



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

**PROGRAMA DE POSTGRADO EN RECURSOS GENÉTICOS Y
PRODUCTIVIDAD**

FRUTICULTURA

APLICACIÓN DE TECNOLOGÍAS EMERGENTES E INNOVADORAS EN LA PROPAGACIÓN VEGETATIVA DE CUATRO VARIETADES DE HIGO (*Ficus carica* L.)

LUCIO JUÁREZ MARTÍNEZ

T E S I S
PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, ESTADO DE MÉXICO

2019

CARTA DE CONSENTIMIENTO DE USO DE LOS DERECHOS DE AUTOR Y DE LAS REGALÍAS COMERCIALES DE PRODUCTOS DE INVESTIGACIÓN

En adición al beneficio ético, moral y académico que he obtenido durante mis estudios en el Colegio de Postgraduados, el que suscribe Lucio Juárez Martínez, Alumno de esta Institución, estoy de acuerdo en ser partícipe de las regalías económicas y/o académicas, de procedencia nacional e internacional, que se deriven del trabajo de investigación que realicé en esta institución, bajo la dirección del Profesor Dr. Gregorio Arellano Ostoá, por lo que otorgo los derechos de autor de mi tesis APLICACIÓN DE TECNOLOGÍAS EMERGENTES E INNOVADORAS EN LA PROPAGACIÓN VEGETATIVA DE CUATRO VARIEDADES DE HIGO (*Ficus carica* L.), y de los productos de dicha investigación al Colegio de Postgraduados. Las patentes y secretos industriales que se puedan derivar serán registrados a nombre del Colegio de Postgraduados y las regalías económicas que se deriven serán distribuidas entre la Institución, El Consejero o Director de Tesis y el que suscribe, de acuerdo a las negociaciones entre las tres partes, por ello me comprometo a no realizar ninguna acción que dañe el proceso de explotación comercial de dichos productos a favor de esta Institución.

Montecillo, Mpio. de Texcoco, Edo. de México, a 26 de Febrero de 2019.



Lucio Juárez Martínez



Vo. Bo. del Dr. Gregorio Arellano Ostoá

La presente tesis titulada: **APLICACIÓN DE TECNOLOGÍAS EMERGENTES E INNOVADORAS EN LA PROPAGACIÓN VEGETATIVA DE CUATRO VARIEDADES DE HIGO (*Ficus carica* L.)** realizada por el alumno: **Lucio Juárez Martínez** bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS
RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD

FRUTICULTURA

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO (A)



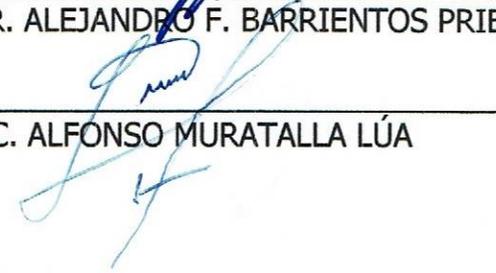
DR. GREGORIO ARELLANO OSTOA

ASESOR (A)



DR. ALEJANDRO F. BARRIENTOS PRIEGO

ASESOR (A)



MC. ALFONSO MURATALLA LÚA

Montecillo, Texcoco, Estado de México, febrero de 2019.

APLICACIÓN DE TECNOLOGÍAS EMERGENTES E INNOVADORAS EN LA PROPAGACIÓN VEGETATIVA DE CUATRO VARIEDADES DE HIGO (*Ficus carica* L.)

Lucio Juárez Martínez, M. en C.
Colegio de Postgraduados, 2018

RESUMEN

El cultivo de la higuera en el mundo ha sido reactivado gracias a la demanda generada por la industria gastronómica que está incorporando el fruto en diferentes platillos. Las variedades que se encuentran en el país son partenocárpicas, como 'Black mission', 'Kadota', 'Gómez' y 'Netzahualcóyotl', y las nuevas superficies se abastecen de planta propagada por estacas. El objetivo de este trabajo fue desarrollar un protocolo viable, para la propagación asexual masiva, adoptando e innovando las últimas tecnologías utilizadas en la horticultura para obtener plantas sanas y de calidad. El trabajo se realizó en tres capítulos: el primero, consiste en la determinación de carbohidratos (glucosa) en tallos y clorofila en hojas, obtenido: 4.32, 3.76, 2.72 y 6.16 mg de glucosa, para 'Black mission', 'Kadota', 'Gómez' y 'Netzahualcoyotl', respectivamente, de igual forma encontramos en clorofila total: 0.54, 0.47, 0.34 y 0.77 mg de clorofila por cada 100 mL de solución, la concentración de clorofila en hojas está estrechamente relacionada con la cantidad de carbohidratos (glucosa) en los tallos. Mientras que el segundo consiste en el enraizamiento *in vivo* de cuatro variedades de higo, por el método de mini estacas, bajo diferentes concentraciones de ácido indol butírico (AIB); 0 ppm, 500 ppm, 1000 ppm, 1500 ppm y 2000 ppm, bajo condiciones de invernadero. El porcentaje de enraizamiento para 'Black mission', 'Kadota', 'Gómez' y 'Netzahualcóyotl' fue; 52 %, 64 %, 85 % y 94 % de enraizamiento respectivamente, después de 60 días. Las mejores concentraciones oscilaron entre 500 a 1500 ppm, y fue diferente para cada variedad. En el tercero, se expone la propagación mediante el cultivo de tejidos *in vitro* de yemas axilares de los cultivares Gómez, Black Mission, Kadota y Nezahualcóyotl, con el uso de nano partículas de plata (Ag NPs), usado como microbicida, para lograr mayor asepsia en los explantes. Las Ag NPs fueron efectivas a concentraciones de 50 - 75 ppm con un 20 - 28 % de explantes contaminados. Para la multiplicación se utilizó 1-triacontanol, a 10 µg L⁻¹

incrementa el número de brotes en 'Black mission', 'Kadota' y 'Gómez', en agar, a 2.8, 2.9 y 3.4 brotes por explante, respectivamente, mientras que a concentración de $5 \mu\text{g L}^{-1}$ incrementa el número de brotes en 'Netzahualcóyotl' a 4.2 brotes. El uso de biorreactores de inmersión temporal tipo RITA® aumentó la tasa de multiplicación a 3.6 y 4.4 brotes por explante, así como la longitud de los brotes y el número de hojas por explante en 'Gomez' y 'Netzahualcoyotl', respectivamente. Las técnicas desarrolladas son factibles debido al aumento en la multiplicación masiva de *Ficus carica* L.

Palabras clave: biorreactores, mini estacas, RITA®, cultivo de tejidos, *in vitro*.

APPLICATION OF EMERGING AND INNOVATIVE TECHNOLOGIES IN THE VEGETATIVE PROPAGATION OF FOUR VARIETIES OF FIG (*Ficus carica* L.)

Lucio Juárez Martínez, M. Sc.
Colegio de Postgraduados, 2018

ABSTRACT

The cultivation of the fig tree has returned importance in México, due to the quality and demand of its fruit, the fig. The varieties found in the country are parthenocarpic, case of; 'Black mission', 'Kadota', 'Gómez' and 'Netzahualcóyotl', causing their propagation to be only asexual, the traditional method is the propagation by stakes. The objective of this work was to develop an economically viable protocol for the massive asexual propagation of fig tree, adopting and innovating the latest technologies used in horticulture to obtain quality and healthy plants, with the purpose of using the least amount of material possible vegetative of four commercial varieties. The present work was carried out in three chapters, the first consists of the determination of carbohydrates (glucose) in stems and chlorophyll in leaves, obtaining: 4.32, 3.76, 2.72 and 6.16 mg of glucose, for 'Black mission', 'Kadota', 'Gómez' and 'Netzahualcoyotl', respectively, of the same way we find in total chlorophyll: 0.54, 0.47, 0.34 and 0.77 mg of chlorophyll for each 100 mL of solution, the concentration of chlorophyll in leaves is closely related to the amount of carbohydrates (glucose) in the stems. The second chapter consists in the *in vivo* rooting of four varieties of fig, by the method of mini cuttings, under different concentrations of indole butyric acid (AIB); 0 ppm, 500 ppm, 1000 ppm, 1500 ppm and 2000 ppm, under greenhouse conditions, the percentage of rooting for 'Black mission', 'Kadota', 'Gomez' and 'Netzahualcoyotl' was; 52%, 64%, 85% and 94% rooting, respectively, after 60 days. The best concentrations ranged from 500 to 1500 ppm, and it was different for each variety. In the third chapter the propagation is exposed by *in vitro* tissue culture of axillary buds, with the use of silver nanoparticles (Ag NPs), used as a microbicide, to achieve greater asepsis in the explants of the four varieties of fig tree. The Ag NPs were effective at concentrations of 50-75 ppm with 20-28% of contaminated explants. For multiplication only 2 varieties were used; 'Gómez' and 'Netzahualcóyotl', in which there was less sprouting time (4 weeks) in the explants of 'Netzahualcóyotl' compared to 'Gómez'. With the use of 1-triacontanol, at a

concentration of 5 µg L⁻¹, 3.6 - 4.4 shoots were obtained per explant, of the 'Gómez' and 'Netzahualcóyotl' varieties, respectively. The use of RITA® type temporary immersion bioreactors increased the multiplication rate to 3.6 and 4.4 shoots per explant, as well as the length of the shoots and the number of leaves per explant in 'Gomez' and 'Netzahualcoyotl', respectively. The techniques developed are feasible to perform for the massive multiplication of *Ficus carica* L.

Key words; bioreactors, mini cuttings, RITA®, tissue culture, *in vitro*.

AGRADECIMIENTOS

Al pueblo de México quien financia al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, quien concedió la beca para realizar mis estudios de maestría, y contribuir al desarrollo agrícola del país.

A dios quien ha forjado mi camino y me ha guiado por el sendero correcto, por regalarme salud y bienestar, para cumplir mis objetivos, metas y sueños.

A mis padres; Carmen y German, por formarme y educarme con valores y principios, para lograr mis objetivos.

A mis familiares; Marcelo, Mary, Mayra, Rigo, Gaby, Diana, Aldo, Dani, Alan e Isaac, por regalarme momentos agradables y divertidos.

A mi novia Magnolia, y su familia, quienes me apoyan e impulsan, siendo pilares fundamentales para lograr mis objetivos.

A los Profesores que forman parte de mi Consejo Particular; Dr. Gregorio Arellano Ostoa, Dr. Alejandro F. Barrientos Priego, M.C. Alfonso Muratalla Lúa, quienes con sus consejos, amistad y orientación, hicieron posible la culminación de este objetivo.

A mis compañeros; Fabian, Josue y Dona, quienes compartimos momentos divertidos, y de trabajo en equipo para cumplir con las metas conjuntas.

A mis amigos Ing. Hilario, Ing. Vidal, y Dr. Arcadio, quienes me orientaron y apoyaron para iniciar este objetivo, y enfocarme en el cultivo del higo.

A la naturaleza, quien provee de agua, sol, tierra y aire, quienes en conjunto hacen posible cosechar frutos que se transforman en bienestar para los seres humanos.

DEDICATORIA

Con cariño dedico esta investigación a quienes me apoyaron, guiaron y formaron en esta etapa de mi vida:

A mis abuelos Pedro (q.e.p.d. †), Guadalupe, y Nicolasa.

