintas regiones de la membrana celular de las plantas con las moléculas del detergente (Salcedo-Morales *et al.*, 2009). Por esta razón es utilizado como un tensoactivo que permite un efecto más profundo en comparación al uso de los agentes desinfectantes por separado (Bueno *et al.*, 2007). También se utilizó etanol al 70%, que actúa en la disminución de la tensión superficial de las membranas contaminantes al tiempo en el que desnaturaliza las proteínas, lo que provoca lisis celular (del Río-Carbajo y Vidal-Cortés, 2019).

Por otro lado, para distintas anonáceas también se han utilizado RCV's en la generación de respuestas morfogénicas en tejidos cultivados *in vitro*, principalmente AX's y CK's a diferentes concentraciones (Cuadro 2) por lo que se plantean perspectivas de distintas proporciones entre ambos RCV's para la morfogénesis en forma de callos, brotes y/o embriones en los explantes de saramuyo.

**Cuadro 1.** Agentes utilizados en algunos establecimientos *in vitro* de anonáceas.

<b>Autor</b>	(Kudikala <i>et al.</i> , 2020)	(Ba <i>et al.</i> , 2021)	(Quezada y Ayra, 2020)	(Judith <i>et al.</i> , 2020)	(Farooq <i>et al.</i> , 2001)	(Nagori y Purohit, 2004)	(Orantes-ramos y López-Ventura, 2019)
<b>Cultivo</b>	<i>A. reticulata</i> (L.)	<i>A. senegalensis</i> (P.)	<i>A. muricata</i> (L.)		<i>A. squamosa</i> (L.)		<i>A. diversifolia</i> (Safford)
<b>Tipo de explante</b>	Nudo	Nudo	Nudo	Ápice meristemático	Nudo	Hoja	Hoja
<b>Rendimiento</b>	N/R	87.50%	80%	N/R	85.30%	N/R	100%
<b>Tensoactivo</b>	X	X					
<b>Fungicida</b>	X		X	X	X		X
<b>Cloro</b>	X	X	X	X	X	X	X
<b>Bactericida</b>			X	X	X		X
<b>Detergente</b>		X	X	X			X
<b>Parafina</b>		X					
<b>Antioxidante</b>		X	X	X	X		X
<b>Etanol 70 %</b>			X	X			X
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>					X		
<b>AgNO<sub>3</sub></b>					X		

N/R= No reportado. Nota: El cloro se utilizó en todos los tratamientos de establecimiento *in vitro* de anonáceas.

**Cuadro 2.** Algunos reportes de morfogénesis exitosa en anonáceas *in vitro*.

Autor	Especie	Explante	Medio de cultivo	Citocinina	Auxina	Respuesta	%	Brotos por explante
(Nair <i>et al.</i> , 1984) en (Rasai <i>et al.</i> , 1995)	Saramuyo ( <i>A. squamosa</i> L.)	Hojas de plántulas <i>in vitro</i>	MSS	2 mg/L 6BAP+0.5 mg/L Kin	----	Brotos	----	15.6
(Rasai <i>et al.</i> , 1994) en (Rasai <i>et al.</i> , 1995)	Atemoya ( <i>A. cherimola</i> L. x <i>squamosa</i> L.)	Hipocotilos	MSS	2 mg/L BAP+0.1 mg/L Kin	----	Brotos	----	12.6
(Jordan, 1987, 1988) y (Jordan <i>et al.</i> , 1990) en (Rasai <i>et al.</i> , 1995)	Chirimoya ( <i>A. cherimola</i> L.)	Hipocotilos	MSL	2 mg/L BA	0.5 mg/L ANA	Brotos	---	----
(Bejoy y Hariharan 1992) en (Rasai <i>et al.</i> , 1995)	Guanábana ( <i>A. muricata</i> L.)	Hipocotilos	MSS	----	8.9uM(2 mg/L) BA+ 0.54 uM (0.1 mg/L) ANA	Brotos	----	4.8
Nagori y Purohit, (2004)	Saramuyo ( <i>A. squamosa</i> L.)	Hipocotilos	MSS	5 mg/L BAP	----	Brotos	---	23
(Nair <i>et al.</i> , 1984) en (Rasai <i>et al.</i> , 1995)	Saramuyo ( <i>A. squamosa</i> L.)	Hojas de plántulas <i>in vitro</i>	MSL	0.5 mg/L 6BAP+0.5 mg/L Kin	*ANA añadida produce callos	Brotos	----	----
(Kudikala <i>et al.</i> , 2020)	Chirimoya ( <i>A. reticulata</i> L.)	Nudos	MSS	2.5 mg/L BAP	3 mg/L IBA	Brotos	87.40%	6.33 (D.E. 0,37)
(Ba <i>et al.</i> , 2021)	Chirimoya africana ( <i>Annona senegalensis</i> Pers).	Nudos	MSS	2 mg/L 6BAP	----	Brotos	91.76%	2.3

**Continúa Cuadro 3.** Algunos reportes de morfogénesis exitosa en anonáceas *in vitro*.

Autor	Especie	Explante	Medio de cultivo	Citocinina	Auxina	Respuesta	%	Brotos por explante
(Ba <i>et al.</i> , 2021)	Chirimoya africana ( <i>Annona senegalensis</i> Pers).	Nudos	MSS	----	50 mg/L IBA	Raíz	58.33 %	2.2
(Farooq <i>et al.</i> , 2001)	Saramuyo ( <i>A. squamosa</i> L.)	Nudos	MSS	0.6 mg/L Kin+0.6 mg/LBAP	----	Brotos	96.10 %	3 a 4
(Jordan 1988) en (Rasai <i>et al.</i> , 1995)	Chirimoya ( <i>A. cherimola</i> L.)	Peciolos de hojas	MSL	2 mg/L BA	0.5 mg/L ANA (500uM)	Brotos	100 %	----
(Encina <i>et al.</i> , 1994) en (Rasai <i>et al.</i> , 1995)	Chirimoya ( <i>A. cherimola</i> L.)	Plantulas <i>in vitro</i>	MSS	----	101.66 mg/L IBA	Raíz	95.0 %	----
(Kudikala <i>et al.</i> , 2020)	Chirimoya ( <i>A. reticulata</i> L.)	Plantulas <i>in vitro</i>	MSS	----	4 mg/L IBA	Raíz	73.0 %	4.65±0,23
(Nair <i>et al.</i> , 1984) en (Rasai <i>et al.</i> , 1995)	Atemoya ( <i>A. cherimola</i> L. x <i>squamosa</i> L.)	Yemas	MSS	0.5 mg/L 6BAP+0.5 mg/L Kin	----	Brotos axilares	----	3 a 4
(Nair <i>et al.</i> , 1984) en (Rasai <i>et al.</i> , 1995)	Atemoya ( <i>A. cherimola</i> L. x <i>squamosa</i> L.)	Yemas	MSS	2 mg/L 6BAP+0.5 mg/L Kin	----	Brotos axilares	----	6 a 7
(Lemos y Blake, 1996)	Guanábana ( <i>A. muricata</i> L.)	Nudos	WPM	2 mg/L BAP	0.1 mg/L ANA	Brotos	---	3.5 a 4
(Abubacker <i>et al.</i> , 2017)	Guanábana ( <i>A. muricata</i> L.)	Nudos	MSS	1.5 Mg/L BAP	2 mg/L 2-4D	Callos	32.0 %	-----

**Continua Cuadro 4.** Algunos reportes de morfogénesis exitosa en anonáceas in vitro.

Autor	Especie	Explante	Medio de cultivo	Citocinina	Auxina	Respuesta	%	Brotos por explante
(Abubacker <i>et al.</i> , 2017)	Guanábana ( <i>A. muricata</i> L.)	Nudos	MSS	1.5 mg/L BAP+0.5 mg/L Kin	1.5 mg/L IBA	Brotos	48.0 %	-----
(Abubacker <i>et al.</i> , 2017)	Guanábana ( <i>A. muricata</i> L.)	Nudos	MSS	1 mg/L BAP	2 mg/L IBA + 0.5 mg/L ANA	Raíz	80.0 %	-----

El saramuyo en México es un cultivo con gran potencial para ser producido en las zonas tropicales del país, tanto para autoconsumo como para exportación, sin embargo, actualmente no ha sido aprovechado en su totalidad. El germoplasma utilizado para producir Saramuyo determina el éxito del cultivo y repercute en la calidad de los frutos (Bolívar-Fernández *et al.*, 2009). En México su producción se ha limitado a usar material criollo de traspatio (Vidal Lezama *et al.*, 2015).

Los huertos comerciales no brindan germoplasma uniforme lo que dificulta la estandarización de protocolos de conservación y producción (Agustín y Ledesma, 2014). Saramuyo en México no cuenta con procesos que puedan asegurar su calidad ni la del germoplasma utilizado para los cultivos (Cituk-Chan, 2021). No obstante, la micropropagación de material vegetal élite y el uso de la tecnología que ofrece el CTV *in vitro* puede dar solución a este problema con el uso de distintas concentraciones de AX's y CK's *in vitro* para generar germoplasma con características uniformes y de alta calidad genética (Kudikala *et al.*, 2020).

De la misma manera, se da pauta a su producción masiva a niveles industriales (Ba *et al.*, 2021) y por tanto, favorecer el cultivo de la especie y el aprovechamiento de las propiedades nutrimentales de sus frutos, la actividad nutraceutica, farmacológica, fitoquímica y biológica de sus metabolitos en forma de compuestos activos fenólicos y flavonoides hepatoprotectores, antioxidantes, anticancerígenos, insecticidas, antimicrobianos y antihiper glucémicos de alto potencial (Kumar *et al.*, 2021).

De acuerdo con lo anterior, este trabajo aborda una solución biotecnológica para contrarrestar la problemática de la baja calidad en el germoplasma de saramuyo en México aplicando la técnica del CTV *in vitro* para la obtención de germoplasma selecto de alta calidad, a partir de la selección de plantas altamente productivas con la característica de producción tardía y ecotipos tropicales mexicanos adecuados para obtener explantes y uso correcto de RCV's para inducir respuestas morfogénicas *in vitro* de esta planta, de este modo, con base a los resultados obtenidos, pueden estandarizarse los procesos de conservación y producción para generar masivamente plántulas clonadas (Ba *et al.*, 2021) controlando todas las condiciones durante el proceso.

Actualmente México no tiene investigaciones sobre el establecimiento *in vitro* de saramuyo, del cual, a pesar de su gran potencial, es una especie frutícola sin tecnologías de producción. Además, existe poca información respecto a sus aspectos



biológicos, botánicos y agrónomos (Gerrero y Fischer, 2007), brecha que se buscó atender con el presente estudio mediante el desarrollo de una metodología para su establecimiento *in vitro* e inducirle un efecto morfogénico en forma de brotes, callos y/o embriones, utilizando balances de AX's y CK's.

Este trabajo sienta las bases para escalamientos productivos de saramuyo en México a partir de clones selectos. Da las pautas para estandarizar las características del cultivo, la mejora agronómica del material vegetal y el uso de metodologías agrobiotecnológicas en condiciones controladas, como la manipulación de ploidías o la transformación genética de esta especie vegetal (Encina *et al.*, 2014). De esta manera, este estudio repercute también en futuras investigaciones botánicas de esta especie, la generación de variedades resistentes o tolerantes a varios tipos de estrés (bióticos y abióticos), así como de expresar mejores características en sus frutos.

Además, el saramuyo presenta aportes nutrimentales destacados frente a otros cultivos tropicales como piña, naranja, banana, guayaba y guanábana (Cuadro 3). En este sentido, por cada 100 g de pulpa destaca por su contenido energético (94 Kcal), en el contenido de azúcares totales (20.23 g) y ácidos grasos monoinsaturados (0.114 g) de acuerdo con un análisis realizado por la USDA “Departamento de Agricultura de los Estados Unidos” (2021).

**Cuadro 5.** Contenido nutrimental de saramuyo y otros frutos tropicales (USDA, 2021).

<b>Aporte nutrimental (100g)</b>	<b>Saramuyo</b>	<b>Piña</b>	<b>Naranja</b>	<b>Banana</b>	<b>Guayaba</b>	<b>Guanábana</b>
Energía (Kcal)	94.000	50.000	47.000	89.000	68.000	66.000
Agua (g)	73.200	86.000	86.800	74.900	80.800	81.200
Proteína (g)	2.060	0.540	0.940	1.090	2.550	1.000
Lípidos totales (g)	0.260	0.120	0.120	0.330	0.950	0.300
Carbohidratos (g)	23.600	13.100	11.800	22.800	14.300	16.840
Fibra (g)	4.400	1.400	2.400	2.600	5.400	3.300
Azúcares totales (g)	20.230	9.850	9.350	12.200	8.920	13.500
Vitamina C (mg)	36.300	47.800	53.200	8.700	36.300	20.600
Tiamina (mg)	0.110	0.079	0.087	0.031	0.110	0.070
Riboflavina (mg)	0.113	0.032	0.040	0.073	0.113	0.050
Niacina (mg)	0.883	0.500	0.282	0.665	0.883	0.900
Vitamina B6 (mg)	0.200	0.112	0.060	0.367	0.200	0.059
Folatos (µg)	14.000	18.000	30.000	20.000	14.000	14.000
Ácidos grasos saturados (g)	0.048	0.009	0.015	0.112	0.048	0.051
Ácidos grasos monoinsaturados (g)	0.114	0.013	0.023	0.032	0.028	0.090
Ácidos grasos poliinsaturados (g)	0.040	0.040	0.025	0.073	0.114	0.069
Calcio (mg)	24.000	13.000	40.000	5.000	18.000	14.000
Hierro (mg)	0.600	0.290	0.100	0.260	0.260	0.600
Magnesio (mg)	21.000	12.000	10.000	27.000	22.000	21.000
Fósforo (mg)	32.000	8.000	14.000	22.000	40.000	27.000
Potasio (mg)	247.000	109.000	181.000	358.000	417.000	278.000
Sodio (mg)	9.000	1.000	0.000	1.000	2.000	14.000
Zinc (mg)	0.100	0.120	0.070	0.150	0.230	0.100
Cobre (mg)	0.086	0.110	0.045	0.078	0.230	0.086
Selenio (µg)	0.600	0.100	0.500	1.000	0.600	0.600

## 4. OBJETIVOS E HIPÓTESIS

### 4.1. Objetivo General

Evaluar el efecto del ácido 1-naftalenacético (ANA) y del ácido 6-bencilaminopurina (6-BAP) en la respuesta morfogénica *in vitro* de tres tipos de explantes de saramuyo (*Annona squamosa* L.) que den pauta para establecer un protocolo de micropropagación a partir de nudos, entrenudos y hojas

### 4.2. Objetivos Específicos

1. Establecer el método de desinfección de los explantes para el cultivo *in vitro* de saramuyo.
2. Evaluar el efecto de las concentraciones de ANA y 6-BAP sobre los explantes de saramuyo para seleccionar los balances que generen mayor respuesta morfogénica *in vitro*.

### 4.3. Hipótesis

El balance de auxinas y citocininas adicionado al medio de cultivo Murashige-Skoog, causará un efecto morfogénico en el tejido vegetal, callos, brotes y/o embriones de saramuyo (*Annona squamosa* L.) *in vitro* cuando se encuentren en un balance con orden de magnitud distinto.