A mis padres y hermanos.

Familia Gómez Ruiz.

Familia Macías Rodríguez.

Familia Vaquero Morales.

Familia Rivas Valdés.

Familia Blanco Gallegos.

A quienes con su esfuerzo y dedicación seguirán en el camino de la investigación, producción y comercialización de higo en México.

CONTENIDO

RESUMEN.....	i
ABSTRACT.....	iii
LISTA DE CUADROS	x
LISTA DE FIGURAS	xi
INTRODUCCION	1
Objetivos	2
Hipótesis	3
Literatura Citada.....	3
REVISIÓN DE LITERATURA	5
Clasificación Taxonómica de la higuera.....	5
Propiedades del higo	5
Características botánicas de la higuera	5
Tipos y variedades de higuera	5
Producción Mundial y Nacional	6
Virus Mosaico de la Higuera (FMV)	7
Métodos de propagación	7
Propagación por estacas	8
Propagación por hijuelos.....	8
Propagación por acodos.....	8
Propagación <i>in vitro</i>	9
Literatura citada	14
CAPÍTULO I. CUANTIFICACIÓN DE CARBOHIDRATOS Y CLOROFILA DE CUATRO VARIEDADES DE HIGUERA.....	20
1.1 Resumen.....	20
1.2 Abstract	21
1.3 Introducción	22
1.4 Materiales y Métodos	24
1.4.1 Sitio experimental	24
1.4.2 Material vegetal	24
1.4.3 Metodología para cuantificación de carbohidratos.....	24
1.4.4 Metodología para determinación de clorofila.....	26

1.5	Resultados y Discusión.....	26
1.5.1	Cuantificación de carbohidratos.....	26
1.5.2	Cuantificación de clorofila.....	29
1.6	Conclusiones	30
1.7	Literatura citada	31
CAPÍTULO II. PROPAGACIÓN <i>in vivo</i> DE HIGUERA.....		34
2.1	Resumen.....	34
2.2	Abstract	35
2.3	Introducción	36
2.4	Materiales y Métodos	37
2.4.1	Sitio experimental	37
2.4.2	Material vegetal	37
2.4.3	Desinfestación de las varetas.....	38
2.4.4	Sustrato y condiciones de enraizamiento.....	38
2.4.5	Variables evaluadas	39
2.4.6	Diseño Experimental	39
2.5	Resultados y Discusión.....	40
2.5.1	Efecto de ácido indol butírico (AIB).....	40
2.6	Conclusiones.....	44
2.7	Literatura citada.....	44
CAPÍTULO III. MULTIPLICACIÓN <i>in vitro</i> DE CUATRO VARIEDADES DE HIGUERA.....		47
3.1	Resumen.....	47
3.2	Abstract	48
3.3	Introducción	49
3.4	Materiales y Métodos	51
3.4.1	Sitio experimental	51
3.4.2	Material vegetal.....	51
3.4.3	Desinfección de los explantes.....	52
3.4.4	Medio de cultivo y condiciones de incubación.....	52
3.4.5	Establecimiento en Magentas y Biorreactores	52
3.4.6	Tratamientos, diseño y unidad experimental	53
3.4.7	Variables evaluadas	54
3.5	Resultados y Discusión.....	54

3.5.1	Efecto de las AgNPs.....	54
3.5.2	Efecto del sistema de cultivo.....	57
3.5.3	Efecto de la concentración de 1-triacontanol.	62
3.6	Conclusiones	66
3.7	Literatura Citada.....	66
DISCUSIÓN GENERAL.....		71
1.	Discusión	71
2.	Literatura citada	79
CONCLUSIONES GENERALES		84

LISTA DE CUADROS

Cuadro 2. 1 Número y longitud de raíces de las cuatro variedades.	42
--	----

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. 1 Curva estándar de Glucosa para Higuera, con regresión lineal..... 25
- Figura 1. 2 Cantidad de glucosa por variedad de higuera..... 27
- Figura 1. 3 Diluciones de glucosa, para curva estándar de interpretación..... 28
- Figura 1. 4 Cuantificación de clorofila a y b por variedad, absorbancia a 625 nm. 29
- Figura 1. 5 Muestras de clorofila de las cuatro variedades, calibración del espectrofotómetro. Clorofila de variedad 1: 'Black mission'; 2: 'Kadota'; 3: 'Netzahualcóyotl'; 4: 'Gómez' 30
- Figura 2. 1 Enraizamiento de cuatro variedades de higuera con la aplicación de diluciones de Radix® 3000. Medias con letras iguales entre las columnas del mismo tratamiento, no son estadísticamente diferentes según la prueba de Tukey, ($P \leq 0.05$). T1: 0 ppm (testigo); T2: 500 ppm; T3: 1000 ppm; T4: 1500 ppm; T5; 2000 ppm de AIB; Netza: variedad 'Netzahualcóyotl' ... 41
- Figura 2. 2 Multiplicación in vivo de *Ficus carica* L. Por mini estacas. A) T4(1500 ppm de AIB) para 'Black mission'; B) T4(1500 ppm de AIB) en 'Kadota'; C) T2(1000 ppm de AIB) en 'Gómez'; D) T1(500 ppm de AIB) en 'Netzahualcóyotl'; E) Disposición de raíces del tallo; F) Mini estaca con 1 brote y raíz; G) Mini estaca con 2 brotes y raíz; H) Mini estaca con 19 raíces y 1 brote, 'Black mission' 44
- Figura 3. 1 Contaminación de explantes tratados con diferentes concentraciones de AgNPs. Medias con letras iguales no son estadísticamente diferentes (Tukey, $P \leq 0.05$). T1) 25 ppm; T2) 50 ppm; T3) 75 ppm de AgNPs. 55
- Figura 3. 2 Establecimiento in vitro de *Ficus carica* L. A) Explante de higuera sano a 45 días; B) Rebrote del explante después de 50 días en medio de cultivo; C) Rebrote retirado del explante después de los 60 días; D) Rebrote subcultivado en tubo de ensaye en medio semisólido-agar. 56
- Figura 3. 3 Resultados en la variedad Gómez, Agar versus RITA®. Medias con letras iguales en las columnas no son estadísticamente diferentes (Tukey, $P \leq 0.05$). cm: centímetros; Agar: establecido en medio semisólido; RITA; establecido en medio líquido en inmersión temporal. . 58
- Figura 3. 4 Resultados con la variedad Netzahualcóyotl, Agar versus RITA®. Medias con letras iguales en las columnas no son estadísticamente diferentes (Tukey, $P \leq 0.05$). cm: centímetros;

Agar: establecido en medio semisólido; RITA; establecido en medio líquido en inmersión temporal..... 59

Figura 3. 5 Multiplicación in vitro de *Ficus carica* L. RITA® versus Agar. A) RITA® con explantes de higuera; B) Magenta con explantes; C) Brotes en RITA® después de 30 días de establecimiento; D) Brotes en Magenta-Agar después de 30 días de establecimiento; E) 5 brotes de un solo explante establecido en RITA®; F) 4 brotes de un explante establecido en Magenta- Agar..... 61

Figura 3. 6 Establecimiento en agar, con diferente concentración de 1-triacontanol, en 'Black mission' y 'Kadota', respecto a número de brotes por tratamiento. Medias con letras iguales en las columnas no son estadísticamente diferentes (Tukey, $P \leq 0.05$)..... 62

Figura 3. 7 Establecimiento en agar, con diferente concentración de 1-triacontanol, en 'Netzahualcóyotl' (Netza) y 'Gómez', respecto a número de brotes por tratamiento. Medias con letras iguales en las columnas no son estadísticamente diferentes (Tukey, $P \leq 0.05$)..... 63

Figura 3. 8 Establecimiento en RITA®, con diferente concentración de 1-triacontanol, en 'Netzahualcóyotl' (Netza) y 'Gómez', respecto a número de brotes por tratamiento. Medias con letras iguales en las columnas no son estadísticamente diferentes (Tukey, $P \leq 0.05$)..... 64

INTRODUCCION

El aumento de la población y el cambio climático trae consigo una gran responsabilidad para los productores agrícolas, haciendo que mejoren la producción y rentabilidad por superficie, con la novedad de consumir frutos con alta cantidad de antioxidantes y anticancerígenos, el higo (sicono) es un buen prospecto. La higuera (*Ficus carica* L.) es una planta de origen mediterráneo y una de las primeras en domesticarse (Krislev et al., 2006), su fruto, el higo (sicono) aporta diferentes minerales como K, Ca, Mg, Na, Zn y Cu, además vitaminas A, C, E, K, B6, niacina, tiamina, riboflavina, folato alimenticio y fibra asimilable, también tiene un alto contenido energético 74 kcal por cada 100 g de fruto (USDA, 2015), debido a sus características está siendo demandada en México. En el mundo, Turquía lidera en producción, le siguen Egipto y Argelia. México está en el décimo octavo lugar con poco más de 5 mil toneladas de higo (FAO, 2015). Existen diferentes genotipos, la mayoría presentan partenocarpia, cualidad de las variedades 'Black misión', 'Kadota', 'Gómez' y 'Netzahualcóyotl', variedades tipo partenocárpicas bíferas, debido a esto su reproducción es asexual, principalmente se realiza mediante estacas en varios lugares del mundo, lo que conlleva a mantener los problemas fitosanitarios de la planta madre como: virus, fitoplasmas, bacterias, nemátodos y hongos (Juárez et al., 2018), a pesar de ello, una característica a favor del método es la precocidad a producción, y su mantenimiento de la información genética, así mismo se desconoce la concentración de AIB que necesita cada variedad, sólo pocas están reportadas. Sin embargo existen otras técnicas de propagación más eficientes, como el cultivo *in vitro*, en donde se obtienen mayor número de plantas con menor material vegetativo (Bayoudh et al., 2015), con calidad fitosanitaria. En la propagación *in vitro* de higuera, existe problemas de contaminación (Mitrafanova et al., 2016), dificultando el establecimiento de los explantes, sin embargo, en los últimos años se ha propuesto el uso de las nano partículas de plata (Ag NPs) para conseguir mayor asepsia durante el establecimiento, debido a los problemas de contaminación que se presentan en esta etapa (Spinoso et al., 2017), logrando menor contaminación de los explantes, también existen nuevos métodos como la implementación de Sistemas de Inmersión Temporal (SIT), en donde aumenta el número de brotes emitidos por explante como lo obtuvieron

Nava et al. (2014). Dentro de los promotores de crecimiento existen algunos de última generación, como el 1-triacontanol (TRIA), un alcohol saturado de cadena larga, que promueve el crecimiento en aplicación exógena, además aumenta el contenido de clorofila y sacarosa (Neem et al., 2011), disminuyendo el daño oxidativo, promoviendo la emisión de brotes (Xiaochun et al., 2016).

Se pretende hacer un protocolo para la propagación de higuera, para 'Black misión', 'Kadota', 'Gómez' y 'Netzahualcóyotl', por medio del método de propagación in vivo por mini estacas, variando concentraciones de AIB, y por medio del cultivo *in vitro*; desde el establecimiento hasta la multiplicación.

Objetivos

Objetivo General.