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1. Descripción del área de estudio

El experimento se realizó en dos etapas, la primera consistió en el establecimiento de explantes juveniles de saramuyo en las instalaciones de la División Académica de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco (DACA-UJAT) localizada en la ranchería La Huasteca Segunda Sección, Centro, Tabasco, México. Localizada en las coordenadas 17° 47' 13.1" N, 92° 57' 14.4" O, con altitud de 19 m s.n.m., el clima es cálido húmedo con temperatura media de 27 °C. El estudio se realizó en condiciones controladas dentro del Laboratorio de Sanidad Vegetal del Centro de Investigación de Ciencias Agropecuarias (CICA) de la DACA-UJAT. La segunda etapa consistió en la réplica del experimento realizado en la DACA-UJAT en las instalaciones del Laboratorio de Propagación Clonal del Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY) con plantas de campo para evaluar el efecto morfogénico de los RCV's ANA y 6-BAP en los explantes obtenidos de estas plantas.

### 5.2. Diseño experimental

El experimento se dividió en dos etapas, en la primera etapa se realizó el establecimiento *in vitro* de los explantes; en la segunda etapa; de la inducción morfogénica, en ambas etapas se utilizó el medio de cultivo Murashige-Skoog (MS) a pH de 5.7.

En la primera etapa se utilizó un medio de su fuerza iónica, sin vitaminas ni RCV's, se evaluó el porcentaje de contaminación y la supervivencia de los explantes con base a su oxidación. Los resultados se analizaron bajo un diseño experimental completamente al azar (DECA) y arreglo factorial 4x4 para cada tipo de explante (hojas, nudos y entrenudos).

En la segunda etapa se utilizó el medio de cultivo MS adicionado con 2.5 g/L de carbón activado y los RCV's ANA y 6-BAP a diferentes concentraciones, para conocer el efecto morfogénico que el balance causó sobre los explantes en la generación de callos y el número de brotes. Los resultados se analizaron bajo un arreglo factorial 4x4 en

bloques completamente al azar. Para ambas etapas, la comparación de medias utilizada fue la prueba de diferencia mínima significativa (DMS) de Fisher con  $\alpha \leq 0.05$ . Todos los análisis se realizaron con el software estadístico SAS de escritorio versión 9.4 del año 2014.

### 5.2.1. Establecimiento *in vitro*

Durante la primera etapa se evaluó el establecimiento *in vitro* de tres tipos de explantes, cada uno individualmente en un arreglo factorial 4x4 en un diseño completamente al azar, para tener un total de 16 tratamientos determinado por cada interacción de concentración de hipoclorito de sodio con tiempo de exposición de los explantes durante su establecimiento (Cuadro 4).

**Cuadro 6.** Diseño del establecimiento *in vitro* de saramuyo.

Diseño Factorial 4x4		Factor A: Concentración de Cloro (%)			
		2.5	5	7.5	10
Factor B: Tiempo de exposición (min)	5	T1	T2	T3	T4
	10	T5	T6	T7	T8
	15	T9	T10	T11	T12
	20	T13	T14	T15	T16

Para cada interacción de Factores AxB corresponde un tratamiento (T) y su enumeración.

Cada tratamiento constó de siete repeticiones y tres unidades de observación por unidad experimental (21 explantes por tratamiento), por lo que para cada tipo de tejido se tuvieron 336 explantes (21 en cada uno de los 16 tratamientos). Se utilizaron tres tipos de explantes: nudos, entrenudos y hojas, cada uno con su respectivo análisis estadístico conformado por 112 unidades experimentales (7 unidades experimentales en 16 tratamientos por tipo de explante), por lo que el experimento global consistió en 1,008 explantes (3 experimentos de 336 explantes por tipo de tejido) y 336 unidades experimentales.

Los resultados del establecimiento se evaluaron por medio de la presencia o ausencia de contaminación bacteriana o fungosa en las unidades experimentales de forma porcentual, con base en el total de observaciones por tratamiento, mientras que la supervivencia de los explantes se evaluaron por medio de la oxidación y necrosis del tejido establecido, de forma porcentual, con base en el total de observaciones por

tratamiento. El estadístico realizado en el estudio se hizo a través de un análisis de varianza (ANVA), y posteriormente la prueba de comparación de medias Diferencia Mínima Significativa (DMS) de Fisher con  $\alpha \leq 0.05$ , en el programa estadístico SAS de escritorio versión 9.4 del año 2014, asegurando la normalidad de los datos mediante la transformación  $\arcsin\sqrt{x}$  donde “x” corresponde a la media de cada tratamiento.

### 5.2.2. Inducción morfológica

Las AX's y CK's actúan en conjunto para la respuesta morfológica de los tejidos vegetales *in vitro* (Hussain *et al.*, 2021) y su uso en anonáceas ha sido ampliamente estudiado. En los explantes de saramuyo utilizados se evaluaron a cuatro niveles de concentración (mg/L) de ANA y 6-BAP dentro de un arreglo factorial 4x4 con diseño de bloques completamente al azar. Bloqueado por tipo de explante para evaluar la existencia de efectos estadísticamente significativos de manera aislada por tipo de explante y en conjunto con los RCV's.

El protocolo de establecimiento *in vitro* más exitoso para cada tipo de explante en la primera etapa fue replicado para establecer tejido vegetal nuevo e inducir el efecto morfológico en ellos mediante el balance de 6-BAP y ANA con 16 tratamientos (T) y cinco repeticiones por cada uno, donde T1 funcionó como control debido a la ausencia de RCV's (Cuadro 5).

**Cuadro 7.** Diseño para la respuesta morfológica *in vitro* de saramuyo.

Diseño Factorial de Bloques 4x4			Factor A:			
			Citocinina 6-BAP (mg/L)			
			0.00	1.00	2.50	5.00
Factor B:	Auxina	0.00	T1	T2	T3	T4
	ANA	0.10	T5	T6	T7	T8
	(mg/L)	0.25	T9	T10	T11	T12
		0.50	T13	T14	T15	T16

La respuesta morfológica se evaluó por medio del bloqueo del tipo de explante, hoja (1), nudo (2) y entrenudo (3), cada uno con 16 tratamientos. El explante se tomó como unidad experimental para evaluar la respuesta en función de la cantidad porcentual de brotes y/o embriones producidos, así como la de explantes con calogénesis. Los explantes fueron dispuestos en tubos de ensayo de manera que se tuvieron cinco repeticiones en función del tipo de explante (bloque) y 15 en función de la interacción

de los RCV's para cada tratamiento, con un total de 240 explantes que funcionaron como unidad experimental distribuidos en los tres bloques, cada uno con 80 unidades experimentales (Cuadro 6).

**Cuadro 8.** Disposición de explantes en el diseño morfogénico global.

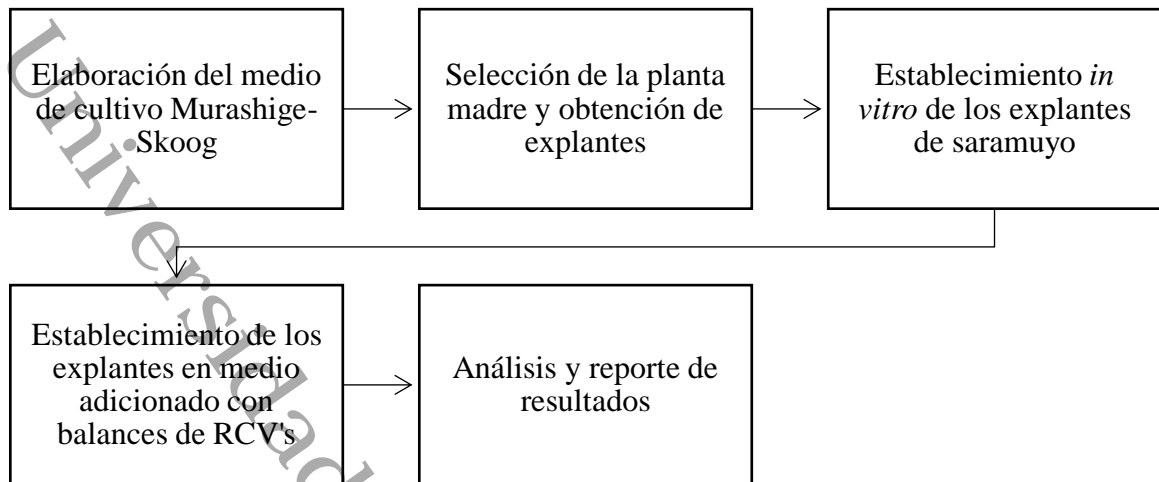
Diseño Factorial de Bloques 4x4	Factor B: ANA (mg/L)	Factor A: 6-BAP (mg/L)												TE	
		0.00			1.00			2.50			5.00				
		b	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2		3
	0.00	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	60
	0.10	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	60
	0.25	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	60
	0.50	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	60
	TEB	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	240
	TEG	60			60			60			60			240	

Los bloques (b) se presentan como 1) Nudo, 2) Entrenudo, 3) Hoja. El total de explantes por bloque (TEB) conforman en conjunto al total de explantes global (TEG), se observa que cada tratamiento tiene 15 repeticiones globales y 5 por bloque.

La respuesta morfogénica se evaluó en cada tratamientos y cada tipo de explante, donde en el caso de los tratamientos para el análisis global se utilizaron 15 repeticiones dentro de la interacción 6-BAP x ANA y para el análisis de bloques únicamente las cinco correspondientes al tipo de explante, este análisis fue realizado por el software SAS de escritorio versión 9.4 del año 2014 con un análisis de varianza (ANAVA) y la prueba de diferencia de mínima significativa de Fisher con  $\alpha \leq 0.05$ , para asegurar la normalidad de datos obtenidos para las variables de respuesta, las medias obtenidas se transformaron haciendo uso de  $arcsin\sqrt{x}$  para cada tipo de explante.

### 5.3. Flujograma del experimento

A continuación se presenta el diagrama de flujo de la metodología experimental utilizada en este trabajo (Figura 3).



**Figura 3.** Flujograma del experimento.

### 5.3.1. Elaboración del medio de cultivo MS

Se elaboró medio de cultivo MS (Murashige-Skoog) utilizando la formulación de sales, marca Caisson Labs® lote 01160021, adicionado con 30 g/L de sacarosa y 3.2 g/L de gelificante agar, y para el medio adicionado con las vitaminas del medio MS se utilizó la mezcla vitamínica de la misma marca con lote 02161019 en forma líquida con 1 mL/L. El análisis de descontaminación durante el establecimiento de los explantes *in vitro* no requirió la adición de RCV's, mientras que para el análisis del efecto morfogénico de los RCV sobre los explantes, el medio se adicionó con ANA y 6-BAP, el pH se ajustó a 5.7 con HCl y NaOH 1 N, utilizando un potenciómetro (Oakton® modelo PC 700). Los medios de cultivo y materiales utilizados fueron esterilizados en autoclave (1.5 PSI durante 20 minutos).

### 5.3.2. Colecta del material vegetal

La colecta se realizó utilizando tijeras comunes flameadas con etanol 70 %, realizando el corte a la altura del último nudo con apariencia juvenil (entre el tercero y séptimo hacia la base del brote) (Figura 4).





**Figura 4.** Selección y colecta de explantes.

Los explantes utilizados para este fin se obtuvieron de plantas selectas, con características sobresalientes, tales como el olor, color, sabor, aceptabilidad del mercado del fruto, su productividad y época de producción. Las plantas utilizadas tienen la particularidad de atemporalidad y florecen y fructifican durante el otoño.

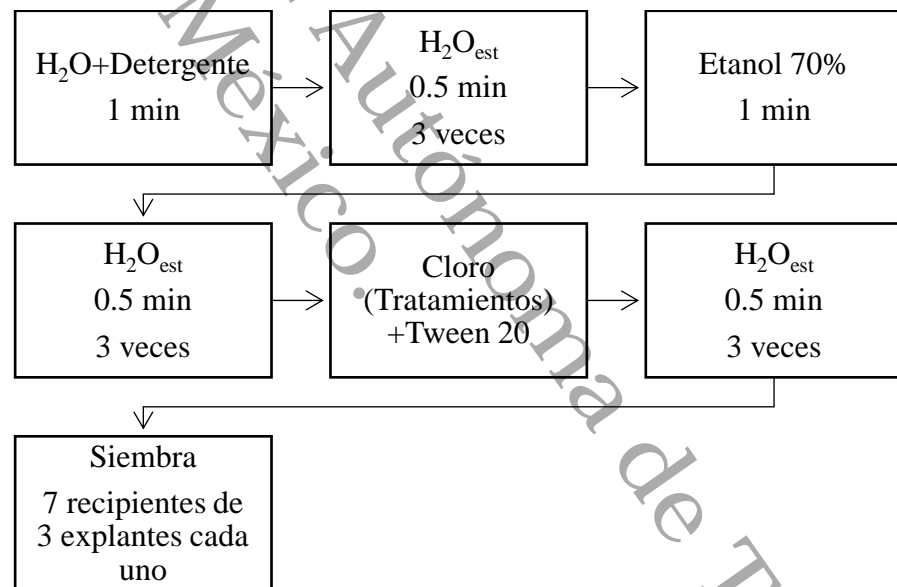
Los explantes de la primera etapa fueron colectados de plantas juveniles menores a 5 años, obtenidas de Yucatán, México, establecidas en invernaderos de la División Académica de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. Los explantes de la segunda etapa fueron colectados de campo del Instituto Tecnológico de Conkal, proporcionado por el M. C. Daniel Cituk Chan; y del Jardín Botánico Regional "Roger Orellana" del Centro de Investigación Científica de Yucatán, proporcionadas por la M. C. Clarisa Jiménez Bañuelos y el M. C. Miguel Herrera Alamillo, de esta manera se aseguró que la calidad del material vegetativo utilizado para el establecimiento y micropropagación fuese de interés.

Los explantes utilizados provinieron de los brotes de la temporada de agosto-diciembre 2022, con edad menor de un año y en estado vegetativo de crecimiento, caracterizados por un color verde más vigoroso que el del resto de la planta y apariencia lisa no muy

lignificada. Se utilizaron explantes con diámetro menor a 7 mm en el caso de nudos y entrenudos, para el caso de las hojas se utilizaron aquellas de 9.0 cm o menos, con color verde lima, sanas y en pleno desarrollo. Los explantes fueron manipulados dentro de una campana de flujo laminar y diseccionados en nudos, entrenudos y secciones de hojas de 1 cm de diámetro para cada tratamiento utilizando pinzas de disección y bisturi de mango No. 4 y puntas No. 22.

### 5.3.3. Establecimiento de los explantes

Los explantes colectados de la planta madre fueron desinfectados en el laboratorio de sanidad vegetal del CICA-DACA, vía una desinfección de contaminantes superficiales con H<sub>2</sub>O para eliminar trazas de polvo y otros agentes, posteriormente se siguió el protocolo de establecimiento (Figura 5) dentro de una campana de flujo laminar Nivel II.



**Figura 5.** Protocolo de establecimiento *in vitro* de explantes de saramuyo.

### 5.3.4. Evaluación de establecimiento *in vitro*

Las unidades experimentales fueron evaluadas durante cuatro semanas una vez por semana para determinar la presencia o ausencia de contaminación fúngica y/o

bacteriana expresada en el medio de cultivo y/o explantes. También se evaluó el porcentaje de supervivencia de los explantes por medio de la presencia o ausencia de necrosis causada por la oxidación en los mismos. Los datos se analizaron por medio de un ANVA y la prueba mínima significativa de Fisher (DMS) con  $\alpha \leq 0.05$  en el programa estadístico de escritorio SAS de escritorio versión 9.4 del año 2014.

### 5.3.5. Siembra de explantes en medio adicionado con RCV's

Los medios de cultivo adicionados con los RCV's ANA y 6-BAP (Cuadro 5) se utilizaron como medios de regeneración celular para inducir una respuesta morfogénica del explante, estos se sometieron al tratamiento de establecimiento con mejores resultados para cada tipo de explante, es decir, aquél que no presentó contaminación o presentó la contaminación mínima después de un mes de haber realizado la primera etapa del experimento en su establecimiento *in vitro* (Febrero-Junio 2022).

### 5.3.6. Modelo estadístico y análisis de resultados

El modelo estadístico de la primera etapa (establecimiento de los explantes) del experimento utilizó un DCA con arreglo factorial 4x4 para cada tipo de explante:

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} + \varepsilon_{ijk}$$

Donde:

**Y<sub>ijk</sub>**: Cada una de las observaciones en los i-j-ésimos en las k-ésimas repeticiones

**i**: Los 4 niveles del factor A (concentración de cloro)

**j**: Los 4 niveles del factor B (tiempo de exposición)

**k**: El número de repetición.

**μ**: La media general.

**α<sub>i</sub>**: El i-ésimo efecto del factor A.

**β<sub>j</sub>**: El j-ésimo efecto del factor B.

**(αβ)<sub>ij</sub>**: El i-j-ésimo efecto de la interacción de los factores concentración-tiempo de exposición.

**ε<sub>ijk</sub>**: El efecto del error aleatorio en el i-j-ésimo efecto de la k-ésima repetición.

El modelo estadístico de la segunda etapa (inducción de morfogénesis) del experimento utilizó un arreglo factorial 4x4 con diseño de bloques aleatorizados completamente:

$$Y_{ijkl} = \mu + \alpha_i + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} + \gamma_k + \varepsilon_{ijkl}$$

Donde:

$Y_{ijk}$ : Cada una de las observaciones en los i-j-ésimos tratamientos de los k-ésimos bloques y l-ésimas repeticiones

**i**: Los 4 niveles del factor A, la concentración de ANA

**j**: Los 4 niveles del factor B, la concentración de 6-BAP

**l**: Las tres repeticiones del experimento

**k**: El número de bloques, determinado por 3 tipos de explantes

$\mu$ : La media general

$\alpha_i$ : El i-ésimo efecto de las concentraciones de auxina

$\beta_j$ : El j-ésimo efecto de los tiempos de citocinina

$\alpha\beta_{ij}$ : El i-j-ésimo efecto de la interacción de los RCV's

$\gamma_k$ : El k-ésimo efecto del bloqueo al tipo de explante

$\varepsilon_{ijkl}$ : El efecto del error aleatorio en el i-j-ésimo efecto del k-ésimo bloque en la l-ésima repetición

Las hipótesis estadísticas de investigación para la etapa de establecimiento son:

$$\text{Factor A} = \left\{ \begin{array}{l} H_0: a_1 = a_2 = a_3 = a_4 \\ H_1: a_i \neq 0 \text{ para al menos un } i \end{array} \right\}$$

$$\text{Factor B} = \left\{ \begin{array}{l} H_0: b_1 = b_2 = b_3 = b_4 \\ H_1: b_j \neq 0 \text{ para al menos un } j \end{array} \right\}$$

*Interacción AxB*

$$= \left\{ \begin{array}{l} H_0: a_1b_1 = a_1b_2 = a_1b_3 = a_1b_4 = a_2b_1 = a_2b_2 = a_2b_3 = a_2b_4 \\ = a_3b_1 = a_3b_2 = a_3b_3 = a_3b_4 = a_4b_1 = a_4b_2 = a_4b_3 = a_4b_4 \\ H_1: b_j \neq 0 \text{ para al menos un } j \end{array} \right\}$$

Las hipótesis estadísticas de investigación para la etapa morfogénica son:

$$\text{Factor A} = \left\{ \begin{array}{l} H_0: a_1 = a_2 = a_3 = a_4 \\ H_1: a_i \neq 0 \text{ para al menos un } i \end{array} \right\}$$

$$\text{Factor B} = \left\{ \begin{array}{l} H_0: b_1 = b_2 = b_3 = b_4 \\ H_1: b_j \neq 0 \text{ para al menos un } j \end{array} \right\}$$

$$\text{Factor } \gamma = \left\{ \begin{array}{l} H_0: \gamma_1 = \gamma_2 = \gamma_3 \\ H_1: \gamma_k \neq 0 \text{ para al menos un } k \end{array} \right\}$$

*Interacción AxB*

$$= \left\{ \begin{array}{l} H_0: a_1b_1 = a_1b_2 = a_1b_3 = a_1b_4 = a_2b_1 = a_2b_2 = a_2b_3 = a_2b_4 \\ = a_3b_1 = a_3b_2 = a_3b_3 = a_3b_4 = a_4b_1 = a_4b_2 = a_4b_3 = a_4b_4 \\ H_1: a_ib_j \neq 0 \text{ para al menos un } i, j \end{array} \right\}$$

El análisis estadístico se realizó mediante el uso de análisis de varianza (ANAVA) realizado por el programa estadístico SAS para Windows, versión 4.9 del año 2014, donde también las medias fueron sometidas a una prueba de diferencia mínima significativa de Fisher con significancia del error de 5 % ( $\alpha \leq 0.05$ ).

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.1. Establecimiento *in vitro* de los explantes de saramuyo

El establecimiento de explantes presentó diferentes respuestas a los efectos de los factores individuales, tanto para la descontaminación de los explantes como para su supervivencia. Dicha respuesta puede abordarse desde diferentes puntos de vista de acuerdo a la interacción planta-microorganismo (Dutta et al., 2014), el tipo de explante (Dar et al., 2012) o bien, el agente desinfectante utilizado en forma de hipoclorito de sodio (Cloralex®) (Daud et al., 2012).

#### 6.1.1. Descontaminación de explantes

Para cada tipo de explante (hoja, nudo y entrenudos) se observó un efecto altamente significativo ( $p \leq 0.05$ ) para el factor de la concentración de hipoclorito de sodio ( $\text{NaClO}$ ) e interacción, mientras que el tiempo de exposición al hipoclorito de sodio presentó significancia ( $p \leq 0.05$ ) en hojas y entrenudos (Cuadro 7). Esto sugiere que, bajo las condiciones experimentales, la concentración de cloro utilizada es determinante para la eliminación de microorganismos en los explantes. Mientras que el tiempo es un factor de importancia para la descontaminación de los explantes de entrenudos y hojas, pero sin efectos significativos para el explante de nudos ( $p \leq 0.05$ ).

La contaminación del explante en el establecimiento *in vitro* es una problemática recurrente (Rojas-Idrogo et al., 2020). Especialmente al tratarse de especies leñosas o forestales (Hine-Gómez y Valverde-Cerdas, 2003).

**Cuadro 9.** Análisis de varianza del efecto del factor en la descontaminación de los explantes.

Descontaminación					
Efecto	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F	p	Significancia
Nudos					
NaClO	1.21296751	0.40432250	8.45	<.0001	**
Tiempo	0.34153015	0.11384338	2.38	0.0745	NS
Interacción	7.34044459	0.81560495	17.04	<.0001	**
Entrenudos					
NaClO	2.36974303	0.78991434	10.55	<.0001	**
Tiempo	0.84643389	0.28214463	3.77	0.0132	*
Interacción	4.75982884	0.52886987	7.06	<.0001	**
Hojas					
NaClO	0.89996612	0.29998871	7.91	<.0001	**
Tiempo	0.74454101	0.24818034	6.54	0.0005	**
Interacción	8.90180361	0.98908929	26.06	<.0001	**

Simbología: NS No significativa frente al P-valor>0.05; \* significancia estadística (Fisher p<0.05>0.01); y \*\* (Fisher p≤0.01).

En este experimento no hubo presencia de contaminación bacteriana, pero si se observó contaminación por hongos del género *Fusarium* spp. y *Aspergillus* spp. expresada después de los 10 días de establecer los explantes y siguió apareciendo indistintamente hasta la cuarta semana del experimento.

Pocos estudios de *Annona* spp. *in vitro* reportan los métodos de establecimiento utilizados para la descontaminación de los explantes, por lo que es común encontrar reportes de micropropagación que pasan directamente a los análisis morfogénicos. Sin embargo, para contrastar los resultados en la descontaminación de los explantes de saramuyo de este experimento se pueden utilizar algunos reportes dentro del género *Annona*. Por ejemplo, los resultados obtenidos para saramuyo difieren de los resultados obtenidos por García-Águila et al (2012), quienes evaluaron nudos de guanábana (*Annona muricata* L.) en los que no existió presencia de hongos y sí de bacterias durante los primeros 15 días de cultivo.

Ba et al (2021) por otro lado, reportaron contaminación de explantes nodales de *Annona senegalensis* (Pers.) desde el tercer día después del establecimiento, distinto a lo reportado para *Annona diversifolia* (Saff.) por Orantes-Ramos y López-Ventura (2019). Dichos autores no mencionan el inicio de la expresión de contaminantes pero indican su aparición hasta la quinta semana posterior al establecimiento, esta expresión tardía de contaminación suele atribuirse a microorganismos endófitos (Rojas-Idrogo et al., 2020).

La contaminación fúngica de los explantes de saramuyo establecidos para este experimento creció directamente del tejido utilizado, algo común cuando se trata de hongos endófitos que no pueden eliminarse completamente por un agente esterilizante, por lo que se requiere entonces, el uso de fungicidas sistémicos (Daud et al., 2012). Capaces de actuar en el interior del tejido vegetal utilizado como explante. Igualmente, la forma y fisiología de los explantes influyen en su respuesta a los efectos de los tratamientos, los tres explantes utilizados tuvieron diferentes tasas de contaminación de acuerdo con las medias obtenidas, los explantes que presentaron mayor dificultad para establecerse axénicamente fueron los entrenudos, seguidos por los nudos y las hojas (Figura 6).



**Figura 6.** Crecimiento de la contaminación fúngica en los tres tipos de explante de saramuyo utilizados.

Dar et al (2012) mencionan que, debido a su disposición física, el origen del peciolo y la continuación del tallo crean una forma en “V” de los nudos que crean una barrera capaz de contener microorganismos y protegerlos de las corrientes de agua durante la descontaminación, mientras que los entrenudos y hojas, al ser de superficies lisas y regulares son más sencillos de limpiar superficialmente. Al respecto, es importante resaltar que las hojas son explantes más delgados y menos lignificados que los nudos



y los entrenudos, lo cual también explica la alta mortalidad de estos frente a los nudos y los entrenudos por efecto de la clorosis.

Sin embargo, los resultados obtenidos en el presente estudio difieren a los resultados reportados por Dar et al (2012), pues para el caso de *Hibiscus rosa-cinensis* (L.) se reporta una diferencia del 3% entre el método más eficiente en la descontaminación, de nudos (100%) contra entrenudos (97%). En el presente estudio, con saramuyo, se tuvo una diferencia del 9.52% entre los métodos más eficientes para descontaminar entrenudos (90.48%) contra nudos (100%) (Dar et al., 2012).

Puede explicarse también desde un punto de vista sistémico, pues al tratarse de contaminación endófitas se deduce que la concentración del agente desinfectante utilizado, hipoclorito de sodio comercial (Cloralex®), no fue eficaz para eliminar las esporas del hongo contaminante presentes entre las células.

Resultados similares son reportados por Rojas-Idrogo et al (2020) en explantes (hojas, hojas con peciolo, peciolo, nudos y entrenudos) de dos especies de *Peperomia*, quienes documentaron mayor contaminación fúngica en los entrenudos que los nudos axenificados con hipoclorito de sodio (Cloralex®). Lo anterior, se puede explicar debido a la colonización del tipo de tejido por el micelio, pues los hongos endófitos pueden movilizarse tanto intercelularmente como intracelularmente entre los tejidos para colonizar una planta. En este sentido, la infección pudo darse de dos maneras, vía horizontal (reportado principalmente en árboles), cuando una planta huésped es infectada por su entorno (heridas, insectos o de una planta a otra por diseminación de esporas); o vía la vertical, que se da cuando el hongo se transmite a la descendencia de la planta huésped mediante la infección de los embriones dentro de las semillas, esto se da debido a que la infección con el hongo no es mortal para la planta y muchas veces, asintomática (Modi *et al.*, 2020).

Por otro lado, si se toma en cuenta la interacción planta-microorganismo en función del tejido usado, se sabe que existen microorganismos endófitos que colonizan las ramas de forma intercelular e intracelular. Por ejemplo, en el género *Fusarium*, *Fusarium moniliforme* en maíz, se puede encontrar intracelularmente en nudos e intercelularmente en raíces, entrenudos y hojas, lo que puede explicar el crecimiento fúngico en los explantes de hojas dado desde el sistema vascular (Dutta *et al.*, 2014).

Dar et al (2012) sugiere que el mayor foco de infección fúngica se da en el centro de los nudos, la colonización intercelular en otros sitios de la planta se debe al crecimiento hifal para llegar a nuevos puntos de colonización, aptos para invadir las células de los nudos, o bien, los frutos y semillas de la siguiente generación de plantas. Continuando con este planteamiento, el corte realizado para los nudos de este experimento generó menor posibilidad de contaminación, ya que al segmentar en forma de “Y” se conserva un foco de infección, aparentemente mejor axenificado respecto a los entrenudos.

En este experimento los entrenudos tuvieron mayor posibilidad de contaminación debido a que su segmentación incluyó la zona central de nudo superior e inferior del explante, y eliminó únicamente las yemas axilares, duplicando los focos potenciales de infección de los entrenudos frente a los que tuvieron los nudos. Por tanto, la recomendación para futuros experimentos sería realizar el corte de los entrenudos al menos unos 2 mm de distancia respecto a la zona central de los nudos.

#### **6.1.2. Supervivencia de explantes**

La respuesta obtenida en la supervivencia presentó diferencias altamente significantes para los tres tipos de explantes utilizados en este experimento. En este sentido, se obtuvo una supervivencia de 53.38%, 72.43% y 42.86% para los nudos, entrenudos y hojas respectivamente. De igual manera el efecto del cloro, el tiempo y la interacción de ambos factores representó una alta significancia en las respuestas del daño al explante y la supervivencia de los mismos (Cuadro 8).

**Cuadro 10.** Cuadro ANAVA del efecto del factor en la supervivencia de los explantes.

Supervivencia					
Efecto	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F	p	Significancia
Nudos					
NaClO	2.47572440	0.82524147	29.19	<.0001	**
Tiempo	1.67481818	0.55827273	19.75	<.0001	**
Interacción	1.07322580	0.11924731	4.22	0.0001	**
Entrenudos					
NaClO	4.12437818	1.37479273	29.82	<.0001	**
Tiempo	1.66550731	0.55516910	12.04	<.0001	**
Interacción	2.43570204	0.27063356	5.87	<.0001	**
Hojas					
NaClO	7.80822241	2.60274080	56.97	<.0001	**
Tiempo	3.32888223	1.10962741	24.29	<.0001	**
Interacción	14.27442214	1.58604690	34.71	<.0001	**

Simbología: NS No significativa frente a Fisher  $p > 0.05$ ; \* significancia estadística (Fisher  $p < 0.05 > 0.01$ ); y \*\* (Fisher  $p \leq 0.01$ ).

Los resultados del daño por clorosis o supervivencia de explantes con respecto a la interacción tiempo-hipoclorito de sodio concuerdan con la respuesta reportada en explantes (ápices y nudos) de guanábana (Ramírez-Villalobos et al 2002). Al respecto, conforme aumenta la concentración y el tiempo de exposición al agente axenificante se incrementa el daño. Por lo tanto, en el presente estudio el T1 (2.5% de NaClO por 5 min) obtuvo el menor daño por el agente axenificante, mientras que el T16 (10% de NaClO por 20 min) mostró el mayor daño.