Desarrollar un protocolo viable, para la propagación asexual masiva de higuera, adoptando e innovando las últimas tecnologías utilizadas en la horticultura para obtener plantas de calidad fitosanitaria, con el propósito de utilizar la menor cantidad de material vegetativo posible de cuatro variedades comerciales.

Objetivos Específicos.

Determinar carbohidratos (glucosa) de tallo y cuantificar concentración de clorofila de las hojas, de las cuatro variedades de higuera.

Evaluar diferentes concentraciones de AIB para el enraizamiento in vivo de mini estacas de higuera.

Evaluar la respuesta de los tejidos a diferentes concentraciones de nano partículas de plata para desinfectar los explantes de higuera en cultivo *in vitro*, utilizados para establecer su cultivo en un Sistema Semisólido.

Evaluar el potencial de multiplicación *in vitro* comparando los sistemas tradicionales e inmersión temporal en biorreactores tipo RITA®, junto con la aplicación de 1-triacontanol.

Hipótesis

El uso de ácido indol butírico (AIB) y de nuevas tecnologías como el uso de fungicidas de última generación, biorreactores de Inmersión Temporal y los sustratos inertes permitirán aumentar la propagación de higuera por cada explante, disminuyendo la cantidad de material vegetal utilizado, haciendo el método más eficiente.

Literatura Citada

- Bar H., Dipack, K.B., Gobinda, P.S., Priyanka, S., Sankar, P.A.M. 2009. Green synthesis of silver nanoparticles using latex of *Jatropha curcas*. *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects* 339: 134-139.
- Bayoudh C., Labidi R., Majdoub A., Mars M. 2015. In vitro propagation of caprifig and female fig varieties (*Ficus carica* L.) from shoot-tips. *Journal of Agricultural Science and Technology* Volume 17 (6): 1597-1608.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). 2013. FAOSTAT. Agroecological Zones Project. Vol. 111 Methodology and results for México, Central and South America. Rome. 20 de Octubre de 2018. <<http://faostat3.fao.org/browse/Q/QC/S>>.
- Krislev M.E.A., Hartman O.B. 2006. Early domesticated fig in the Jordan Valley. *Science* 312(5778): 1273-1275.
- Nava G.A., Wagner, A., Mezalira, E., Cassol, D.A., Alegretti, A.L. 2014. Rooting of hardwood cuttings of roxo de valinhos fig (*Ficus carica* L.) with different propagation strategies. *Revista Ceres* Volume 61(6): 989-996.
- Neem M., Masrroor, M., Khan, A. y Moinuddin. 2011. Triacnolol: A Potent Plant Growth Regulator in Agriculture. *Journal of Plant Interactions*, 7(2): 129-142.
- Quiala E., Cañal, M.J., Mejion, M., Rodríguez, R., Chávez, M., Valledor, L., de Fera, M., Barbón, R. 2012. Morphological y Physiological Responses of Proliferating

Shoots of Teak to Temporary Immersion and BTA Treatments. *Plant Cells Tissue Organ Cult* 109:223-234.

Reddy N.J., Mata, R., Rani S.S. 2017. Green synthesized nano silver: Synthesis, physicochemical profiling, antibacterial, anticancer activities and biological in vivo toxicity. *Journal of Colloid and Interface Science* 49(9): 33–45.

Spinoso C.J.L., Chávez, S.R.A., Nina, B., Pérez, S.J.A., Morales, R.V., and Bello, B.J.J. 2017. Antimicrobial and hormetic effects of silver nanoparticles on in vitro regeneration of vanilla (*Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews) using a temporary immersion system. *Plant Cell Tissue Organ Cult* (2017) 129:195–207.

United States Department of Agriculture (USDA). 2015. Agricultural statistics for 2015. U. S. Dept., Agr., Washington D.C. 30 de Agosto de 2018. <http://www.usda.gov/wps/portal/usda/usdahome?navid=EN_ESPANOL>.

Xiaochun L., Qiuyi, Z., Yuxiang, L., Ganghua, L., Yanfeng, D., Shaohua, W., Zhenghui, L., She, T., Chengqiang, D., Lin, C. 2016. Triacanol Reduces Transplanting Shock in Machine-Transplanted Rice by Improving the Growth and Antioxidant Systems. Jiangsu Collaborative Innovation Center for Modern Crop Production. Nanjing Agricultural University, Nanjing, China. *Frontier in Plant Science* 872(7): 1-10.

REVISIÓN DE LITERATURA

Clasificación Taxonómica de la higuera

La higuera pertenece al reino vegetal, dentro de la división Magnoliophyta, pertenece a la subclase Magnolidae, clase Magnoliopsidae, en el orden Urticales, el cual incluye a la familia Moraceae, donde se encuentra el género *Ficus*, en la cual está la higuera *Ficus carica* L. (Cronquist, 1981).

Propiedades del higo

El higo aporta diferentes minerales como K, Ca, Mg, Na, Ha, Zn y Cu, además vitaminas A, C, E, K, B6, niacina, tiamina, riboflavina, folato alimenticio y fibra asimilable, tiene un alto contenido energético 74 kcal por cada 100 gr, por su propiedades es denominado superalimento (USDA, 2015), además, contiene fenoles y antocianinas, 1,469.85 y 334.60 mg por cada 100 gr de tejido fresco, respectivamente (García, 2015).

Características botánicas de la higuera

La planta tiene un sistema radical fasciculado y fibroso, el tallo presenta crecimiento secundario, es de color verde y presenta lenticelas poco marcadas, entrenudos cilíndricos y cortesa lisa (Gaaliche et al., 2016), y porta hojas palmeadas, el tipo de fotosíntesis es C3 (Caetano et al., 2005). La infrutescencia llamada sicono, está formado un escapo carnoso y es conocido comúnmente como higo (Gaaliche et al., 2011). Los colores de la epidermis externa varía según la variedad (Juárez, 2015). Estudios muestran que extractos de hojas pueden inhibir el desarrollo de nematodos (Guo et al., 2016), puede llegar alcanzar la planta hasta 3 metros en un ciclo agrícola (Muños et al., 2015). Cuando la higuera es adulta presenta entrenudos cortos.

Tipos y variedades de higuera

De acuerdo con la polinización existen cuatro tipos de higuera; Comunes, Smyrna, San Pedro y Caprifig, sin embargo, sólo las higueras Comunes existen en nuestro país, las

cuales tienen la característica de auto polinizarse pero no ocurre la fecundación, se les denomina partenocárpicas. Rosianzkey et al.(2016) encontró que las variedades partenocárpicas entran más rápido a producción por la degradación de la clorofila del higo en comparación con las tipo Smyrna, San Pedro (segunda producción) y Caprifig, que son de polinización cruzada, necesitando de la avispa *Blastophaga psenes*. Sin embargo, también existen muchos otros cultivares desconocidos en nuestro país con mucho potencial. Por otro lado Rodrigues et al., (2012) en Brasil, realizó la irradiación de varetas de la variedad 'Roxo de Valinhos' para obtener variabilidad genética de fácil propagación, y en nuestro país García (2015), mencionó que en México tenemos variedades de higuera distintas a nivel genético.

Producción Mundial y Nacional

En el mundo existen 54 países productores de higo, los principales son: Turquía con más de 298 914 toneladas, Egipto con 153 089 toneladas y Argelia con 117 100 toneladas, México cuenta con 5 255 toneladas al 2013, aportando en 0.47% de la producción mundial. En rendimiento promedio Colombia lidera la producción con 18 toneladas por hectárea con la "Brown-Turkey". (FAO, 2013). De acuerdo con los datos del Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP, 2014), existen 1,345.5 ha plantadas con higo con producción promedio de 5 t·h⁻¹. El volumen y rendimiento de higo (toneladas) por estado es el siguiente: Morelos 3815.85 t y 5.57 t·h⁻¹, Baja California Sur 676.18 t y 2.52 t·h⁻¹, Hidalgo 483.1 t y 6.9 t·h⁻¹, Veracruz 480 t y 12 t·h⁻¹, Puebla 274.63 t y 3.43 t·h⁻¹, Distrito Federal 110.58 t y 4.9 t·h⁻¹, Durango 98.9 t y 6.18 t·h⁻¹, Sonora 71.5 t y 5.5 t·h⁻¹, San Luis Potosí 36.5 t y 3.65 t·h⁻¹, Zacatecas 30.2 t y 10 t·h⁻¹, y Baja California 5 t·h⁻¹. La cosecha se realiza de manera manual, debido a la fragilidad del fruto, laborando mujeres en su mayoría, ayudando a la economía familiar de las regiones productoras, teniendo una derrama económica de 50 millones de pesos m.n. La rentabilidad en la producción de higo, favoreció el aumento del cultivo en los últimos años, siendo una buena opción su producción y sobre todo para la exportación, como lo hicieron Baja California Sur, Morelos, Jalisco y Puebla recientemente con 'Black mission' y 'Kadota' (Juárez, 2015).

Virus Mosaico de la Higuera (FMV)

El virus mosaico de la higuera ó Fig Mosaic Virus (FMV) es un problema en los sistemas de producción, deformando hojas y quedando un manchado aceitoso, acortando los entrenudos y deformando higos, afectando severamente a las variedades de epidermis oscura, como la Black mission (Juárez, 2015), coincidiendo con lo reportado por Ishikawa et al. (2012). Caglayan et al. (2012) afirmó que el principal transmisor es un insecto llamado *Aceria ficus*, aunque Lazreg et al. (2011) encontró que extractos de hojas de higuera pueden controlar problemas de viroides en humanos. El virus mosaico de la higuera es un virus de ARN con cadena negativa, para su detección normalmente se usa la Reacción de Transcripción Inversa-Cadena de la Polimerasa (RT-PCR) usando cebadores específicos (primers) para FMV, sin embargo en Japón con el método de Transcripción Inversa enlazado mediante Amplificación Isotérmica (RT-LAMP) usando un conjunto de cebadores de orientación ARN3 en ARN total extraído de hojas dio como resultado la detección rápida en 15 min (Ishikawa et al., 2015), por otro lado Mitrofanova et al., (2016) utilizó el cultivo *in vitro* con un medio Modificado Plant Woody (WPM), suplementado con ribavirina para la quimioterapia para así obtener de plantas libres de virus. Ishikawa et al. (2012) encontró que con el cultivo *in vitro* de meristemos es posible obtener planta sana, libre del virus mosaico de la higuera (FMV), sin embargo no se ha profundizado en el estudio del virus en nuestro país, solamente se sabe que existe presencia.

Métodos de propagación

Las variedades partenocárpicas, mantienen su información genética (Hartman et al., 2011). Se debe propagar material que esté en plena producción para entrar temprano a producción (6 meses después del trasplante), existen diferentes métodos de propagación de higuera; estacas, hijuelos, acodos, *in vitro*, y por semilla (utilizada principalmente con fines de investigación, ya que la obtención de las nuevas plantas tardarán un periodo 8 años, dependiendo de la variedad) (Storey, 1975), por otro lado, Kots et al. (2011) mencionó que mediante el uso de injertos es posible acortar juvenilidad en higuera.