De esta forma, para los nudos se documentó un rango de daño desde 33.33%, para el T1, y hasta 95.24% para el T16; para entrenudos se registró un daño de 14.29% para T1, mientras el T16 causó 95.24% de daño. Finalmente, en hojas el daño osciló entre 0% (registrado en T1) a 100% (causado por T16). Asimismo, se observó una diferencia entre el menor y mayor daño del 61.91% en nudos; 80.95% en entrenudos y 100% en hojas.

La supervivencia de los explantes depende del daño recibido y la respuesta oxidativa del tejido, activando enzimas como tirosinasas y polifenoxidasas que actúan sobre tirosinas y polifenoles oxidándolos hasta quinonas, sustancias fitotóxicas capaces de polimerizarse y afectar proteínas que inhiban su metabolismo y les generen un ennegrecimiento progresivo (Orantes-Ramos y López-Ventura, 2019). Sin embargo, el daño en el explante no es lo mismo que necrosis, pues en explantes nodales de *Annona muricata* (L.) se ha reportado la brotación *in vitro* de yemas axilares a pesar del daño recibido por el método de establecimiento (García-Águila *et al.*, 2012).

### 6.1.3. Selección del protocolo de establecimiento

La selección del protocolo de establecimiento se determinó para cada tipo de explante a través de los tratamientos con mayor descontaminación y menor daño en cada tipo de tejido o explante (Cuadro 9).

**Cuadro 11.** Respuesta de los explantes a los tratamientos utilizados.

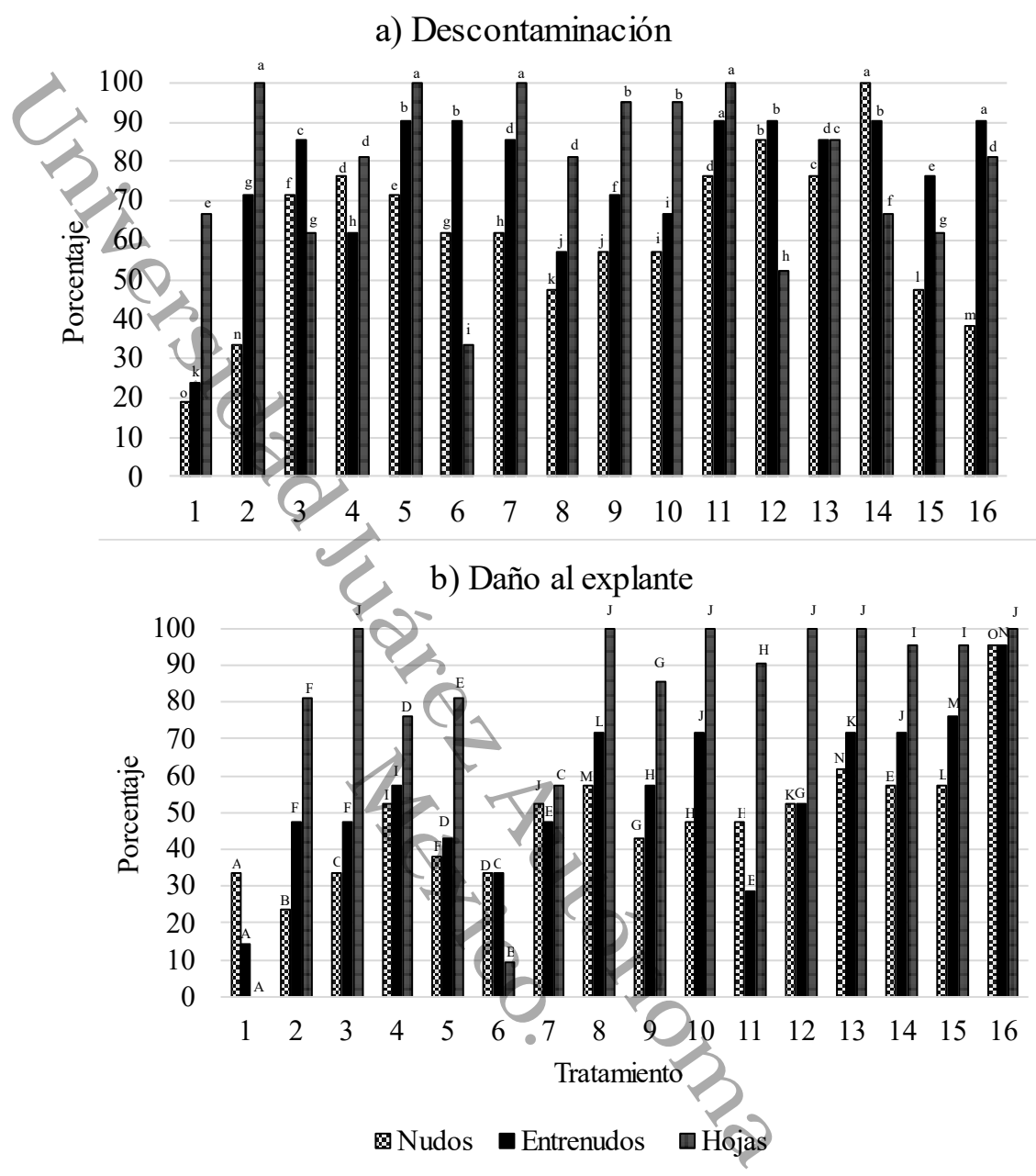
Tratamiento	Descontaminación			Daño al explante		
	Nudos	Entrenudos	Hojas	Nudos	Entrenudos	Hojas
T1	19.1 o	23.8 k	66.7 e	33.3 a	14.3 a	0.0 a
T2	33.3 n	71.4 g	100.0 a	23.8 b	47.6 f	81.0 f
T3	71.4 f	85.7 c	61.9 g	33.3 c	47.6 f	100.0 j
T4	76.2 d	61.9 h	81.0 d	52.4 i	57.1 i	76.2 d
T5	71.4 e	90.5 b	100.0 a	38.1 f	42.9 d	81.0 e
T6	61.9 g	90.5 b	33.3 i	33.0 d	33.3 c	52.4 b
T7	61.9 h	85.7 d	100.0 a	52.4 j	47.6 e	57.1 c
T8	47.6 k	57.1 j	81.0 d	57.1 m	71.4 l	100.0 j
T9	57.1 j	71.4 f	95.2 b	42.9 g	57.1 h	85.7 g
T10	57.1 i	57.1 i	95.2 b	47.6 h	71.4 j	100.0 j
T11	76.2 d	90.5 a	100.0 a	47.6 h	28.6 b	90.5 h
T12	85.7 b	90.5 b	52.4 h	52.4 k	52.4 g	100.0 j
T13	81.0 c	85.7 d	85.7 c	61.9 n	71.4 k	100.0 j
T14	100.0 a	90.5 b	66.7 f	47.6 e	71.4 j	95.2 i
T15	52.4 l	76.2 e	61.9 g	57.1 l	76.2 m	95.2 i
T16	38.1 m	90.5 a	81.0 d	95.2 o	95.2 n	100.0 j

Las literales distintas entre columnas demuestran la diferencia estadística (Fisher,  $p \leq 0.05$ ) en los tratamientos para cada tipo de explante.

Nudos: En nudos T14 (5.0% NaClO-20 min) presentó 100% de descontaminación, y 47.62% de daño a los explantes, este tratamiento utiliza el mismo porcentaje de hipoclorito de sodio y el doble de tiempo que lo reportado para segmentos nodales de guanábana en su mejor tratamiento cuya contaminación fue superior del 60% y la supervivencia del 30% (Quezada y Ayra, 2020).

Entrenudos: T11 (7.5% NaClO-15 min) tuvo un éxito de descontaminación del 90.48% con únicamente 28.57 % de daño al explante. Hasta el momento no hay reportes de la contaminación del establecimiento *in vitro* de entrenudos de *Annona squamosa* (L.), sin embargo, se han obtenido resultados exitosos para otras especies de *Annona* en la etapa morfogénica (Lemos y Blake, 1996; Rasai *et al.*, 1995). Los resultados respecto al menor daño del explante frente a los nudos difiere de lo reportado para entrenudos de *Hibiscus rosasiensis*, donde la mejor relación descontaminación-supervivencia fue de 10% de hipoclorito de sodio durante 15 minutos. Igualmente, el uso de entrenudos en cultivo *in vitro* de otras especies ha sido ampliamente reportado, por ejemplo *Strongolydon macrobotrys* (Rosenberg *et al.*, 1953), *Peperomia albobittata* y *P. galioides* (Rojas-Idrogo *et al.*, 2020) y *Solanum chaucha* (Gozalo-Vásquez y Díaz-Pillasca, 2022).

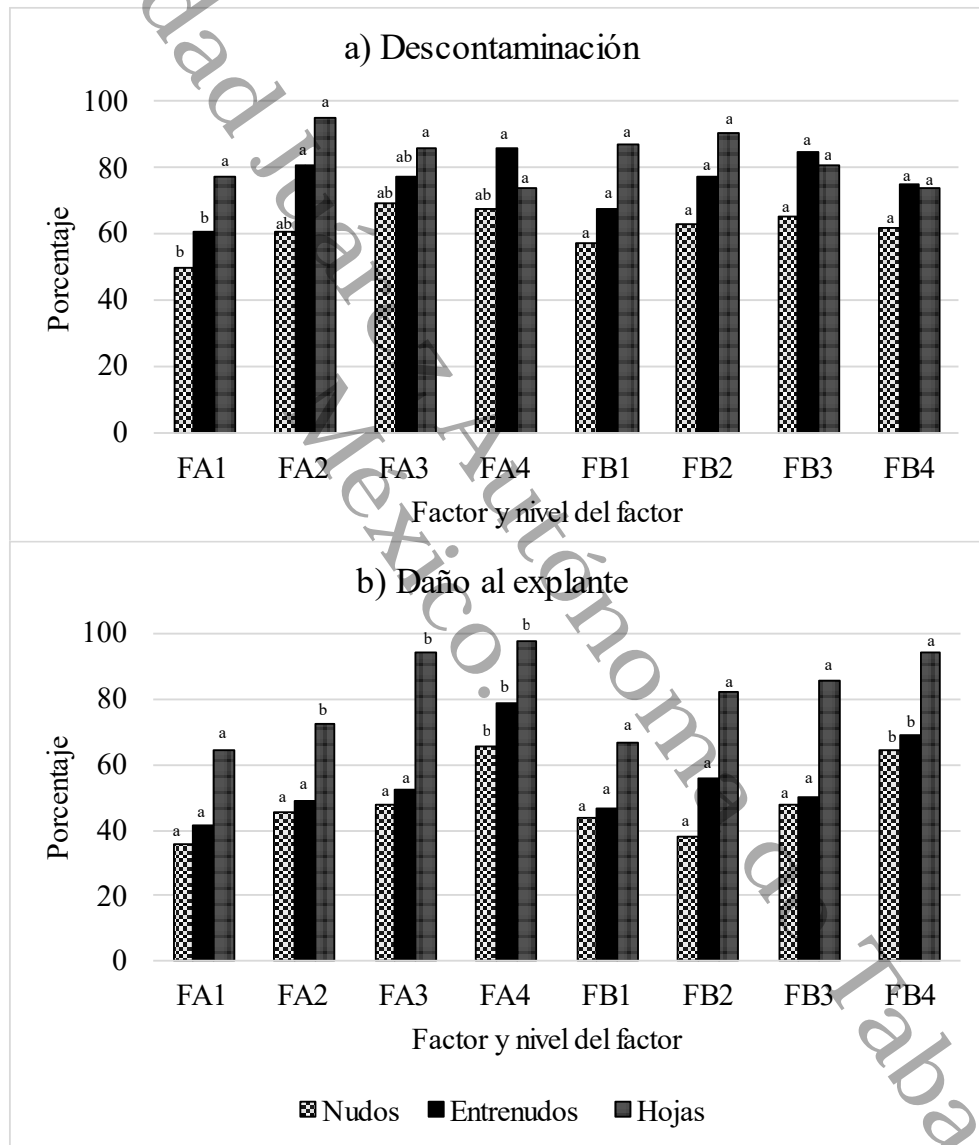
Hojas: Para hojas el T7 (5.0% NaClO-10 min) con 100% de descontaminación y un daño al explante del 57.14% en algunas secciones de las hojas, sin necrosar al tejido, siendo así el tipo de explante que presentó la mayor tasa de éxito, seguido por nudos y entrenudos, al mismo tiempo, presentaron el mayor daño recibido por el hipoclorito de sodio, seguido por los entrenudos y nudos (Figura 7).



**Figura 7.** Histogramas de medias totales de a) descontaminación y b) daño al explante por tratamiento. Las literales indican respuestas a los tratamientos estadísticamente distintos (Fisher,  $p \leq 0.05$ ) entre los mismos tipos de explante.

### 6.1.4. Efecto factorial sobre el establecimiento *in vitro* de saramuyo

El análisis factorial en cada factor evaluado de forma individual sobre cada tipo de explante mostró diferencias estadísticas significativas entre los factores involucrados en el análisis con valor Fisher  $p \leq 0.05$  (Figura 8).



**Figura 8.** Histogramas de la respuesta frente a los factores por tipo explante en a) Descontaminación y b) Daño al explante. Las literales indican diferencias estadísticas entre los mismos tipos de explante. FA= Concentración de NaClO; FB=Tiempo, los números 1-4 representan los niveles de cada factor.

La diferencia entre medias sobre los explantes de nudos y entrenudos se distribuyeron en dos niveles de significancia, mientras que las hojas no tuvieron diferencia, pues ambos factores influyeron con igual significancia en el establecimiento *in vitro* de los explantes tanto para la respuesta a la contaminación del tejido establecido como el daño provocado en los mismos (Cuadro 10).

**Cuadro 12.** Efecto de los factores en el establecimiento *in vitro* de saramuyo.

Tratamiento	Descontaminación			Daño al explante		
	Nudos	Entrenudos	Hojas	Nudos	Entrenudos	Hojas
Factor A 2.5%	50.0 b	60.7 b	77.4 a	35.7 a	41.7 a	64.3 a
Factor A 5.0%	60.7 ab	81.0 a	95.2 a	45.2 a	48.8 a	72.7 b
Factor A 7.5%	69.1 ab	77.4 ab	85.7 a	47.6 a	52.4 a	94.1 b
Factor A 10.0%	67.9 ab	85.7 a	73.8 a	65.5 b	78.6 b	97.6 b
Factor B 5 min	57.1 a	67.9 a	86.9 a	44.1 a	46.4 a	66.7 a
Factor B 10 min	63.1 a	77.4 a	90.5 a	38.1 a	56.0 a	82.1 a
Factor B 15 min	65.5 a	84.5 a	81.0 a	47.6 a	50.0 a	85.7 a
Factor B 20 min	61.9 a	75.0 a	73.8 a	64.3 b	69.1 b	94.1 a

Las literales distintas entre columnas demuestran la diferencia estadística (Fisher,  $p \leq 0.05$ ) entre tratamientos para cada tipo de explante.

Con los resultados obtenidos y la diferencia encontrada entre los tratamientos, fue posible realizar un análisis de correlación de Pearson para identificar el factor determinante para las variables de respuesta (Cuadro 11).

**Cuadro 13.** Correlación de factores del experimento sobre los explantes *in vitro*.

	Factor: Tiempo			Factor: Concentración NaClO		
	N	E	H	N	E	H
Descontaminación	-0.1273	0.1612	-0.8718	0.3203	0.3296	0.0002
	0.3937	0.2739	<0.0001**	0.0282*	0.0222*	0.9988
Daño	0.2181	0.3468	-0.0484	0.5029	0.5429	-0.2758
	0.1408	0.0158*	0.7465	0.0003**	<0.0001**	0.0606

Simbología: N: Nudo; E: Entrenudo, H: Hoja. \*significancia estadística alta (Fisher  $p < 0.05 > 0.01$ ); y \*\*significancia estadística muy alta (Fisher  $p \leq 0.01$ ).



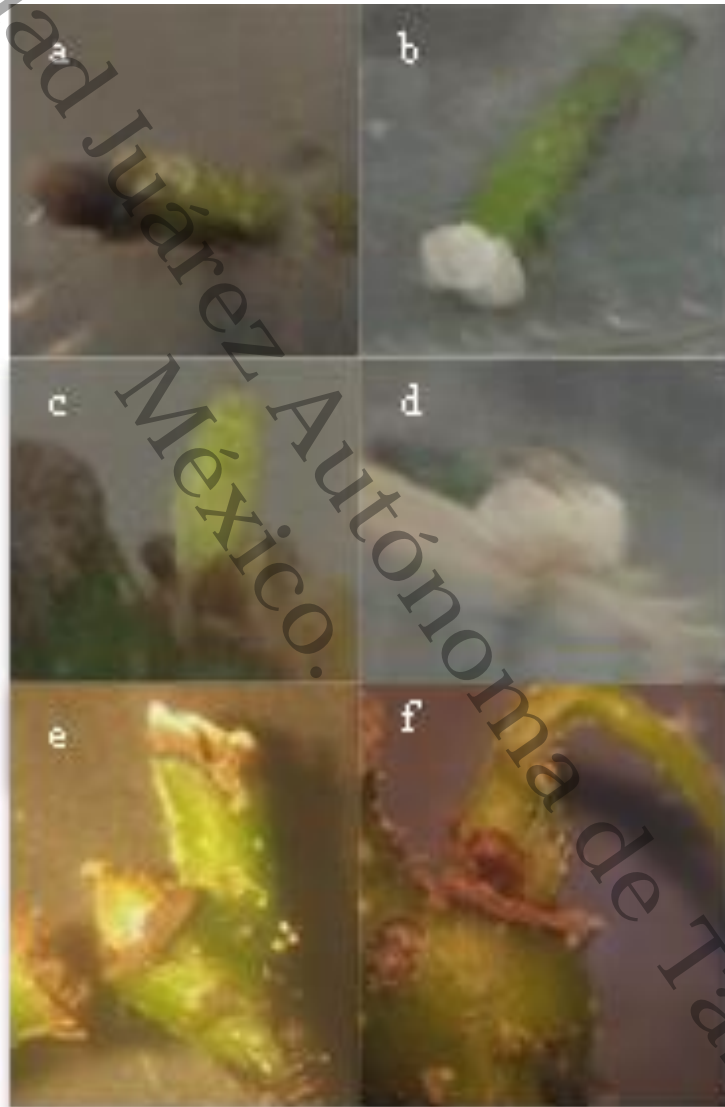
Para el caso de los nudos, se observó una correlación negativa en el tiempo frente a la descontaminación de los explantes (-0.1273), al tiempo en el que no representa significancia estadística (0.3937). Posee también una correlación moderadamente positiva ante la respuesta del explante en el daño generado (0.2181), sin embargo, sin presentar significancia estadística relevante (0.1408). Por otro lado, el factor de la concentración de NaClO para nudos sí representa significancia para ambas respuestas, teniendo así una correlación baja (0.3203) en el efecto de la concentración de NaClO para la descontaminación con significancia alta (0.0282); y correlación moderada (0.5029) con muy alta significancia (0.0003) en el daño ocasionado al tejido de los nudos.

Para entrenudos, se observó una correlación positiva y muy baja (0.1612) en el tiempo frente a la descontaminación de los explantes sin ser estadísticamente significativa (0.2739). Para el factor de la concentración de NaClO en entrenudos, sin embargo, se presentó una correlación positiva baja (0.32396) de alta significancia (0.0222) respecto a la descontaminación; y correlación moderada positivamente (0.5429) en el daño al explante en forma de entrenudos con muy alta significancia estadística ( $<0.0001$ ).

Finalmente, el establecimiento de hojas presentó diferencias ante el establecimiento de los dos tipos de explantes anteriores, posiblemente debido a la naturaleza no lignificada de este explante, pues el factor tiempo en la descontaminación presentó una correlación negativa muy alta en el tiempo (-0.8718) donde demostró una muy alta significancia estadística ( $<0.0001$ ) dentro del experimento y las condiciones utilizadas, respecto al daño del explante, el factor tiempo también tuvo una correlación negativa moderada (-0.0484) sin poseer significancia estadística (0.7465). Por otro lado, el factor de la concentración de NaClO en la introducción de hojas *in vitro* no demostró ser determinante para este tipo de explantes, pues obtuvo una correlación positiva muy baja en la descontaminación (0.00023) sin significancia estadística (0.9988), mientras que respecto al daño presentó una correlación moderada (0.2758), también sin presentar una significancia estadística de interés (0.0606).

## 6.2. Balance de auxinas y citocininas sobre la respuesta morfogénica *in vitro* de los explantes de saramuyo

Durante el análisis de esta etapa la morfogénesis fue una respuesta no considerada durante la primera etapa del experimento (establecimiento), sin embargo, se presentó en los explantes juveniles (Figura 9) introducidos aún sin añadir RCV's exógenos al medio y con una concentración iónica del 50% total del medio MS.



**Figura 9.** Morfogénesis en explantes juveniles. a, b, y d muestran callogénesis, c, e y f muestran brotes.

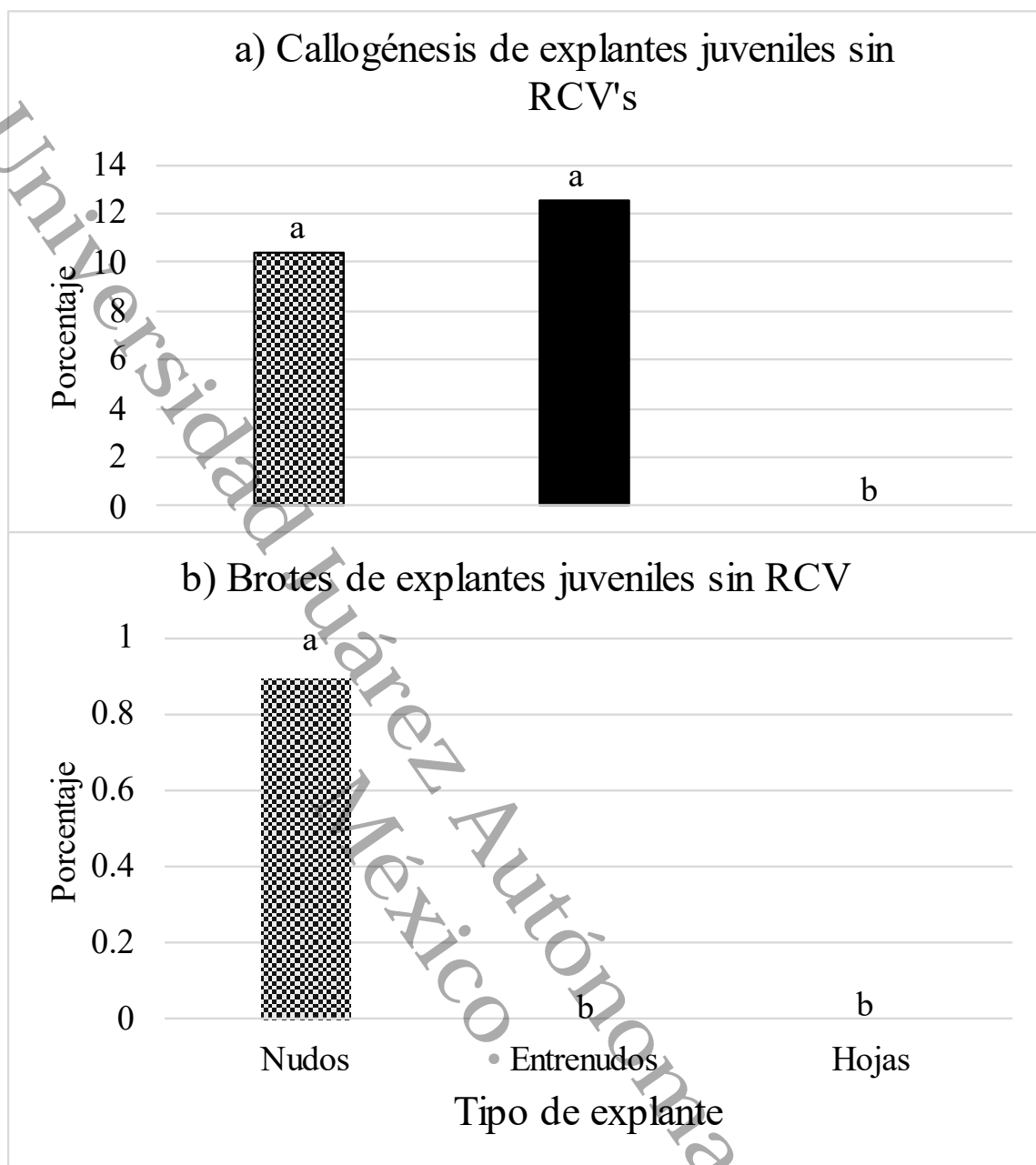
Esta respuesta fue evaluada en función del efecto de los factores (explante, cloro, tiempo) y tratamiento ante la respuesta en forma de callos y brotes morfogénicos, omitiendo embriones debido a la ausencia de los mismos, evaluados a la cuarta semana del establecimiento de los explantes (Cuadro 12).

**Cuadro 14.** ANAVA de la morfogénesis de explantes juveniles durante la etapa de establecimiento sin reguladores exógenos y con medio de cultivo MS al 50% de concentración.

Morfogénesis en explantes juveniles					
Efecto	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F	p	Significancia
Callos					
Explante	3.39729825	1.69864912	32.13	<.0001	**
NaClO	0.28063290	0.09354430	1.77	0.1529	NS
Tiempo	0.44486374	0.14828791	2.80	0.0399	*
Interacción	1.77964100	0.19773789	3.74	0.0002	**
Brotes					
Explante	0.02029368	0.01014684	3.15	0.0444	*
NaClO	0.01240169	0.00413390	1.28	0.2808	NS
Tiempo	0.03044051	0.01014684	3.15	0.0254	*
Interacción	0.03720507	0.00413390	1.28	0.2460	NS

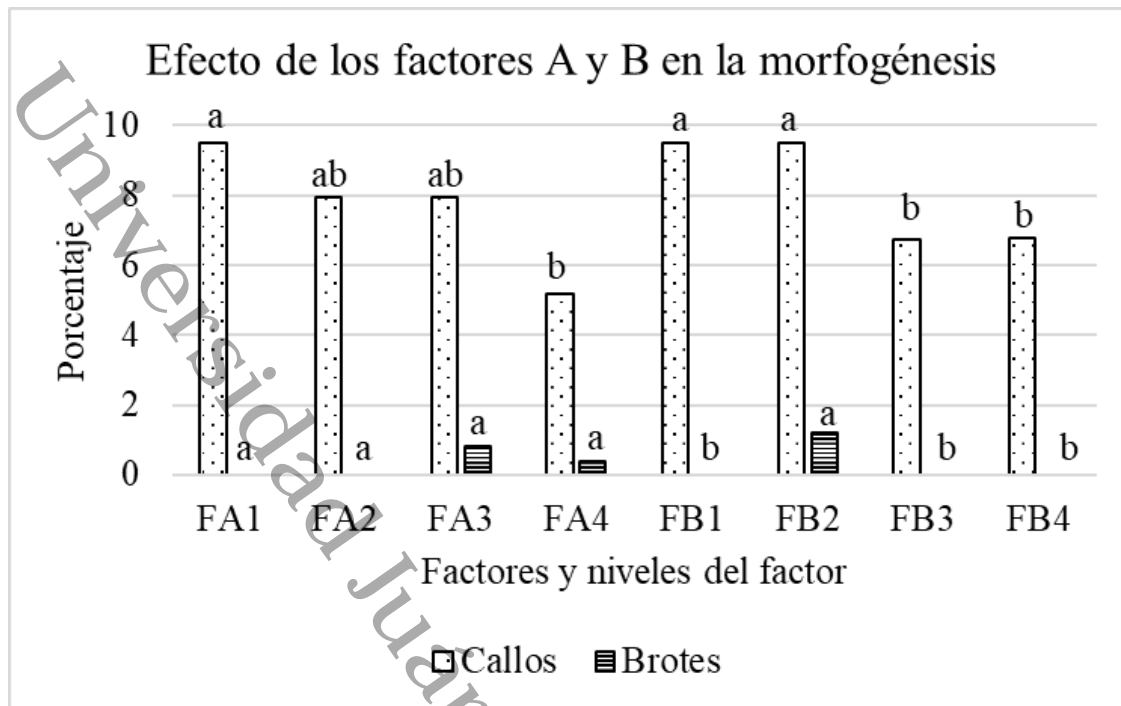
Simbología: NS No significativa frente a Fisher  $p > 0.05$ ; \* significancia estadística alta (Fisher  $p < 0.05 > 0.01$ ); y \*\* (Fisher  $p \leq 0.01$ ).

Los resultados obtenidos, de acuerdo al ANAVA, el tipo de explante fue estadísticamente significativo cuando se obtuvo la respuesta morfogénica con las condiciones de este experimento (Figura 10), así mismo, el tratamiento utilizado.



**Figura 10.** Porcentaje de morfogénesis de acuerdo con el explante en MS al 50% de concentración iónica sin RCV's en forma de: a) Callos, y b) Brotos.

Para ambos casos, tanto brotes (organogénesis directa) como callos (calogénesis), la concentración de cloro no fue un efecto significativo, no siendo así el caso del tiempo, que presentó diferencia estadística en ambos tipos de morfogénesis (Figura 11).



**Figura 11.** Efecto de los factores A (Concentración de NaClO) y B (Tiempo de exposición) sobre la respuesta morfológica total de los explantes juveniles de saramuyo.