Propagación por estacas

Es el método más utilizado, Hartmann et al. (2002) divide el proceso de formación de raíces adventicias en las estacas de tallo en tres fases; iniciación de los grupos de células meristemáticas, diferenciación en primordios de raíz y por último la formación de conexiones vasculares con los tejidos conductores de la estacas. En la higuera se inicia con el corte de estacas del tallo del año anterior, en plena producción, de alrededor de 20 a 30 cm de longitud, con un mínimo de 3 nudos, con un diámetro de 1 a 1.5 cm, normalmente se usan concentraciones de 1000 a 2000 mg L⁻¹ IBA en la base de las estacas previamente desinfectadas, el porcentaje de prendimiento ronda entre el 10 al 45%, dependiendo de la variedad (Bisi et al., 2016), asimismo Nava et al. (2014) reportó que la mejor colecta de varetas es en julio (tallo embarneado) para Brasil, aunque Aradillas (2015) reportó una supervivencia del 26% en la variedad Netzahualcóyotl.

Propagación por hijuelos

Cuando la higuera inicia su crecimiento, también existe crecimiento algunos brotes laterales que se desarrollan sobre la base del tallo principal, a las cuales llamamos; hijuelos, chupones, mamones o repollos (en España y Francia); en este método se selecciona el hijuelo que tenga higos, después se escarba un poco la base del tallo de la planta madre, para extraer el hijuelo, es necesario escavar lo suficiente para cortarlo con raíz y enseguida se trasplanta a una maceta, algunas hojas pueden caerse en el transcurso de la aclimatación (Juárez, 2015).

Propagación por acodos

El objetivo de este método es hacer que un tallo desarrolle raíces sin tener que separarlo de la planta madre (Hartmann et al., 2011), se puede realizar una incisión en el tallo o no, Bisi et al., (2016) reportó una concentración de 1000 mg por litro de AIB para enraizar, enseguida se cubre con material inerte y se embolsa amarrándola por ambos extremos, una vez que la rama ha emitido raíces, de 45 a 60 días dependiendo de la variedad (Muños et al. 2015). Este método es seguro, pero debilita a la planta y

se obtiene pocas plantas por rama, en casos extremos puede matar a la planta madre, en huertos comerciales, la productividad cae drásticamente el siguiente año.

Los laticíferos son células especializadas que contienen suspensión de muchas partículas pequeñas en una savia de composición no especificada, aunque la mayoría de las veces es de color lechoso, esta savia también puede ser amarilla, naranja, roja, marrón o incluso incolora. La combinación de suspensión más savia se llama "látex", característica del género *Ficus*. En estudios anteriores se ha encontrado que los laticíferos desempeñan funciones importantes como la resistencia a enfermedades y patógenos, proporcionando protección de la planta contra herbivoría, pudiendo ser tóxico e inhibir la proliferación de microorganismos, además al coagular tiene la función de sellar las heridas de las plantas y funcionando como barrera física, impidiendo formación y diferenciación de la celular, para proteger al tejido vascular. Estas propiedades del látex proporcionan una mayor ventaja adaptativa a estas plantas en relación a las no latexcentes. La formación de los laticíferos de la higuera son de tipo ramificado; éstos pasan por el córtex y médula y penetran en las hojas y en las inflorescencias. Se observaron primero los laticíferos situados en los ápices de los brotes en crecimiento, encontrándose la siguiente secuencia de cambios estructurales. Es indispensable hacer lavados del latex para evitar la coagulación y obtener la diferenciación celular para promover la emisión de primordios de raíz.

Propagación *in vitro*

La investigación de nuevas técnicas de cultivo *in vitro* está siendo objeto de numerosos estudios en todo el mundo, con el fin de optimizar y disminuir los costos de producción de las plántulas con interés agronómico. El cultivo *in vitro* utiliza varias partes de la planta, haciendo uso de la totipotencia celular, para distintos fines; propagación, obtención de plantas libres de patógenos, mejoramiento genético, variabilidad genética, estudios fisiológicos o bioquímicos. También se ha utilizado para saneamiento viral, en cultivo de higuera, partiendo del cultivo de meristemas como explante (Mitrofanova et al., 2016). Bayouh et al. (2015) encontró que el medio de Murashige y Skoog (MS) que contiene 0,2 mg L⁻¹ benzyle amino purina (BAP), 0,1 mg L⁻¹ 1-naftalenacetico Ácido (NAA) y 0,1 mg L⁻¹ de ácido giberélico (AG3) es útil para la formación de raíces, tamaño

de 0.96 cm en la variedad Soltani. Por otro lado Aradillas (2015) mencionó que con la aplicación de $2 \mu\text{g L}^{-1}$ de 1-Triancontanol, 0.1 mg L^{-1} de benciladenina (BA) y 0.01 mg L^{-1} de ácido naftal- acético (ANA) se aumenta la tasa de multiplicación a 2 brotes por explante, 4 hojas y 2.3 cm de tamaño, en la variedad Netzahualcóyotl, logra estabilizar en 6 meses con 7 sub cultivos. Por otro lado, Corredoira et al., (2011) encontró que en la multiplicación de *Alnus glutinosa* el mejor tratamiento fue el 2 mg L^{-1} de BA y $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ de AIA, estabiliza entre 5 y 12 meses.

Sistemas de Inmersión Temporal

Los sistemas de inmersión temporal, tienen su fundamento en la inmersión de uno o varios explantes en solución nutritiva, en un tiempo determinado. Debido al mayor contacto del explante (tejido vegetal) con el medio líquido, la absorción de nutrientes es mayor, así como el intercambio gaseoso versus medio semisólido (agar), ayudando a la activación de los estomas para la transpiración y realizar el intercambio gaseoso, resultando en el aumento de la proliferación de brotes por explante (Florez et al.2016). El tiempo de inmersión, es decir, duración o frecuencia, es el parámetro más decisivo para la eficiencia del sistema. La inmersión temporal también mejora generalmente la calidad del material vegetal, aumentando el vigor de los brotes, siendo el caso de fresa (Debnath, S.C. 2008). Existen diferentes tipos, dependiendo de su funcionamiento y mecanización, sin embargo, los más utilizados son los Biorreactores de Inmersión Temporal. Los Biorreactores son sistemas abiertos que mantienen un ambiente en constante movimiento, utilizada en cultivo de tejidos, en donde se hace inmersión temporal de todo el explante en un medio líquido (Florez et al. 2016), evitando la vitrificación del explante por el contacto con el medio semisólido (agar), además renueva los gases que se acumulan en el medio y controlando los tiempos de inmersión se evita la hiperhidricidad, evitando toxicidad por estos. Existen varios tipos, sin embargo el más usado es el Recipiente de Inmersión Temporal Automático (RITA), el cual tiene un software que controla el tiempo de inmersión del tejido en el medio líquido y hace remoción de gases acumulados. Aradillas (2015) reportó que el mejor tratamiento de inmersión temporal para higuera variedad Netzahualcóyotl es el de 1 minuto cada 6 horas. Asimismo Quiala et al. (2012) demostraron que con la utilización

del Sistema de Inmersión Temporal (SIT) se obtienen el doble de brotes por explante (10.3) a comparación del Sistema semisólido (SS). Teixeira et al. (2016) también encontró que se multiplica al doble (14) el número de plantas regeneradas por callo, además se incrementó 12 veces (177 gr) la biomasa del callo en palma de aceite (*Elaeis guineensis*) en comparación con el sistema semisólido (SS), mejorando el rendimiento biológico. Por otro lado la tasa de multiplicación no sólo depende del tipo de Biorreactor, sino de la especie y su totipotencia celular, como lo demuestra Newton et al. (2009) haciendo la propagación de piña utilizando Biorreactor RITA y Biorreactor de Inmersión por Burbujas (BIB), en donde obtiene 2.3 brotes más en comparación con RITA. También las plantas obtenidas del Biorreactor tipo RITA tienen mayor porcentaje de supervivencia en la fase de aclimatación en comparación con las de medio sólido, debido al intercambio gaseoso que inicia dentro del sistema, con el movimiento del aire ingresando dióxido de carbono y liberando oxígeno (Vidal et al. 2015). Por lo tanto, el uso de esta nueva tecnología (Biorreactores tipo RITA) es un método prometedor para la propagación de la higuera.

Control de microorganismos *in vitro*

Las condiciones del cultivo *in vitro* son propicias para el crecimiento de microorganismos (hongos, bacterias y levaduras), puede ser un problema serio, estos pueden dañar o matar el explante que se tenga en el medio. Cuando la desinfección de los explantes iniciales falla, y los microorganismos no se detectan en la fase inicial de propagación, pueden sobrevivir no observadas como una contaminación en los explantes de la planta y sólo aparecen cuando la población de es grande (crecimiento de los microorganismos en el medio). Czaja et al. (2016) reportó desarrollo de *Botrytis spp.*, en higos a 25°C, sin embargo, Juárez (2015) mencionó que puede estar contaminados el explante que se utilice, como en ápices, tallos y hojas, debido a la acumulación de esporas en las lenticelas, en los tricomas y en las paredes celulares infectadas. Por otro lado Gómez (2016) examinó una cubierta polimérica de quitosano-aceite esencial, que inhibe el crecimiento de mohos y levaduras en higos.

Es importante tanto la descontaminación del explante como la del medio, existen diferentes sustancias para ello, Aradillas (2015) presentó evidencia que usando etanol

(OH) al 70 % y Cl al 20 % provocaron una buena desinfección en explantes de higuera, también Paul et al., (2011) concluyó que los brotes apicales si son sumergidos en 70% de alcohol etílico y además en hipoclorito de sodio al 2,5% y añadiendo 250 mg L⁻¹ de antibiótico ampicilina de sodio se obtiene mejor resultado. Por su parte, Ruiz et al., (2016) encontraron que las levaduras *Hanseniaspora opuntiae* L479 y L672 *Metschnikowia pulcherrima* son antagónicas al desarrollo de hongos en higos. Por otro lado se restringió el crecimiento de varias bacterias (*Methylobacterium lusitanum*, *Paenibacillus spp.*, *Pseudomonas putida*, *Serratia marcescens* y *Staphylococcus pasteurii*) en la multiplicación y en el enraizamiento del anturio, de la zarzamora, del crisantemo, de la mora, de la frambuesa y de la fresa, utilizando Vitrofur al a concentraciones de 25 mg L⁻¹, 35 mg L⁻¹, o 45 mg L⁻¹, liberando durante 21 días el medio de cultivo (agar *in vitro*) sin contaminación, también aumenta el número de brotes axilares en mora y disminuye el número y longitud de las raíces (Orlikowska et al. 2012). La nanotecnología también es una área de estudio que proporciona control sobre factores a escala nanométrica. La utilización de nano partículas de plata (AgNps) en el área agrícola específicamente en cultivos *in vitro* fue probada en explantes de vainilla y anturio, para desinfección y sub cultivos, en un sistema RITA, agregado en el medio líquido, sin embargo, también se ha utilizado con fines de desinfección en humanos, controlando gangrena en pies de personas con diabetes (Ayala, N.N.V. 2010), también se ha probado en pocos cultivos uno de ellos la cebolla, en donde se protegió durante 30 a 90 días a la planta en campo, también se notó menor oxidación de los tejidos (Juárez et al. 2013). Siendo buen prospecto a probarse para desinfección de explantes.