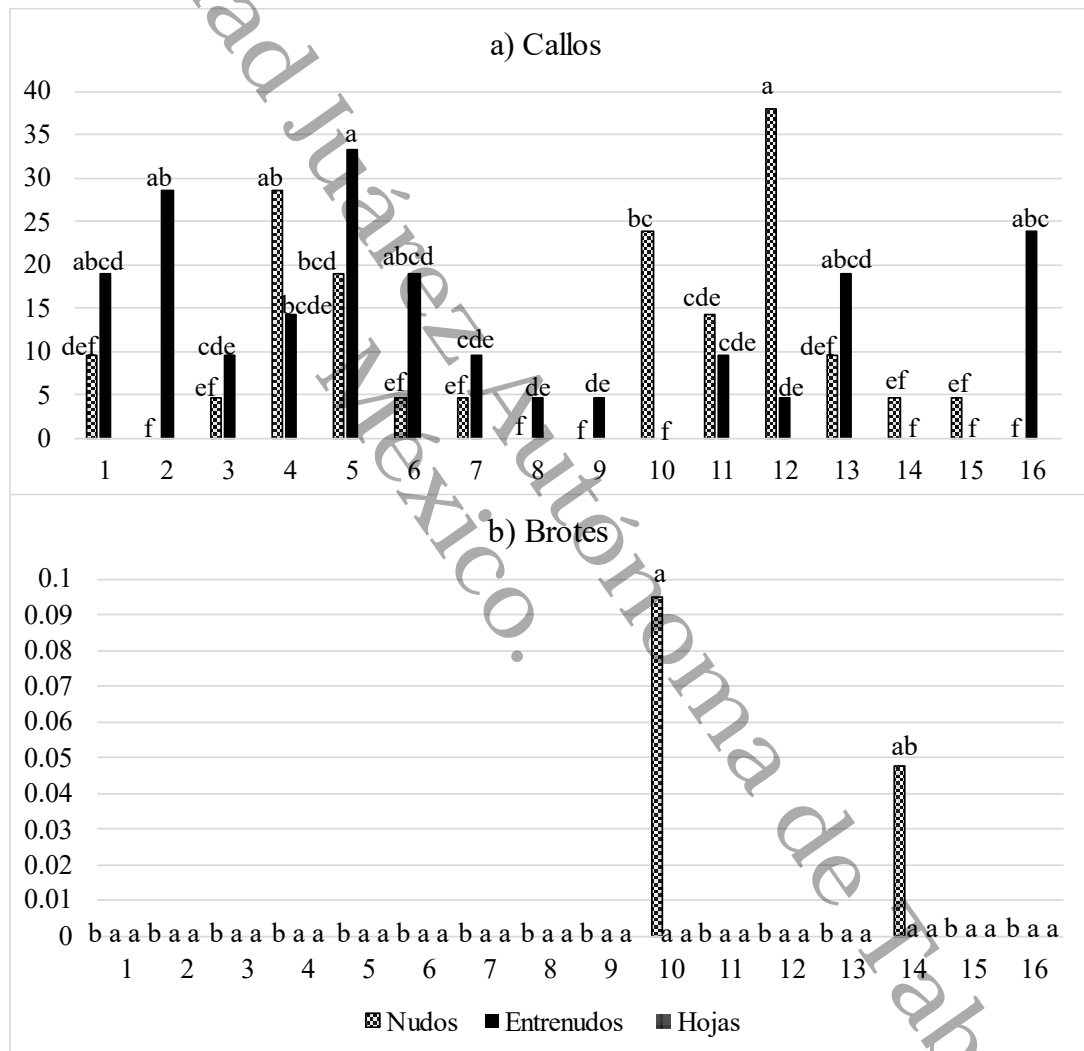
Siendo además que la respuesta presentada anteriormente (Figura 7 y Figura 8) fue apenas alrededor del 10% de los explantes, observados desde un punto de vista global del experimento, sin embargo, la respuesta morfológica en las condiciones experimentales se vio influenciada en mayor magnitud por el efecto de los tratamientos, con el valor máximo de respuesta en un 38.1% de calogénesis obtenida en el T12 nudos y morfogénesis directa en forma de brotes a partir de este mismo tipo de explante (nudos) en dos de dieciséis, a la vez, se obtuvo calogénesis con mayor frecuencia en los tratamientos realizados para entrenudos, con respuesta calogénica en trece de los dieciséis tratamientos (Cuadro 13).

**Cuadro 15.** Porcentaje morfogénico por tratamiento.

Tratamiento	Callogénesis			Organogénesis (brotes)		
	Nudos	Entrenudos	Hojas	Nudos	Entrenudos	Hojas
T1	9.5 def	19.1 abcd	0.0 a	0.0 b	0.0 a	0.0a
T2	0.0 f	28.6 ab	0.0 a	0.0 b	0.0 a	0.0 a
T3	4.8 ef	9.5 cde	0.0 a	0.0 b	0.0 a	0.0 a
T4	28.6 ab	14.3 cde	0.0 a	0.0 b	0.0 a	0.0 a
T5	19.1 bcd	33.3 a	0.0 a	0.0 b	0.0 a	0.0 a
T6	4.8 ef	19.1 abcd	0.0 a	0.0 b	0.0 a	0.0 a
T7	4.8 ef	9.5 cde	0.0 a	0.0 b	0.0 a	0.0 a
T8	0.0 f	4.8 de	0.0 a	0.0 b	0.0 a	0.0 a
T9	0.0 f	4.8 de	0.0 a	0.0 b	0.0 a	0.0 a
T10	23.8 bc	0.0 f	0.0 a	9.5 a	0.0 a	0.0 a
T11	14.3 cde	9.5 cde	0.0 a	0.0 b	0.0 a	0.0 a
T12	38.1 a	4.8 de	0.0 a	0.0 b	0.0 a	0.0 a
T13	9.5 def	19.1 abcd	0.0 a	0.0 b	0.0 a	0.0 a
T14	4.8 ef	0.0 f	0.0 a	4.7 ab	0.0 a	0.0 a
T15	4.8 ef	0.0 f	0.0 a	0.0 b	0.0 a	0.0 a
T16	0.0 f	23.8 abc	0.0 a	0.0 b	0.0 a	0.0 a

Las literales distintas demuestran la diferencia estadística (Fisher,  $p \leq 0.05$ ) entre tratamientos para cada tipo de explante.

Las hojas no presentaron respuesta morfogénica en esta etapa lo cual puede atribuirse a la actividad vegetativa y contenido endógeno de RCV's en los explantes y la ausencia de RCV's en el medio. Cabe resaltar que nudos y entrenudos presentaron callogénesis de manera diferencial entre tratamientos, mientras que la morfogénesis directa en forma de brotes solo fue observada en nudos, aunado a lo anterior, los brotes únicamente se presentaron en los tratamientos 10 y 14 de los nudos, con una incidencia menor al 1% (Figura 12).



**Figura 12.** Efecto de los tratamientos en el porcentaje de morfogénesis en forma de a) Callos y b) Brotes en cada tipo de explante. 1-16 representan el Tratamiento.

Esta respuesta puede atribuirse al estrés abiótico causado por la abrasión del NaClO sobre los explantes, aunado a su estado vegetativo y el contenido endógeno de RCV's en nudos y entrenudos, encargados de transportar los mismos hacia el ápice en desarrollo desde el sistema vascular de los tallos de saramuyo en las plantas madre (Li *et al.*, 2021). A la vez, las hojas tendrían menor concentración de RCV's debido a su diferenciación, priorizando un mayor contenido de nutrientes dirigidos de la misma forma a los tallos para su transporte a la planta y al ápice meristemático (Agudelo-Morales *et al.*, 2021; Méndez-Hernández *et al.*, 2019).

La formación de callos en los entrenudos, posiblemente causados como método de cicatrización, al igual que los callos formados en los nudos, formados en los extremos del corte del tallo, mientras que los brotes generados en los nudos surgieron de los cortes en el peciolo, de la misma manera, puede deberse a la vascularización y transporte de los explantes al ápice más cercano de los nudos, donde se encontraban las hojas, por tanto, la cicatrización de la herida en el corte detendría el flujo de RCV's que sería redirigidos hacia el sistema vascular del ápice de la hoja en el peciolo seccionado o la yema axilar (García-Águila *et al.*, 2012).

Los resultados del presente trabajo, en la primera etapa, no pudieron replicarse con plantas adultas para la segunda etapa en el Laboratorio de Propagación Clonal del CICY, Mérida, Yucatán, ya que los explantes presentaron callogénesis en menor medida, los explantes presentaron exudados durante las evaluaciones hasta las cuatro semanas; los exudados pueden atribuirse al estrés de los explantes, así como a la presencia de auxinas tanto del explante como del medio de cultivo, pues estos RCV's fomentan la exudación de compuestos en plantas leñosas e inhibe los brotes laterales y de raíces (Agudelo-Morales *et al.*, 2021).

El efecto individual de los RCV's en el medio de cultivo no fue significativo en explantes adultos, por otro lado, sus interacciones o los tratamientos (mostrados en el Cuadro 6), generan un efecto altamente significativo, así como un efecto significativo proveniente del tipo de explante utilizado (Cuadro 14), estos resultados implican un rechazo de la hipótesis propuesta bajo las condiciones del experimento debido a la obtención de solo un tipo de morfogénesis.

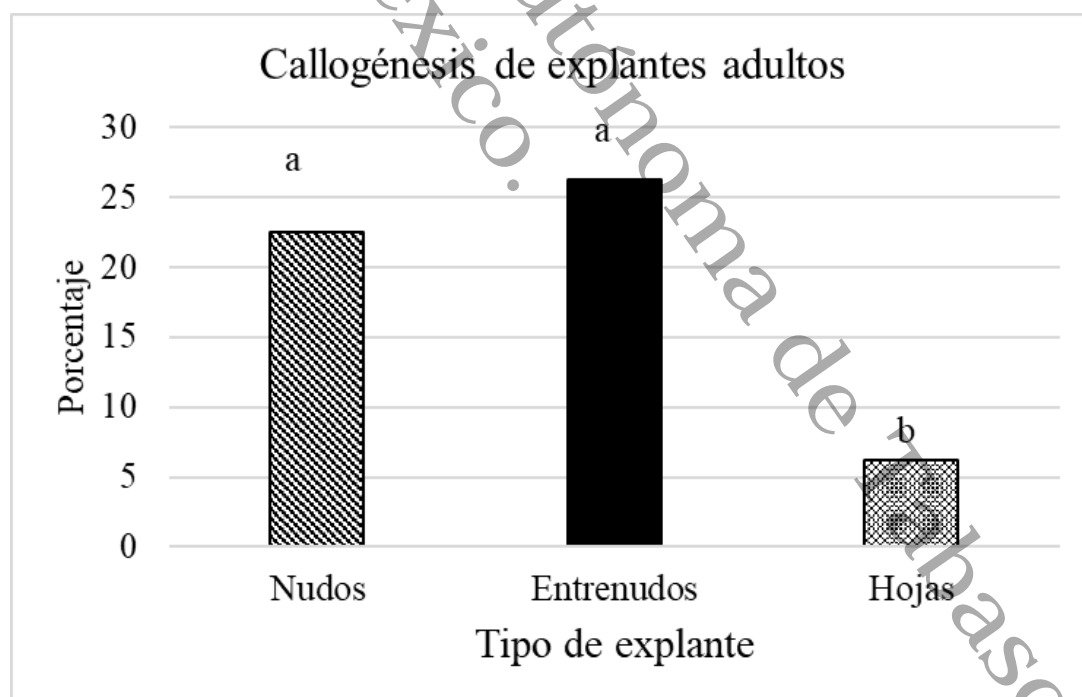


**Cuadro 16.** ANAVA de la etapa 2; para la evaluación del efecto de los RCV y explantes en la respuesta morfológica in vitro de saramuyo.

Morfogénesis en explantes adultos					
Efecto	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F	p	Significancia
Callos					
6-BAP (CK)	0.03333333	0.01111111	0.10	0.9607	NS
ANA (AX)	0.23333333	0.07777778	0.69	0.5589	NS
Explante	1.80833333	0.90416667	8.02	0.004	**
CK x AX	5.40000000	0.36000000	3.19	<.0001	**

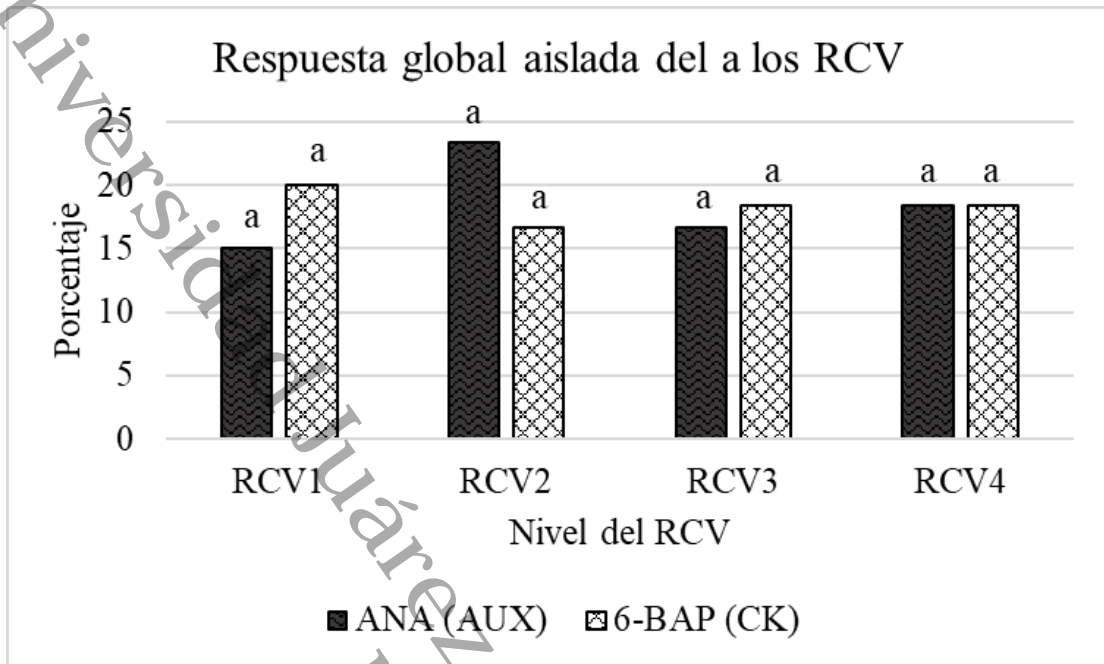
Simbología: NS No significativa frente a Fisher  $p > 0.05$ ; \* significancia estadística alta (Fisher  $p < 0.05 > 0.01$ ); y \*\* (Fisher  $p \leq 0.01$ ).

Los explantes obtenidos de plantas adultas respondieron a los balances de RCV utilizados en forma de callos (Figura 13) y exudados, este último se tomó en cuenta como una de las variables de respuesta propuestas debido a no ser una respuesta morfológica sino una generada por estrés.



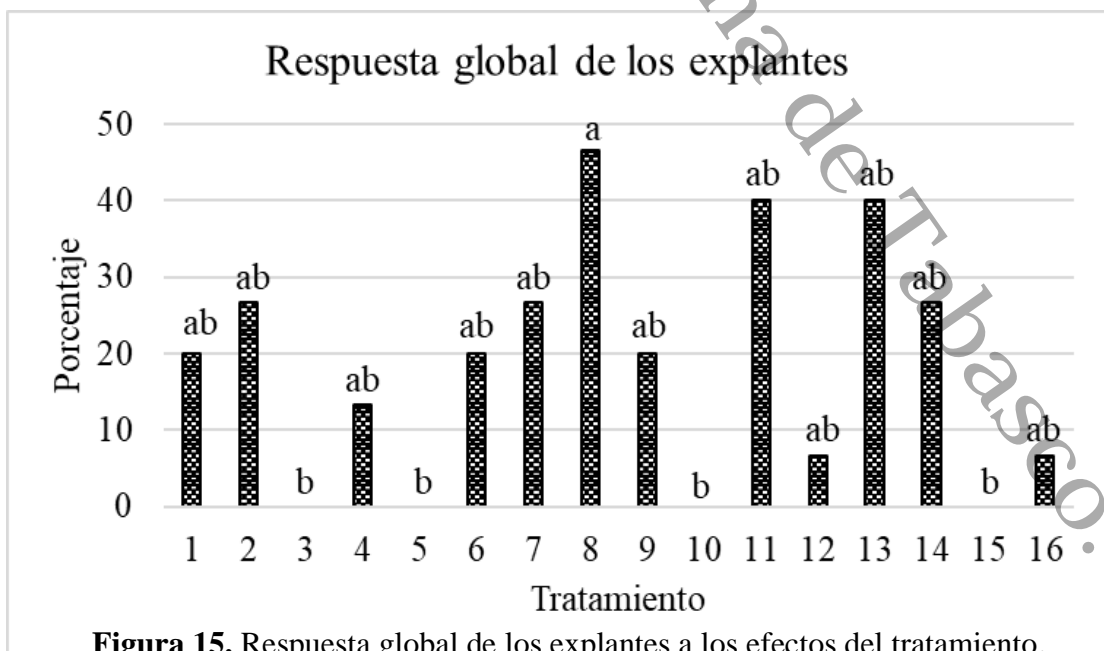
**Figura 13.** Efecto del tipo de explante en la callogénesis obtenida de explantes adultos.

El efecto de los RCV's de manera individual tuvo una respuesta por debajo del 30% de los explantes en los cuatro niveles utilizados en el experimento, sin diferencias estadísticamente significativas (Figura 14).



**Figura 14.** Respuesta global de explantes adultos a los niveles de RCV's.

Para estos resultados, el porcentaje de respuesta de los explantes a los tratamientos fue inferior del 50% con el tratamiento 8 (10% NaClO-20 min), compuesto por una concentración en balance de RCV's de 5.0 mg/L de 6-BAP y 0.1 mg/L de ANA, como el tratamiento de mayor respuesta morfogénica global (Figura 15).



**Figura 15.** Respuesta global de los explantes a los efectos del tratamiento.

Al analizar individualmente cada tipo de explante (Cuadro 15), se tuvo que el efecto de ANA representó una alta significancia estadística, de 0.0202 en nudos, 0.040 en entrenudos y 0.037 en hojas, asimismo, el balance en conjunto a 6-BAP de los tratamientos implica un efecto estadístico significativo para el caso de los nudos (0.001), lo que concuerda con el efecto de las citocininas en la morfogénesis obtenida por Gupta et al (1984) con explantes de saramuyo en medio adicionado por citocininas en concentraciones de 6-BAP 0.5 mg/L y 6-BAP 0.5mg/L+Kinetina 0.5mg/L frente a los resultados obtenidos en el tratamiento 2 para nudos (1 mg/L de 6-BAP sin ANA) de este experimento que presentó un 60% de respuesta morfogénica al utilizar citocinina de manera aislada; los entrenudos presentaron una respuesta estadística altamente significativa tanto para el efecto de ANA como para su interacción con 6-BAP, en ambos casos, el efecto aislado de 6-BAP no causó un efecto estadístico significativo (0.1274 para nudos; 0.7375 para entrenudos).

**Cuadro 17.** ANAVA de la callogénesis por tipo de explante en explantes adultos.

Callogénesis en explantes adultos					
Efecto	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F	p	Significancia
Nudos					
6-BAP	0.25000000	0.08333333	1.99	0.1274	NS
ANA	0.45000000	0.15000000	3.59	0.0202	*
Interacción	5.95000000	0.39666667	9.48	<.0001	**
Entrenudos					
6-BAP	0.13750000	0.04583333	0.42	0.7375	NS
ANA	1.63750000	0.54583333	5.03	0.040	**
Interacción	5.08750000	0.33916667	3.13	0.013	**
Hojas					
6-BAP	0.33750000	0.11250000	3.22	0.0306	*
ANA	0.53750000	0.17916667	5.13	0.037	**
Interacción	1.48750000	0.09916667	2.84	0.030	**

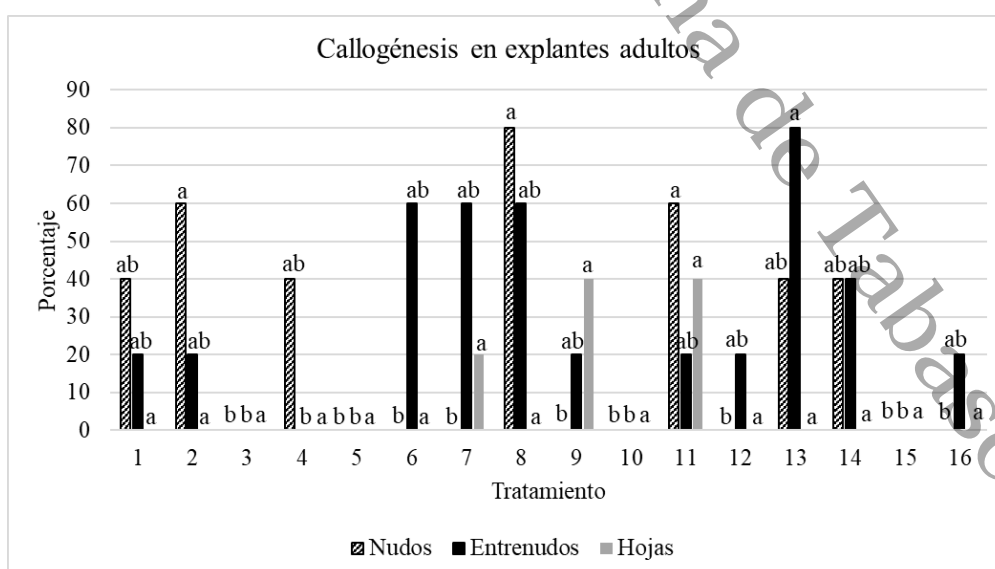
Simbología: NS No significativa frente a Fisher  $p > 0.05$ ; \* significancia estadística (Fisher  $p < 0.05 > 0.01$ ); y \*\* (Fisher  $p \leq 0.01$ ).

No obstante, para el caso de los explantes obtenidos de hojas, el efecto de 6-BAP causó un efecto estadístico significativo (0.0306), y en entrenudos, donde el efecto de ANA

(0.0 40) y el efecto del balance entre ambos RCV's (0.0 13), esto causó un efecto estadístico altamente significativo en la morfogénesis en forma de callos. De la misma forma, medios adicionados solo por citocininas causaron un efecto morfogénico de brotes en nudos de *A. reticulata* (Kudikala *et al.*, 2020) mientras que para *A. muricata* (L.) la combinación de una citocinina (6-BAP 1.5 mg/L) y un auxina sintética (2,4D a 2.0 mg/L) generó la producción de callos, la combinación de 6-BAP 1.0 mg/L, Kinetina 0.5 mg/L e IBA 1.5 mg/L propició el desarrollo de brotes axilares y la combinación de IBA 2.0 mg/L, ANA 0.5 mg/L y 6-BAP 1.0 mg/L la formación de raíces (Abubacker y Deepalakshmi, 2017), similar a explantes de segmentos de hoja de *A. squamosa* expuestos a 6-BAP y Kinetina han respondido con formación de brotes y enraizándolos utilizando medio adicionado por IBA (Chugh y Kumar, 2022).

Al analizar globalmente los bloques se tienen medias globales (interbloques, consultar ANAVA del Cuadro 14) inferiores a las analizadas individualmente (intrabloques, consultar ANAVA del Cuadro 15), de la misma que a nivel fisiológico, los nudos, entrenudos y hojas tienen disposiciones distintas para reaccionar ante los estímulos ocasionados por los RCV's, por lo que nudos, entrenudos y hojas respondieron de manera distinta a los estímulos generados por cada balance de RCV's.

Los tratamientos con mayor porcentaje de éxito según el tipo de explante utilizado fueron T8 con un 80% de respuesta callogénica en nudos, T13 con un 80% de respuesta callogénica en entrenudos y los tratamientos T9 y T11 con 40% cada uno de respuesta callogénica en hojas (Figura 16).



**Figura 16.** Calogénesis en explantes adultos según el tipo de explante por el efecto de los tratamientos.

Por lo anterior, fue posible elaborar manualmente una matriz con los mejores resultados de para ejemplifica la distribución de las mejores respuestas morfogénicas por tipo de explante de acuerdo a las interacciones de RCV's (Cuadro 16).

**Cuadro 18.** Matriz de las mejores respuestas estadísticamente distintas por tratamiento y tipo de explante.

Matriz de Tratamientos		6-BAP (mg/L)			
		0.0	1.0	2.5	5.0
ANA (mg/L)	0.0	1) -----	2) 60% <sup>a</sup> <sub>N</sub>	3) -----	4) -----
	0.10	5) -----	6) -----	7) 20% <sup>a</sup> <sub>H</sub>	8) 80% <sup>a</sup> <sub>N</sub>
	0.25	9) 40% <sup>a</sup> <sub>H</sub>	10) -----	11) 40% <sup>a</sup> <sub>H</sub>	12) -----
	0.50	13) 80% <sup>a</sup> <sub>NyE</sub>	14) -----	15) -----	16) -----

Nota: Por fines de síntesis, se omitieron los resultados por debajo de la media mínima significativa para cada tratamiento y se utilizaron solo los porcentajes diferenciados del resto como mejores tratamientos (consultar figura 13), donde N: Nudo, E: Entrenudo y H: Hojas.

Se observa que la respuesta obtenida de los nudos fue independiente a las concentraciones de ANA y 6-BAP adicionadas al medio de cultivo, mientras que la respuesta en las hojas se encuentra ubicada al centro de los tratamientos, lo que podría indicar la incidencia del efecto en balance de los RCV's para generar la morfogénesis. Por otro lado, la respuesta máxima de nudos y entrenudos se encuentra aislada con adición de auxina (0.5 mg/L) sin citocinina. Al mismo tiempo, los tratamientos 6, 7 y 8 que no presentaron diferencias estadísticas frente a los dos mejores tratamientos, se encontraron al centro de la matriz, con un balance similar a la respuesta generada en hojas y nudos, lo que puede indicar que las respuestas morfogénicas obtenidas se deben principalmente al efecto de los reguladores endógenos estimulados por los reguladores externos del medio de cultivo en plantas adultas bajo las condiciones experimentales.

Las plantas adultas del género *Annona*, pierden su capacidad totipotencial conforme avanza su edad, de acuerdo a lo mencionado para guanábana (*Annona muricata* L.), los cambios morfogénicos, niveles hormonales y la progresión de la pérdida en la capacidad totipotente de las células, inhiben la actividad morfogénica *in vitro* de los explantes adultos al mantenerlos latentes, mueren o desarrollan callos (García-Águila *et al.*, 2012). Se toma en cuenta además, el estado vegetativo de la planta madre, pues la etapa de floración-fructificación (tardía) de la planta madre de los explantes adultos

pudo influir en la inhibición de los reguladores en el medio de cultivo y generación de callos, pues durante la floración actúa junto a los RCV's mencionados, las gibrelinas, mismas que se asocian a la inhibición y retardamiento del crecimiento vegetativo de meristemos (P. Kumar *et al.*, 2022; Su *et al.*, 2011), mismo regulador que es activado por estrés abiótico (como temperatura, salinidad o estrés osmótico) (Agudelo-Morales *et al.*, 2021), mismo que fue realizado por el uso de NaClO y las heridas ocasionadas por abrasión en el tejido.

Lo anterior indica que bajo las condiciones experimentales utilizadas, los explantes de saramuyo tienden a desarrollar callos *in vitro*, especialmente al tomarlos de plantas adultas, sin embargo, usar explantes provenientes de plantas juveniles o rejuvenecidas puede ser una alternativa más eficiente para obtener brotes. Como expectativa se plantea obtener explantes obtenidos vía clonación tradicional de plantas seleccionadas, mediante injertos o estacas, de manera que se incentive el estado vegetativo de desarrollo en las plantas madre conservando la genética de la planta original y así obtener morfogénesis en explantes "juveniles" de plantas adultas rejuvenecidas en la matriz experimental de los balances con RCV's.

## 7. CONCLUSIONES

Los explantes de saramuyo juveniles demostraron una descontaminación sencilla de bacterias, exhibiendo dificultades en la descontaminación fúngica. Los resultados de la primera etapa demuestran que la axenificación (descontaminación) se consiguió de manera exitosa en los tres tipos de tejido. Asimismo, los explantes mostraron respuestas morfogénicas en forma de callos y brotes bajo las condiciones evaluadas. Las hojas en este experimento demostraron ser menos eficientes para generar morfogénesis en todos los tratamientos, mientras que los callos se generaron en nudos, entrenudos y algunos tratamientos de hojas. La organogénesis directa en forma de brotes solo se presentó en explantes juveniles en forma de nudos. Por tanto, se rechaza la hipótesis respecto a la adición de RCV's al medio de cultivo para generar brotes y/o embriones y se le atribuye la respuesta morfogénica en forma de callogénesis al balance de RCV's propios del estado fisiológico de los explantes.

La morfogénesis obtenida es capaz de dar pauta a la etapa de micropropagación y establecer líneas clonales de producción. Los explantes de saramuyo *in vitro* obtenidos pueden subcultivarse en suspensiones para futuras evaluaciones de metabolitos secundarios, asimismo, aislamiento de microorganismos endófitos para identificar sus interacciones con saramuyo y potenciales aplicaciones en otros sectores.

Los resultados obtenidos pueden dar pauta a futuros ensayos con la utilización de medio de cultivo MS con adecuaciones y la utilización de RCV's en distintos balances para evaluar la respuesta de explantes de obtenidos de selecciones juveniles o rejuvenecidas y extracción de metabolitos secundarios. La obtención de explantes axénicos fue un éxito respecto a la obtención de material genético de saramuyo *in vitro* con capacidad morfogénica y se reafirma la necesidad de utilizar explantes juveniles para este fin.

## 8. REFERENCIAS

- Abubacker, N., & Deepalakshmi, T. (2017). In vitro Direct Regeneration of *Annona muricata* L. from Nodal Explant. *Biosciences, Biotechnology Research Asia*, 14(1), 123–128. <https://doi.org/10.13005/bbra/2426>
- Adams, T. K., Masondo, N. A., Malatsi, P., & Makunga, N. P. (2021). Cannabis sativa : From Therapeutic Uses to Micropropagation and Beyond. *Plants*, 1–34.
- Agudelo-Morales, C. E., Lerma, T. A., Martínez, J. M., Palencia, M., & Combatt, E. M. (2021). Phytohormones and Plant Growth Regulators - A Review. *Journal of Science with Technological Applications*, 10, 27–65. <https://doi.org/10.34294/j.jsta.21.10.66>
- Agustín, J. A., & Ledesma, S. D. S. (2014). Conservación y uso de los recursos genéticos de Annonaceae en México. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 36([Eds.] 1), 118–124. <https://doi.org/10.1590/S0100-29452014000500014>
- Ba, O., Diémé, A., & Sy, M. O. (2021). In Vitro Clonal Propagation from Adult Material of a Savannah Species of Socio-Economic Importance: *Annona senegalensis* Pers. *Agricultural Sciences*, 12(04), 370–386. <https://doi.org/10.4236/as.2021.124024>
- Bolívar-Fernández, N., Saucedo-Veloz, C., Solís-Pereira, S., & Sauri-Duch, E. (2009). Maduración de frutos de saramuyo (*Annona squamosa* L.) desarrollados en yucatán, México. *Agrociencia*, 43(2), 133–141.
- Bueno, M. S., Feldman, S. R., & Ortiz, J. P. (2007). Desinfección de cariopses y regeneración de plantas de *Spartina argentinensis*. *Ciencia e Investigación Agraria*, 34(3), 231–236. <https://doi.org/10.4067/s0718-16202007000300007>
- Chaturvedi, H. C., Jain, M., & Kidwai, N. R. (2007). Cloning of medicinal plants through tissue culture-A review. *Indian Journal of Experimental Biology*, 45(11), 937–948.
- Chugh, P., & Kumar, A. (2022). Novel Plant Growth Regulators in In Vitro Establishment of Horticulture and Plantation Crops. In S. Gupta & P. Chaturvedi (Eds.), *Commercial Scale Tissue Culture for Horticulture and Plantation Crops* (1st ed., pp. 65–84). Springer, Singapore. [https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-981-19-0055-6\\_4](https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-981-19-0055-6_4)