Hormonas reguladoras de crecimiento

Existen varias hormonas reguladores del crecimiento vegetativo, en la propagación *in vitro* las más utilizadas son; bencil amino purina (BAP), ácido 1-naftalenacético (NAA), ácido giberélico (AG3) , benciladenina (BA), ácido Indolacético(AIA), ácido abscisico (ABA), etileno y ácido Indol butírico (AIB). Otras menos utilizadas; jasmonatos, brasinoesteroides, estragalolactonas, ácido salicílico, peptidos hormonales, poliaminas, zeatina y 1-triacontanol. La zeatina (Z) es una citocinina probada en varios cultivos,

utilizado *in vitro* mejorando el crecimiento del callo en las primeras etapas de la embriogénesis (Blintsov et al. 2001) y el 1-Triacontanol, es un promotor del crecimiento, es un alcohol saturado de cadena larga, que promueve el crecimiento en aplicación exógena, se ha probado en crecimiento de algas aumentando su biomasa 2 veces más en comparación sin su aplicación (Tastan et al. 2016). Además se ha encontrado que cuando se aplica 1-Triacontanol (10 μM) aumenta el contenido de clorofila y sacarosa, disminuyendo el daño oxidativo, mejoró significativamente la actividad de la catalasa (CAT) y la peroxidasa de guaiacol (POD), demostrando que el POD puede desempeñar un papel importante en la eliminación de H_2O_2 , promoviendo también la emisión de tallos, en el cultivo de arroz (Xiaochun et al. 2016). Sin embargo, se tienen que utilizar diferentes concentraciones debido a que se desconoce el comportamiento de cada variedad de higo; Black mission, Kadota y Gómez. También se puede adicionar nutrientes como Ca y Mg que ayudan a estimular el desarrollo de raíces (Neem et al., 2011). La utilización del AIB, y del 1-triacontanol son opciones para mejorar la propagación de explantes de higuera, variando concentraciones y formas de aplicación.

Mini estacas *in vitro*

Para la propagación masiva con poco material se utiliza mini estacas de 3 a 4 cm, con un máximo de 2 nudos; además con esto, se asegura la no variación somaclonal de la variedad, debido a que se utilizan meristemos diferenciados en la mini estaca. Uribe et al. (2012) obtuvieron un 87,5 % de enraizamiento adventicio con 1 mg L^{-1} de AIB y un 75% con 3 mg L^{-1} de ANA, también encontraron que se tiene un 100 % de supervivencia con la adición de 3 mg L^{-1} de AIB al medio de cultivo en plantas de *Nothofagus glauca*. Por otro lado Sharma et al. (2015) encontraron que en un medio MS adicionado con 7,5 M de 6-benciladenina (BA) más 0.5 μM ácido alfa-naftalenacético (NAA) mejora la tasa de multiplicación en higuera, mientras que Aradillas (2015) encontró que con 1000 ppm de Radix (ácido indol-3-butirico (AIB)) enraizó un 55% de mini estacas de la variedad 'Nezahualcóyotl'. Las concentraciones probadas de AIB son un indicador para establecer el experimento, haciendo variar la concentración se espera buena respuesta de enraizamiento de las variedades 'Black mission', 'Kadota', 'Gómez' y 'Nezahualcóyotl', disminuyendo la posibilidad de

variación, además es un método de propagación fácil de replicar. El cultivo *in vitro* es un método para la multiplicación masiva con poco material vegetativo y en menor tiempo, además vigoriza y desinfecta, la propagación por mini estacas es importante para evitar variación somaclonal y mantener la precocidad en la producción.

Literatura citada

- Aradillas T.L. 2015. Micropropagación de higuera (*Ficus carica* L. cv. Netzahualcóyotl) a partir de yemas en condiciones de inmersión temporal. Mtro. Ciencias. Recursos Genéticos y Productividad-Fruticultura. Campus Montecillo-Colegio de Postgraduados. Edo. Méx. México. 86 pp.
- Ayala N.N.V. 2010. Nanopartículas de plata como microbicidas: actividad y mecanismos de acción contra la infección por el virus de inmunodeficiencia humana (vih) y diferentes bacterias resistentes a antibióticos. Doctor en Ciencias. Facultad de Ciencias Biológicas - Microbiología. Universidad Autónoma de Nuevo León. Nuevo León. México. 97 pp.
- Bisi R.B., Locatelli, G., Barbosa, C.M.A., Pio, R., Balbi, R.V. 2016. Rooting of stem segments from fig tree cultivars. *Acta Scientiarum – Agronomy* Volume 38(3): 379-385.
- Blintsov A.N., Gusakovskaia, M.A., Ermakov, I.P. 2001. A new micromethod for differential quantitative assay of zeatin and zeatin riboside. Moscow State University, Vorob'evy gory, Moscow, Russia. *Prikladnaia biokhimiia i mikrobiologiia* (2001) 37(4): 494-499.
- Caglayan K., Elci E., Ulubas, S. C., Kaya, K., Gazel, M., Medina, V. 2012. Detection of fig mosaic virus in viruliferous eriophyid mite *Aceria ficus*. *Journal of Plant Pathology* Volume 94(3): 629-634.
- Caetano L.C.S.; A. Cordeiro de Carvalho J.; Campostrine, E.; Fernandes de Sousa, E.; K.R. Murakami N.; C. Sales B. 2005. Efeito do número de ramos productivos sobre el desenvolvimiento da área foliar e produtividade da figueira. *Revista Brasileira de Fruticultura* 27 (3): 426-429.

- Condit I.J. 1955. Fig Varieties. A Monograph. Hildgardia. 23(11). 323-539.
- Cronquist A. 1981. An integrated system of classification of flowering plants. Columbia Univ. Press. N.Y. USA. 1262 pp.
- Corredoira E., Janeiro L. V. y San Jose M.C. 2011. Aplicación de técnicas de cultivo in vitro en la propagación de Aliso con vista a su conservación. IBADER-Universidad de Santiago de Compostela Recursos Rurais (7): 49-57.
- Cronquist A. 1981. An Integrated System of Classification of Flowering Plants. Columbia University Press, New York, NY. Hardbound. 1262 pp
- Czaja R., Moreira R., Rozwalka L.C., Figueiredo J.A.G., De Mio L.L.M. 2016. Gray mold in immature fig fruit: pathogenicity and growth temperatura. CIENCIA RURAL Volumen: 46(9): 1524-1527.
- Debnath S. C. 2008. Developing a scale-up system for the in vitro multiplication of thidiazuron-induced strawberry shoots using a bioreactor. Can. J. Plant Sci. 88: 737-746.
- Florez L.S., Curtis, S.M., Shaw, E. S., Hamaker, K. N., Larsen, S.J., Curtis R.W. 2016. A Temporary Immersion Plant Propagation Bioreactor with Decoupled Gas and Liquid Flows for Enhanced Control of Gas Phase. Wiley Online Library. Dept. of Chemical Engineering. The Pennsylvania State University, University Park: 337-345.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). 2013. FAOSTAT. Agroecological Zones Project. Vol. 111 Methodology and results for México, Central and South America. Rome. 20 de Octubre de 2018. <<http://faostat3.fao.org/browse/Q/QC/S>>.
- Gaaliche B., Aïachi-Mezghani, M., Trad, M., Costes, E., Lauri, P.E., Mars, M. 2016. Shoot Architecture and Morphology of Different Branch Orders in Fig Tree (*Ficus carica* L.). International Journal of Fruit Science Volume 16(4):378-394.

- Gaaliche B., Lauri, P.E., Trad, M., Costes, E., Mars, M. 2011. Interactions between vegetative and generative growth and between crop generations in fig tree (*Ficus carica* L.). *Scientia Horticulturae* Volume 131(1): 22-28.
- García R. M. 2015. Caracterización Morfológica y Genética de variedades mexicanas de higo (*Ficus carica* L.). Dra. Ciencias. Recursos Genéticos y Productividad-Fisiología Vegetal. Campus Montecillo- Colegio de Postgraduados. Edo. Méx. México. 158 pp.
- Gómez R.M. 2016. Manejo Postcosecha en higo (*Ficus carica* L.) con una cubierta de quitosano-aceite esencial. Ing. Agroindustrial. Departamento de Ingeniería Agroindustrial. Universidad Autónoma Chapingo. Edo. Méx. México. 108 pp.
- Guo Q., Du G., He H., Xu H., Guo D., Li R. 2016. Two nematicidal furocoumarins from *Ficus carica* L. leaves and their physiological effects on pine wood nematode (*Bursaphelenchus xylophilus*). *Natural Product Research* Volume 30(17):1969-1973.
- Hartmann H. T., Hudson, T., Kester, D. E., Dale, E. K., Davies Junior, F. T., & Geneve, R. L. 2011. *Plant propagation: principles e practices*. 8th ed. Boston, MA: Prentice Hall. 915 pp.
- Ishikawa K., Maejima, K., Nagashima, S., Sawamura, N., Takinami, Y., Komatsu, K., Hashimoto, M., Yamaji, Y., Yamamoto, J., Namba, S. 2012. First report of fig mosaic virus infecting common fig (*Ficus carica*) in Japan. *The Phytopathological Society of Japan and Springer Japan. J Gen Plant Pathol* 78:136–139.
- Ishikawa K., Maejima, K., Netsu, O., Fukuoka, M., Nijo, T., Hashimoto, M., Takata, D., Yamaji, Y., Namba, S. 2015. Rapid detection of fig mosaic virus using reverse transcription loop-mediated isothermal amplification. *The Phytopathological Society of Japan and Springer Japan. J Gen Plant Pathol* 81: 382–389.
- Joseph B. and Justin R. S. 2011. Pharmacognostic and phytochemical properties of *Ficus carica* linn - An overview. Interdisciplinary Research Unit, Department of

- Biotechnology, Malankara Catholic College, Mariagiri, K.K District, India. International Journal of PharmTech Research Volume 3(1): 8-1.
- Juárez M. A., Rosales, V.J.L., Ortega, O. H., Cabrera, F. M., Ramírez, H., Benavides, M. A. 2013. Accumulation of silver nanoparticles and its effect on the antioxidant capacity in *Allium cepa* L. Journal Phyton (2013) 82: 91-97.
- Juárez M. L. 2015. Producción intensiva de higo (*Ficus carica* L.) bajo macro túnel en La Comarca Lagunera, Durango. Tesis de licenciatura Ing. Agrónomo. Departamento de Fitotecnia. Universidad Autónoma Chapingo. Edo. Méx. México. 90 pp.
- Kotz T.E., Pio, R., Campagnolo, M.A., Chagas, E.A., Dalastra, I.M. 2011. Grafting fig tree 'Roxo de Valinhos' by budding and cleft. Bragantia Volume 70(2): 344-348.
- Lazreg A. H., Gaaliche, B., Fekih, A., Mars, M., Aouni, M., Chaumon, J.P., Said, K. 2011. In vitro cytotoxic and antiviral activities of *Ficus carica* latex extracts. Natural Product Research Volume 25(3): 310-319.
- Mitrofanova I.V., Mitrofanova O.V., Lesnikova-Sedoshenko N.P., Chelombit S.V., Shishkina, E.L., Chirkov, S.N. 2016. Phytosanitary status of *Ficus carica* collection orchards in Nikita Botanical Gardens and biotechnology of fig plants regeneration. Acta Horticulturae Volume 1139: 303-309.
- Muños V. A., Macías, R.H., Rivera, G.M., Gonzales, C.G., Villa, C.M. 2015. Desarrollo Fenológico de Higuera (*Ficus carica* L.) Cultivada en Altas Densidades de Población. Memoria de la XXVII Semana Internacional de Agronomía FAZ-UJED: 309-315.
- Nava G.A., Wagner, A., Mezalira, E., Cassol, D.A., Alegretti, A.L. 2014. Rooting of hardwood cuttings of roxo de valinhos fig (*Ficus carica* L.) with different propagation strategies. Revista Ceres Volume 61(6): 989-996.
- Neem M., Masrroor, M., Khan, A. y Moinuddin. 2011. Triacontanol: A Potenet Plant Growth Regulator in Agriculture. Journal of Plant Interactions, 7(2): 129-142.

- Newton S.G., Haruko, A.A., Sugitani, C.J., Franke, P.A.C., Rigon, S.M., Lorenci, W.A., Biasi, L.A., Ricardo, S.C. 2009. Utilization of the Biorreactor of Imersion by Bubbles at the Micropropagation of *Ananas comosus* L. Merrill. *Brazilian Archives of Biology And Technology* 2009(52): 37-43.
- Orlikowska T., Zawadzka, M., Zenkteler, E., Sobiczewski, P. 2012. Influence of the biocides PPMtm and Vitrofurax on bacteria isolated from contaminated plant tissue cultures and on plant microshoots grown on various media. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology* (2012) 87:3.
- Palú E.G., Corrêa, L.S., Suzuki, A.N., Boliani, A.C. 2011. Use of antibiotics for the control of endogenous bacteria aiming the micropropagation of fig trees. *Revista Brasileira de Fruticultura* Volume 33(2): 587-592.
- Quiala E., Cañal, M.J., Mejion, M., Rodríguez, R., Chávez, M., Valledor, L., de Feria, M., Barbón, R. 2012. Morphological y Physiological Responses of Proliferating Shoots of Teak to Temporary Inmersionand BTA Treatments.*Plant Cells Tiss Organ Cult* 109:223-234.
- Rodrigues M.G.F., Corrêa, L.S., dos Santos, P.C., Neto, A.T. 2012. Fig clones selection of cv. roxo de Valinhos obtained by irradiated buds. *Revista Brasileira de Fruticultura* Volume 34(2): 604-611.
- Rosianskey Y., Dahan, Y., Yadav, S., Freiman, Z.E., Milo-Cochavi, S., Kerem, Z., Eyal, Y., Flaishman, M.A. 2016. Chlorophyll metabolism in pollinated vs. parthenocarpic fig fruits throughout development and ripening. *Planta* Volume 244(2): 491-504.
- Ruiz M.S., Martín, A., Villalobos, M.C., Calle, A., Serradilla, M.J., Córdoba, M.G., Hernández, A. 2016. Yeasts isolated from figs (*Ficus carica* L.) as biocontrol agents of postharvest fruit diseases. *Food Microbiology*. Volume 57: 45-53.
- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). 2014. Anuario Estadístico de Producción Agrícola. México D.F. 28 de Abril de 2018. <<http://www.siap.gob.mx/cierre-de-la-produccion-agricola-por-cultivo/>>.

- Sharma S., Shahzad, A., Mahmood S., Saeed, T. 2015. High-frequency clonal propagation, encapsulation of nodal segments for short-term storage and germplasm exchange of *Ficus carica* L. *Trees - Structure and Function* Volume 29 (2): 345-353.
- Storey W.B. 1975. Fig; *Advances in fruitbreeding*. Purdue Univ. Press, West Lafayette, IN. 568-589.
- Tastan B.E., Duygu, E., Ilbas, M., Donmez, G. 2016. Enhancement of microalgal biomass production and dissolved inorganic C fixation from actual coal flue gas by exogenous salicylic acid and 1-triacontanol growth promoters. *Scientific and Technological Research Council of Turkey* (103): 598-604.
- United States Department of Agriculture (USDA). 2015. *Agricultural statistics for 2015*. U. S. Dept., Agr., Washington D.C. 30 de Agosto de 2018. <http://www.usda.gov/wps/portal/usda/usdahome?navid=EN_ESPANOL>.
- Uribe E. M., Ulloa J., Delaveau C., Saez K., Muñoz F. y Cartes P. 2012. Influencia de las Auxinas Sobre el Enraizamiento in vitro de Microtallos de *Nathofagus glauca* (Phil.) Krasser. *Gayana Bot.* 69(1): 105-112.
- Vidal N., Blanco, D., Cuenca, B. 2015. A temporary immersion system for micropropagation of axillary shoots of hybrid chestnut. *Plant Cell Tiss Organ Cult* (2015) 123: 229–243.
- Xiaochun L., Qiuyi, Z., Yuxiang, L., Ganghua, L., Yanfeng, D., Shaohua, W., Zhenghui, L., She, T., Chengqiang, D., Lin, C. 2016. Triacntanol Reduces Transplanting Shock in Machine-Transplanted Rice by Improving the Growth and Antioxidant Systems. *Jiangsu Collaborative Innovation Center for Modern Crop Production*. Nanjing Agricultural University, Nanjing, China. *Frontier in Plant Science* 872 (7): 1-10.

CAPÍTULO I. CUANTIFICACIÓN DE CARBOHIDRATOS Y CLOROFILA DE CUATRO VARIEDADES DE HIGUERA.

1.1 Resumen

Las clorofilas son pigmentos de color verde que se encuentran en las granas y tilacoides de los cloroplastos, su principal función es la fotosíntesis, proceso que absorber energía de la luz solar y en conjunto con el agua la transforman en compuestos orgánicos. Algunos productos de la fotosíntesis son los carbohidratos, almacenados como almidón, glucógeno ó sacarosa, que son reservas metabólicas en las plantas. En higuera aún no se conoce información alguna en cuantificación de carhidratos y clorofila, tener datos cuantitativos ayuda a tener bases y fundamentos para el análisis y toma de decisiones en la propagación, principalmente cuando es via asexual, y notar su efecto en la propagación de 'Black mission', 'Kadota', 'Gómez' y 'Netzahualcoyotl'. El objetivo del presente trabajo fue determinar carbohidratos (glucosa) de tallo y cuantificar concentración de clorofila de las hojas, de las cuatro variedades de higuera. En este estudio se utilizó el método Antrona descrito por Witham et al. (1971), para cuantificación de carbohidratos de tallo (1 cm), y espectrofotometría para la cuantificación de clorofila de hojas (5 gramos), con 5 repeticiones por variedad. En la cuantificación de carbohidratos (glucosa) de los tallos, la variedad Netzahualcóyotl presentó mayor concentración con 6.16 mg, mientras que 'Black mission', 'Kadota', y 'Gómez' presentaron: 4.32, 3.76 y 2.72 mg, respectivamente, así mismo 'Netzahalcóyotl' también presenta 0.77 mg de clorofila, mayor concetración de clorofila a y b en hojas, con respecto a 'Black mission', 'Kadota' y 'Gómez', con 0.54, 0.47 y 0.34 mg de clorofila por cada 100 mL de solución, la cantidad de carbohidratos acumulados en el tallo como glucosa, aumentan la probabilidad de brotación y enraizamiento para la variedad, ya sea mediante el cultivo *in vitro* ó enraizamiento *in vivo*, la mayor concentración de clorofila aporta mayor eficiencia en la captación de luz por lo tanto mejora el proceso de fotosíntesis. La relación clorofila-carbohidratos esta estrechamente relacionada, es decir, a mayor concentración de clorofila a y b en hojas, mayor acumulación de carbohidratos en forma de glucosa en los tallos, existiendo diferencia entre variedades.

Palabras clave: cuantificación, carbohidratos, glucosa y clorofila.

1.2 Abstract

Chlorophylls are green pigments found in the granules and thylakoids of chloroplasts, their main function is photosynthesis, a process that absorbs energy from sunlight and, together with water, transforms it into organic compounds. Some products of photosynthesis are carbohydrates, stored as starch, glycogen or sucrose, which are metabolic reserves in plants. In the fig tree there is still no known information on the quantification of carbs and chlorophyll, having quantitative data helps to have bases and foundations for the analysis and decision making in the propagation, mainly when it is asexual, and to notice its effect in the propagation of 'Black mission', 'Kadota', 'Gómez' and 'Netzahualcoyotl'. The objective of the present work was to determine stem carbohydrates (glucose) and quantify chlorophyll concentration of the leaves of the four fig varieties. In this study, the Antrona method described by Witham et al. (1971), for quantification of stem carbohydrates (1 cm), and spectrophotometry for the quantification of chlorophyll of leaves (5 grams), with 5 repetitions per variety. In the quantification of carbohydrates (glucose) of the stems, the Netzahualcáyotl variety presented higher concentration with 6.16 mg, while 'Black mission', 'Kadota', and 'Gómez' presented: 4.32, 3.76 and 2.72 mg, respectively, same 'Netzahalcáyotl' also presents 0.77 mg of chlorophyll, greater concentration of chlorophyll a and b in leaves, with respect to 'Black mission', 'Kadota' and 'Gómez', with 0.54, 0.47 and 0.34 mg of chlorophyll per 100 mL of solution, the amount of carbohydrates accumulated in the stem as glucose increases the likelihood of sprouting and rooting for the variety, either through in vitro cultivation or rooting in vivo, the higher concentration of chlorophyll provides greater efficiency in light capture therefore improves the process of photosynthesis. The chlorophyll-carbohydrate ratio is closely related, that is, the higher concentration of chlorophyll a and b in leaves, the greater accumulation of carbohydrates in the form of glucose in the stems, there being a difference.

Key words: quantification, carbohydrates, glucose and chlorophyll.

1.3 Introducción

Las plantas mediante la fotosíntesis convierten el dióxido de carbono y agua en azúcares, la energía que almacenada esta en forma de ATP y NADPH es entonces usada para convertir el bióxido de carbono a fructosa-6-fosfato (en el ciclo de Calvin) de la cual deriva la glucosa-6-fosfato, o ácido málico (en la vía píruvato-malato). Algunos productos de la fotosíntesis son almacenadas como almidón o como sacarosa, este último es el principal azúcar traslocado para los procesos de biosíntesis y aporte de energía para mantenimiento. Los carbohidratos incluyen: (1) monosacáridos (polihidroxi aldehídos o cetonas), compuestos de 5 carbonos, como la xilosa o arabinosa, y compuestos de 6 carbonos, como la glucosa y la fructosa, las más abundantes, (2) oligosacáridos en los que un grupo hidroxilo de un monosacárido se condensa con el grupo reductor de otro monosacárido (si dos unidades de azúcar se unen de esta manera, se produce un disacárido; una matriz lineal de tres a ocho monosacáridos unidos por enlaces glicosídicos produce oligosacáridos), y (3) polisacáridos que se pueden separar aproximadamente en dos grandes grupos, los llamados polisacáridos estructurales (celulosa, hemicelulosa, lignina) que constituyen o son parte de estructuras mecánicas rígidas en las plantas y polisacáridos nutrientes (almidón y glucógeno) que son reservas metabólicas en las plantas y animales (Southgate 1991). Son fundamentales para la producción de compuestos orgánicos y biosintéticos en plantas, así mismo están relacionadas con la reserva y en su momento producción de materia, ya sea en algún órgano de la misma como: tallo, hoja, raíz ó fruto. Debido a que las concentraciones de glucosa, fructosa y sacarosa son altas, es poco común encontrar otras hexosas distintas. Tener datos cuantitativos de los carbohidratos ayuda a tener bases y fundamentos. No es de extrañar que los cambios tanto cualitativos como cuantitativos en los carbohidratos a menudo acompañen las respuestas de las plantas al estrés.