- Cituk-Chan, D. E. (2021). *Manual de propagación y producción de saramuyo (Annona squamosa L.)* (Instituto). 2015.
- Cui, Y., Deng, Y., Zheng, K., Hu, X., Zhu, M., Deng, X., & Xi, R. (2019). An efficient micropropagation protocol for an endangered ornamental tree species (*Magnolia sirindhorniae* Noot. & Chalermglin) and assessment of genetic uniformity through DNA markers. *Scientific Reports*, 9(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-46050-w>
- Dar, C. T., Abdullah, J. O., Namasivayam, P., & Roowi, S. H. (2012). Sterilization of *Hibiscus rosa-sinensis* L. Vegetative Explants Sourced from Plants Grown in Open Environment and Influences of Organic Ingredients on In Vitro Direct Regeneration. *American Journal of Plant Sciences*, 03(06), 791–798. <https://doi.org/10.4236/ajps.2012.36095>
- Daud, N. H., Jayaraman, S., & Mohamed, R. (2012). Methods paper: An improved surface sterilization technique for introducing leaf, nodal and seed explants of *Aquilaria malaccensis* from field sources into tissue culture. *Asia-Pacific Journal of Molecular Biology and Biotechnology*, 20(2), 55–58.
- del Río-Carbajo, L., & Vidal-Cortés, P. (2019). Tipos de antisépticos, presentaciones y normas de uso. *Medicina Intensiva*, 43, 7–12. <https://doi.org/10.1016/j.medin.2018.09.013>
- Dutta, D., Puzari, K. C., Gogoi, R., & Dutta, P. (2014). Endophytes: Exploitation as a Tool in Plant Protection. *Arch. Biol. Technol.* V, 57557(5), 621–629. <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-8913201402043>
- Encina, C. L., Martin, E. C., Lopez, A. A., & Padilla, I. M. G. (2014). Biotechnology applied to *Annona* species: a review. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 36(spe1). <https://doi.org/10.1590/s0100-29452014000500002>
- Farooq, S. A., Farooq, T. T., & Rao, T. V. (2001). Micropropagation of *Annona squamosa* L. Using Nodal Explants. In *Pakistan Journal of Biological Sciences* (Vol. 5, Issue 1, pp. 43–46). <https://doi.org/10.3923/pjbs.2002.43.46>
- García-Águila, L., Álvarez, J. M., Alvarado-Capó, Y., & González, M. (2012). *Establecimiento in vitro de segmentos nodales de plantas jóvenes de Annona muricata L.* *plants*. 12(4), 229–234.
- Gerrero, E. D. J., & Fischer, G. (2007). Manejo integrado en el cultivo de anón (*Annona squamosa* L.). *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*, 2, 154–169. <https://www.mendeley.com/catalogue/41fe47b6-59d9-3de5-89e7->

- Gozalo-Vásquez, A. D. C., & Díaz-Pillasca, H. B. (2022). Efecto de tres medios de cultivo en la propagación in vitro de *Solanum chaucha* Juz. & Bukasov. *Aporte Santiaguino*, 15(1), 9–21. <https://doi.org/10.32911/as.2022.v15.n1.863>
- Gupta, N., Jain, V., Joseph, M. R., & Devi, S. (2020). A review on Micropropagation Culture Method. *Asian Journal of Pharmaceutical Research and Development*, 8(1), 86–93. <http://dx.doi.org/10.22270/ajprd.v8i1.653%0Ahttp://ajprd.com>
- Gupta, P. K., Shirgurkar, M. V., & Mascarenhas, A. F. (1984). In vitro organogenesis from leaf explants of *Annona squamosa* Lin. *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 3104, 29–40.
- Hine-Gómez, A., & Valverde-Cerdas, L. (2003). Establecimiento in vitro de *Cryptomeria japonica* (Taxocidaceae). *Revista de Biología Tropical*, 51(3–4), 683–690.
- Hussain, S., Nanda, S., Zhang, J., Rehmani, M. I. A., Suleman, M., Li, G., & Hou, H. (2021). Auxin and cytokinin interplay during leaf morphogenesis and phyllotaxy. *Plants*, 10(8), 1–14. <https://doi.org/10.3390/plants10081732>
- Jiménez-Terry, F., & Agramonte, D. (2013). Cultivo in vitro y macropropagación como vía de sostenibilidad de la propagación de especies forestales. *Reseña Bibliográfica Biotecnología Vegetal*, 13(1), 397.
- Judith, C. E., Martín, H. L., & Alberto, G. L. (2020). Uso de L-Cisteína para el control de oxidación in vitro de *Annona muricata* L. Use of L-Cysteine for the control of in vitro oxidation of *Annona muricata* L. *Revista Multidisciplinaria de Avances de Investigación*, 6, 1–6.
- Karakas, F. P. (2020). Efficient plant regeneration and callus induction from nodal and hypocotyl explants of goji berry (*Lycium barbarum* L.) and comparison of phenolic profiles in calli formed under different combinations of plant growth regulators. *Plant Physiology and Biochemistry*, 146(July 2019), 384–391. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2019.11.009>
- Kishore, K., Shukla, A. K., Babu, N., Sarangi, D. N., & Patanayak, S. (2012). Pollination biology of *Annona squamosa* L. (Annonaceae): Evidence for pollination syndrome. *Scientia Horticulturae*, 144, 212–217. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2012.07.004>
- Kudikala, H., Jogam, P., Sirikonda, A., Mood, K., & Allini, V. R. (2020). In vitro micropropagation and genetic fidelity studies using SCoT and ISSR primers in

- Annona reticulata* L.: an important medicinal plant. *Vegetos*, 33(3), 446–457.  
<https://doi.org/10.1007/s42535-020-00128-3>
- Kumar, M., Changan, S., Tomar, M., Prajapati, U., Saurabh, V., Hasan, M., Sasi, M., Maheshwari, C., Singh, S., Dhupal, S., Radha, Thakur, M., Punia, S., Satankar, V., Amarowicz, R., & Mekhemar, M. (2021). Custard apple (*Annona squamosa* L.) leaves: Nutritional composition, phytochemical profile, and health-promoting biological activities. *Biomolecules*, 11(5).  
<https://doi.org/10.3390/biom11050614>
- Kumar, P., & Kumar-Srivastava, D. (2015). Biotechnological applications in in vitro plant regeneration studies of broccoli (*Brassica oleracea* L. var. *italica*), an important vegetable crop. *Biotechnology Letters*.  
<https://doi.org/10.1007/s10529-015-2031-x>
- Kumar, P., Singh, V., Johar, V., Kumar, A., & Kadlag, S. S. (2022). Uses of Plant Growth Regulators and Biofertilizers in Fruit Crops: A Review. *International Journal of Environment and Climate Change*, July, 314–326.  
<https://doi.org/10.9734/ijec/2022/v12i1130977>
- Kumari, S., Bakshi, P., Sharma, A., Wali, V. K., Jasrotia, A., & Kour, S. (2018). Use of Plant Growth Regulators for Improving Fruit Production in Sub Tropical Crops. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 7(03). <https://doi.org/10.20546/ijemas.2018.703.077>
- Lemos, E. E. P., & Blake, J. (1996). Micropropagation of juvenile and mature *Annona muricata* L. Micropropagation of juvenile and mature *Annona*. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 71(3), 395–403.  
<https://doi.org/10.1080/14620316.1996.11515420>
- León-Méndez, Glicerio, ; Pájaro-Castro, Nerlis, ; & Granados-Conde, C. (2020). Annonaceae squamosa una fuente de acetogeninas en la actualidad Annonaceae squamosa a source of acetogenins today. *Ciencia y Salud Virtual*, 12(2), 88–101. <https://doi.org/10.22519/21455333.1289>
- Li, S. M., Zheng, H. X., Zhang, X. S., & Sui, N. (2021). Cytokinins as central regulators during plant growth and stress response. In *Plant Cell Reports* (Vol. 40, Issue 2, pp. 271–282). Springer Science and Business Media Deutschland GmbH. <https://doi.org/10.1007/s00299-020-02612-1>
- Liu, K., Li, H., Li, W., Zhong, J., Chen, Y., Shen, C., & Yuan, C. (2017). Comparative transcriptomic analyses of normal and malformed flowers in sugar

- apple (*Annona squamosa* L.) to identify the differential expressed genes between normal and malformed flowers. *BMC Plant Biology*, 17(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/s12870-017-1135-y>
- Liu, Y., Sun, Y., Ye, M., Zhu, L., Zhang, L., & Zhu, S. (2021). Improvement in storage quality of postharvest tomato fruits by nitroxyl liposomes treatment. *Food Chemistry*, 359(December 2020), 129933. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129933>
- Loyola-Vargas, V. M., & Ochoa-Alejo, N. (2018). An Introduction to Plant Tissue Culture: Advances and Perspectives. *Plant Cell Culture Protocols*, 1815, 3–13. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8594-4\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8594-4_1)
- Ma, C., Chen, Y., Chen, J., Li, X., & Chen, Y. (2017). A Review on *Annona squamosa* L.: Phytochemicals and Biological Activities. *American Journal of Chinese Medicine*, 45(5), 933–964. <https://doi.org/10.1142/S0192415X17500501>
- Méndez-Hernández, H. A., Ledezma-Rodríguez, M., Avilez-Montalvo, R. N., Juárez-Gómez, Y. L., Skeete, A., Avilez-Montalvo, J., De-La-Peña, C., & Loyola-Vargas, V. M. (2019). Signaling overview of plant somatic embryogenesis. *Frontiers in Plant Science*, 10(February), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00077>
- Miller, C. O., Skoog, F., Von Saltza, M. H., & Strong, F. M. (1955). KINETIN, A CELL DIVISION FACTOR FROM DEOXYRIBONUCLEIC ACID1. *Journal of the American Chemical Society*, 77(5), 1392.
- Modi, A., Kanani, P., & Kumar, A. (2020). Fungal endophytes-induced gene expression studies in biotic and abiotic stress management. In *Microbial Endophytes: Functional Biology and Applications*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819654-0.00010-7>
- Monja-Mio, K. M., & Robert, M. L. (2013). Direct somatic embryogenesis of *Agave fourcroydes* Lem. through thin cell layer culture. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, 49(5), 541–549. <https://doi.org/10.1007/s11627-013-9535-7>
- Nagori, R., & Purohit, S. . (2004). In vitro plantlet regeneration in *Annona squamosa* through direct shoot bud differentiation on hypocotyl segments. *Scientia Horticulturae*, 99(1), 89–98. [https://doi.org/10.1016/S0304-4238\(03\)00084-0](https://doi.org/10.1016/S0304-4238(03)00084-0)
- Orantes-Ramos, H. Á., & López-Ventura, Y. E. (2019a). *Evaluación de medios de*

- inducción in vitro a callo vegetal en explantes foliares de Annona diversifolia Safford ( Magnoliales : Annonaceae ) Evaluation of in vitro induction means to plant callus in foliar explants of Annona diversifolia Safford ( Magnoli. 2, 22–30.*
- Orantes-Ramos, H. Á., & López-Ventura, Y. E. (2019b). Evaluación de medios de inducción in vitro a callo vegetal en explantes foliares de *Annona diversifolia Safford* ( Magnoliales : Annonaceae ) Evaluation of in vitro induction means to plant callus in foliar explants of *Annona diversifolia Safford* ( Magnoli. *Revista Multidisciplinaria de La Universidad de El Salvador*, 2, 22–30.
- Pais, M. S. (2019). Somatic embryogenesis induction in woody species: The future after OMICs data assessment. *Frontiers in Plant Science*, 10(March).  
<https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00240>
- Phillips, G. C., & Garda, M. (2019). Plant tissue culture media and practices: an overview. In *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant* (Vol. 55, Issue 3, pp. 242–257). Springer New York LLC.  
<https://doi.org/10.1007/s11627-019-09983-5>
- Quezada, M., & Ayra, G. M. (2020). Establecimiento in vitro de segmentos nodales de guanábana (*Annona muricata* L.) en la estación experimental Sapecho-Bolivia. *Revista de Investigación e Innovación Agropecuaria y de Recursos Naturales*, 7, 62–68.
- Ramírez-Villalobos, M., Urdaneta, A., & León de Sierralta, S. (2002). Establecimiento in vitro de explantes adultos del guanábano (*Annona muricata* L.) tratados con hipoclorito de sodio. *Revista de La Facultad de Agronomía*, 19(1), 1–8.
- Randel, M., Chong, B., & Pérez, N. (2015). Organogénesis in vitro en el género *Digitalis* In vitro organogenesis in *Digitalis* genus. *Biotechnología Vegetal*, 15(4), 195–206.
- Rasai, S., George, A. P., & Kantharajah, A. S. (1995). Tissue culture of *Annona* spp . ( cherimoya , atemoya , sugar apple and soursop ): A review. *Scientia Horticulturae*, 62(94), 1–14.
- Rojas-Idrogo, C., Olivera-Morante, M. I., & Delgado-Paredes Guillermo E. (2020). In vitro propagation of *Peperomia albivittata* and *Peperomia galioides* by organogenesis. *Biotechnología Vegetal*, 20(2), 92–103.  
<https://search.scielo.org/?lang=es&count=15&from=0&output=site&sort=&for>

- mat=summary&fb=&page=1&q=%22In+vitro+propagation+of+Peperomia+albovittata+and+Peperomia+galioides+by+organogénesis%22
- Rosenberg, S., Zitcer, E., & Kirk, P. L. (1953). Tissue Culture Studies. *Journal of General Physiology*, 37(2), 231–238. <https://doi.org/10.1085/jgp.37.2.231>
- Roychoudhury, A., & Aftab, T. (2021). Phytohormones, plant growth regulators and signaling molecules: cross-talk and stress responses. *Plant Cell Reports*, 40(8), 1301–1303. <https://doi.org/10.1007/s00299-021-02755-9>
- Sakazaki, R. T., Araújo, W. F., Neto, J. L. L. M., Chagas, P. C., Chagas, E. A., Murga-Orrillo, H., Bardales-Lozano, R. M., & Abanto-Rodríguez, C. (2019). Shade nets and substrates in seedling production of *Annona squamosa* L. In the Roraima Cerrado. *Semina: Ciências Agrárias*, 40(6). <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2019v40n6p2535>
- Salcedo-morales, G., Trejo-tapia, G., Blanca, P., Jesús-sánchez, A. De, Arenas-, M. L., & Jiménez-aporicio, O. A. R. (2009). Establecimiento de un protocolo de permeabilización con detergentes que incrementa la eficiencia en la producción de betacianinas en cultivos de células de *Beta vulgaris* L. *Interciencia*.
- Sánchez Ruiz, F. H., Furuya Meguro, A. T., Arroniz Padilla, S., Gomez Moreno, A., & Gomez, L. (2009). Comparación de la acción bactericida de hipoclorito de sodio y microcyn 60. *Revista Odontológica Mexicana*, 13, 9–16.
- Singh, A. K. (2019). Early History of Crops Presence / Introduction into India : IV . *Ananas comosus*. *Asian Agri-History*, 23(January), 37–48. <https://www.researchgate.net/publication/330555239>
- Sivaji, M., , M. Pandiyan, M. Yuvaraj, T. Thilagavathi, R. S. and M., & Suganyadevi. (2020). Micropropagation – Tissue Culture Banana. *Vigyan Varta*, 1(3), 28-32.
- Su, Y. H., Liu, Y. B., & Zhang, X. S. (2011). Auxin-cytokinin interaction regulates meristem development. *Molecular Plant*, 4(4), 616–625. <https://doi.org/10.1093/mp/ssr007>
- Thakur, O. (2022). Recent advances of plant growth regulators in vegetable production: A Review. *The Pharma Innovation Journal*, 11(3), 1726–1731.
- Thorpe, T. A. (2007). History of plant tissue culture. *Molecular Biotechnology*, 37(2), 169–180. <https://doi.org/10.1007/s12033-007-0031-3>
- Tridge, I. (2023). *Tridge*. Tridge Exhibition 365 Fresh Custard Apple Global Market. <https://www.tridge.com/intelligences/custard-apple/price>

USDA. (2021). *Nutritional compound of crops*. United State Department of Agriculture.

Vidal Lezama, E., Vidal Martínez, N. A., & Vidal Hernández, L. (2015). *Anonáceas: plantas antiguas, estudios recientes*.

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.  
México.