Las clorofilas son pigmentos de color verde que se encuentran en las granas y tilacoides de los cloroplastos, su principal función es la fotosíntesis, proceso que permite a los organismos absorber energía de la luz solar y en conjunto con el agua la transforman en compuestos orgánicos y oxígeno (Nathan et al. 2006). A su vez, las

clorofilas poseen unas estructuras porfirínicas, formada por cuatro anillos pirrólicos con un átomo de magnesio en su centro, un anillo de ciclopentanona y un éster de fitol unido a uno de los anillos de pirrol que provee a la molécula de una cola lipófila. La diferencia entre las distintas clorofilas existentes (se conocen al menos siete) se encuentran en los sustituyentes que se presentan; así la clorofila "a" (verde azulada) presenta un grupo metilo (CH₃) en el carbono 3, y la "b" (verde amarillenta) un grupo aldehído (CHO) en la misma posición, dando lugar a espectros de absorción distintos para cada tipo, la clorofila a en disolución alcohólica presenta máximos de absorción en 430 nm y 662 nm, mientras que la clorofila b los presenta en 453 nm y 642 nm (Nobel, 2012). Sin embargo muchas de ellas contienen en los plastidios, pigmentos adicionales tales como otras clorofilas (c, d, e), fucoxantinas (amarillo pardo) y ficocianina (azulado), que comunican sus respectivos colores, principalmente en algas (Espinosa et al. 2016).

La espectrofotometría UV-visible es una técnica analítica que permite determinar la concentración de un compuesto en solución. Se basa en que las moléculas absorben las radiaciones electromagnéticas y a su vez que la cantidad de luz absorbida depende de forma lineal de la concentración. Para hacer este tipo de medidas se emplea un espectrofotómetro (Gómez et al., 2005).

Los métodos de para cuantificación de azúcares de basa en la oxidación del azúcar con una solución alcalina de sales metálicas como cobre ó fierro, posteriormente, los metales reducidos se determinan por gravimetría, titulación o colorimétricamente (espectrofotometría). En este estudio se utilizó el método Antrona descrito por Witham et al. (1971), para cuantificación de carbohidratos de tallo, en cuatro variedades de higo: Black mission, Kadota, Gómez y Netzahualcóyotl, también se utilizó espectrofotometría determinar la cantidad de clorofila presente hojas de las mismas variedades.

1.4 Materiales y Métodos

1.4.1 Sitio experimental

La cuantificación se realizó en la época de verano del 2018, en el Laboratorio de Fisiología-Postcosecha, ubicado en el edificio de Laboratorios Generales del Colegio de Postgraduados, Montecillo, Estado de México, a una altitud de 2240 msnm.

1.4.2 Material vegetal

Para cuantificación de carbohidratos se utilizaron tallos de 1 cm de longitud, y para la determinación de clorofila se utilizaron 5 gr de hoja, de cuatro variedades de higuera: Black misión, Kadota, Gómez, y Netzahualcóyotl, las tres primeras procedentes de Gómez Palacio, Durango, y la última es una selección realizada en el Valle de México por el M.C. Alfonso Muratalla Lúa y el Dr. Facundo Barrientos Pérez, Investigador Docente y Profesor Titular respectivamente del Colegio de Postgraduados en diciembre de 1980. Todas las plantas de un año de edad, se cortaron porciones vegetativas de tallo y hoja, a razón de 5 gramos por cada muestra, y se utilizaron 5 repeticiones por variedad.

1.4.3 Metodología para cuantificación de carbohidratos.

Se utilizó la preparación de la solución madre tomando en cuenta que la muestra no se le puede extraer suficiente jugo, debido a que es un tallo. Se tomaron 5 gramos de muestra de tallo, se colocó en un matraz Erlenmeyer de 500 mL, adicionando de 50 a 100 mL de etanol al 80%, se llevó a ebullición durante 5 minutos y después se dejó reposar 24 horas en refrigeración a 5°C, enseguida haciendo uso de papel filtro, se filtró la muestra y se dejó a temperatura ambiente para que eliminar la mayor cantidad de alcohol posible, para después aforar en un matraz a 100 ml con agua destilada, obteniendo la solución madre.

De esta solución madre, se tomaron alícuotas de 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 y 1.0 mL en tubos de ensaye y se ajustaron a 3 mL con agua destilada, a cada tubo se le agrego 6 mL de solución de Antrona (preparada con 0.4 g de antrona en 100 mL de ácido sulfúrico concentrado), esta mezcla se realizó en baño de hielo. Posteriormente se

colocaron los tubos en agua hirviendo durante 3 minutos, pasado este tiempo se sumergieron nuevamente en baño de hielo y se registró la absorbancia a 625 nm mediante un Spectronic 20. Con los datos anteriores se obtuvo la curva estándar obteniendo una regresión lineal como se muestra en la Figura 1.1.

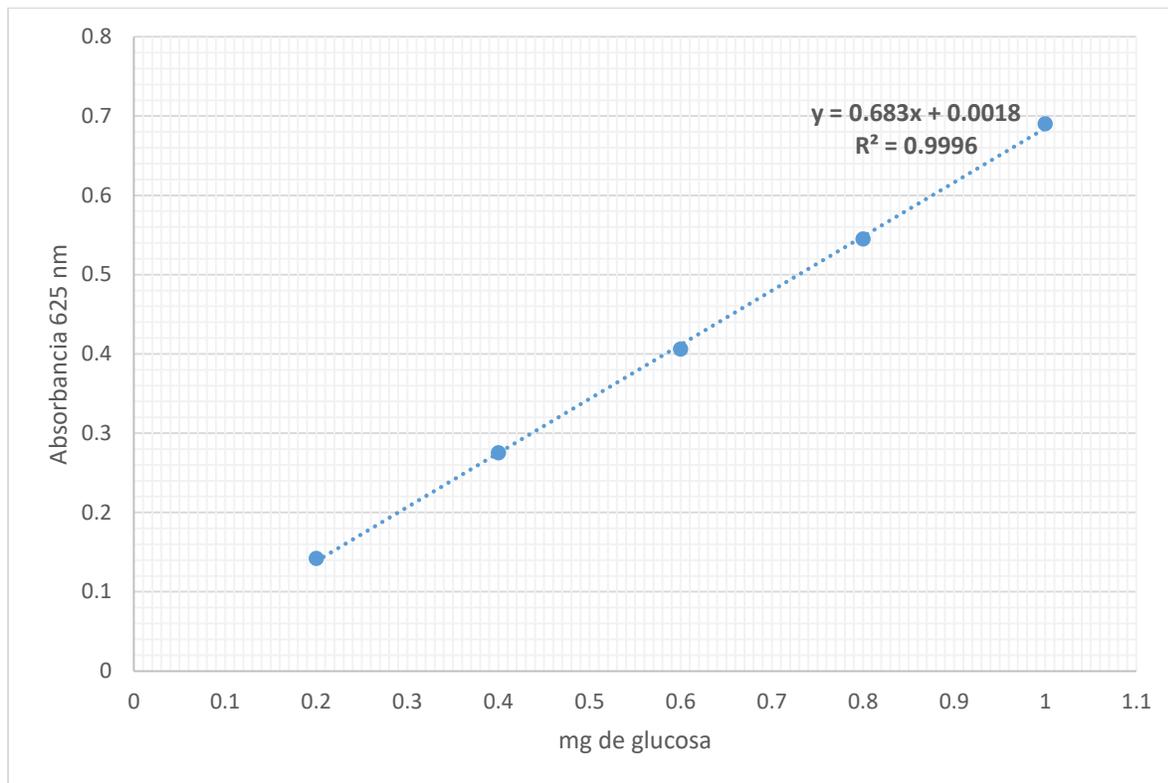


Figura 1. 1 Curva estándar de Glucosa para Higuera, con regresión lineal.

Una vez teniendo los datos de la curva estándar se procede a repetir el procedimiento anterior, haciendo una disolución de 1:8 de los tubos de ensaye, para poder correrlos en la misma absorbancia 625 nm.

Para determinar la concentración de azúcares reductores (glucosa) en la muestra se aplica el mismo método, utilizando la ecuación lineal de la curva patrón, o en su caso utilizar la curva estándar para definir los parámetros de glucosa de cada muestra. Se utilizaron 5 repeticiones por variedad, con un total de 20 muestras.

1.4.4 Metodología para determinación de clorofila.

Se inició con el peso de 5 gr por muestra, con 5 repeticiones por variedad, enseguida se colocaron en tubos de ensayo y se agregaron 10 mL de acetona al 80%, y se dejó reposar 24 horas en obscuridad en refrigeración a 5°C. Después se transfirió a un mortero para macerar hasta obtener una solución uniforme y homogénea. Se filtró y se añadió carbonato de sodio anhidro para eliminar humedad, se aforo a 50 mL con acetona al 80%, debido a la concentración de la clorofila, se disolvió 1:8 para estar en el rango del espectrofotómetro. Se transfirió el extracto a un tubo de ensayo y se centrifugó a 5000 rpm durante 2 minutos. Transferir el sobrenadante a una celda y leer la absorbancia a 645 y 663 nm en el espectrofotómetro usando etanol 80% como blanco. Se realizaron las pruebas pertinentes con el espectrofotómetro mediante diferentes disoluciones de clorofila: 1,2 y 3 mL, con la finalidad de obtener las respectivas absorbancias como muestra patrón, para las espectrofotometrías se consideraron las muestras puras extraídas.

1.5 Resultados y Discusión

1.5.1 Cuantificación de carbohidratos

Se encontró diferencias en la cuantificación de carbohidratos en tallos de las cuatro variedades analizadas, indicando que a pesar de que las plantas tienen la misma edad y etapa fenológica, tienen diferente cantidad de glucosa en sus tallos, Pigman (1957) mencionó que la acumulación de carbohidratos en tallos y hojas está relacionada con la etapa fenológica y la capacidad de absorción de luz de las hojas, para el caso de durazno, aumenta la cantidad de glucosa en tallos cuando están en floración, notó una mayor concentración hasta de 6 mg/100 mL, debido a la teoría fuente-demanda, sin embargo, también encontró que las concentraciones más bajas fueron cuando existió crecimiento vegetativo, debido a la translocación de los azúcares hacia los puntos de crecimiento (meristemos), por otro lado, en esta especie se encontró que los azúcares disminuyen al entrar en dormancia, pero aumentan los niveles de almidón en tallos

(Ruiz et al. 2016), siendo una posible referencia para época de colecta de varetas con la finalidad de propagación.

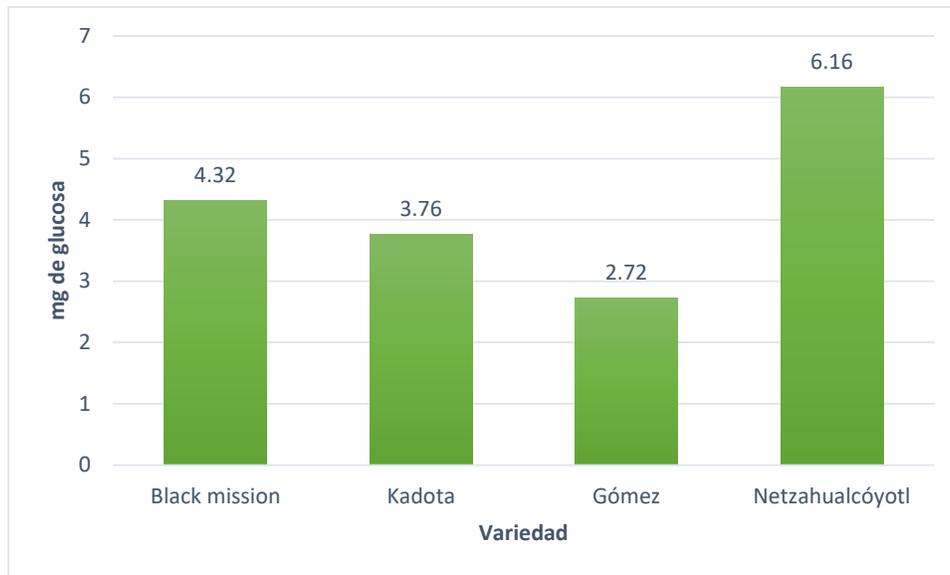


Figura 1. 2 Cantidad de glucosa por variedad de higuera.

Los datos encontrados (Figura 1.2) notan que la variedad Netzahualcóyotl, tiene hasta 2.1, 3.6, y 4.6 mg más de glucosa en sus tallos en comparación con 'Black mission', 'Kadota', y 'Gómez', respectivamente. Para el cultivo *in vitro* la cantidad de reservas del tallo ya sea en almidón ó glucosa es importante, debido a la mayor probabilidad de supervivencia y brotación del explante, Newton et al. (2009), también mencionó que la cantidad de reserva del tallo esta relacionada directamente con el porcentaje de supervivencia en la etapa de establecimiento de piña, sin embargo, la asepsia es de mayor importancia debido a que, explantes con buen desarrollo pueden contaminarse y morir, en comparación con explantes lentos en brotación (con menor cantidad de reservas) sin contaminación.

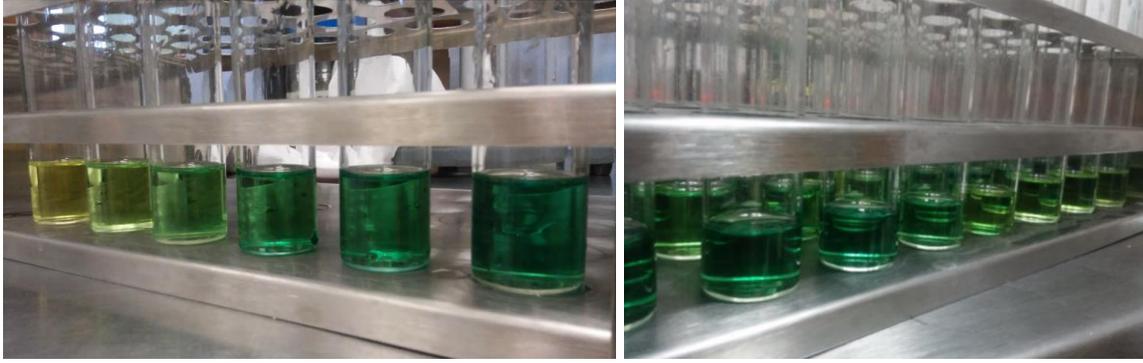


Figura 1. 3 Diluciones de glucosa, para curva estándar de interpretación.

En el cultivo *in vitro* el tiempo de brotación de una variedad a otra, a pesar de ser de la misma especie, da pauta a manejar distintos métodos para cada una, en tiempos estimados para los cultivos subsecuentes o tiempo total de propagación (Quiala et al., 2012). Es importante mencionar que por escaso material vegetativo no se pudo hacer una correlación entre el material vegetativo que se estableció en la época de verano, para cada una de las variedades probadas y el contenido total de carbohidratos como resultado presentado anteriormente (Figura 1.2), en futuros trabajos se recomienda hacer cuantificación de carbohidratos junto con el establecimiento *in vitro* para definir parámetros específicos por variedad. Los resultados tienen congruencia con el tiempo de brotación de los explantes, debido a que Netzahualcóyotl brotó en las primeras 4 semanas, mientras que Kadota y Black mission brotaron hasta 8 semanas después, y Gómez resulto intermedia, ya que broto a las 6 semanas (Capítulo II), a pesar de haber presentado menor contenido de carbohidratos en sus tallos. Nava et al. (2014) encontraron que la distribución de biomasa en la planta esta correlacionada con la concentración de reservas y azúcares totales, concordando con los resultados de Mendoza Castillo (2015), quien analiza la cantidad de biomasa en frutos, tallos y hojas de higuera, de la variedad Netzahualcóyotl, en donde encontró mayor acumulación en tallos y hojas después de un ciclo de cultivo.

1.5.2 Cuantificación de clorofila.

Los resultados obtenidos mediante espectrofotometría permitieron realizar un análisis cuantitativo de los pigmentos a través de sus respectivas absorbancia. Respecto a los pigmentos fotosintéticos se pudo observar el espectro característico de las clorofilas con su banda espectral entre los 645 y 663 nm, lo cual corresponde a clorofila a y b respectivamente (Stryer, 2002).

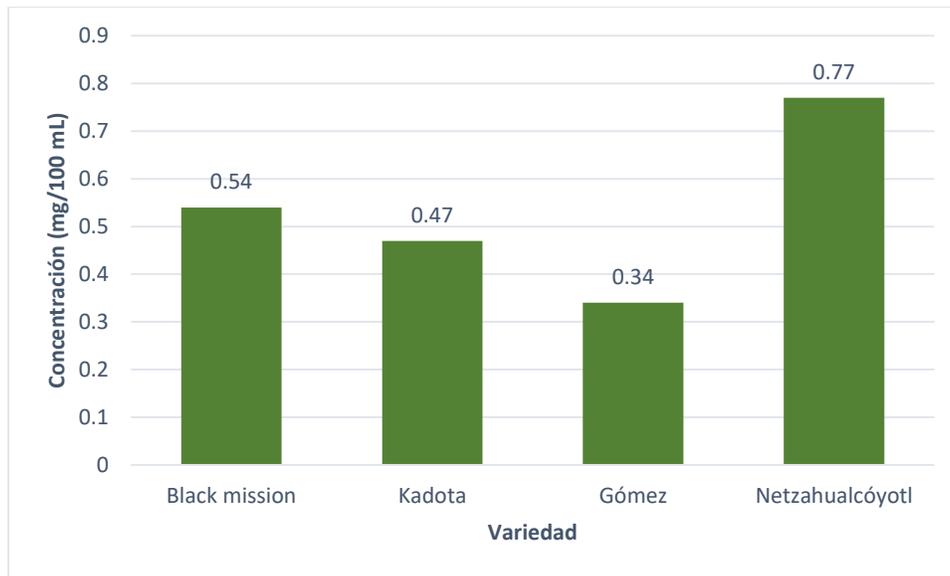


Figura 1. 4 Cuantificación de clorofila a y b por variedad, absorbancia a 625 nm.

La Figura 1.4, nos muestra la variación en concentración de clorofila por variedad, Netzahualcóyotl tiene mayor concentración: 0.2, 0.3 y 0.4 mg/100 mL de clorofila con respecto a: Black mission, Kadota y Gómez, respectivamente. Notándose claramente en el color de las muestras extraídas por variedad (Figura 1.5). La mayor concentración de clorofila en esta relacionada directamente con la concentración de carbohidratos, en base a un aumento proporcional positivo, es decir, aumento de concentración de clorofila y un aumento de concentración de carbohidratos, para el caso de higuera de las cuatro variedades. 'Netzahualcóyotl' presenta mayor concentración de clorofilas, indicando que es más eficiente en la captación de luz para transformarla en carbohidratos mediante la fotosíntesis, sin embargo 'Black mission', y

'Kadota' se mantienen entre 0.4-0.5 mg/100 mL de clorofila, indicando su menor capacidad de absorbanza del espectro de luz. Por otro lado, 'Gómez' es la variedad con menor concentración de clorofila con 0.3 mg/ 100 mL, la clorofila tiene una absorbanza definida, clorofila a (662 nm) y b (642 nm), sin embargo la concentración es correlativa con la fotosíntesis y posteriormente a la transformación de carbohidratos, indicando que a menor concentración de clorofila, menor cantidad de foto asimilados (Trumbo et al., 2013), reflejándose directamente en la acumulación de biomasa.

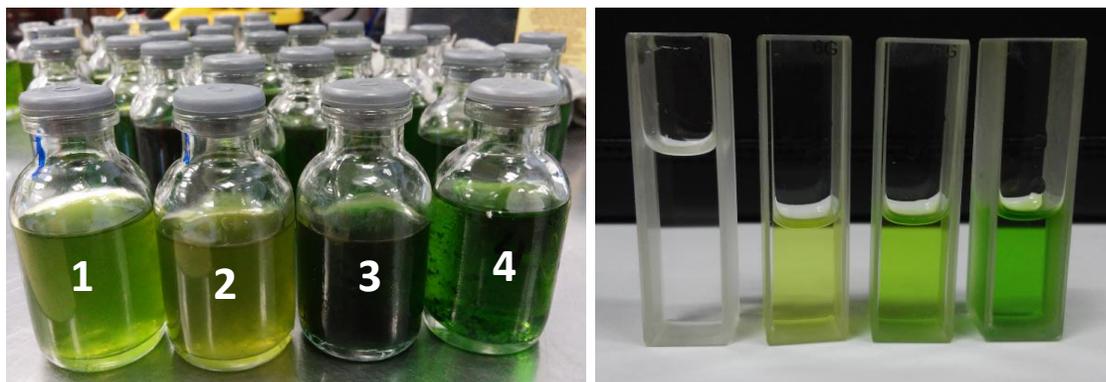


Figura 1. 5 Muestras de clorofila de las cuatro variedades, calibración del espectrofotómetro. Clorofila de variedad 1: 'Black mission'; 2: 'Kadota'; 3: 'Netzahualcóyotl'; 4: 'Gómez'.

Con los resultados obtenidos, se correlacionan el genotipo con la concentración de clorofila de cada variedad, Netzahualcóyotl es más eficiente en la captación de luz en comparación con las demás, por la mayor concentración de clorofila, dando ventaja respecto a las demás si se midiera la eficiencia fotosintética por área. En el cultivo *in vitro*, en la etapa de multiplicación, un factor a medir es el número de hojas, en donde algunas ocasiones no se tienen diferencia significativa, sin embargo, la cantidad de clorofila puede marcar tendencia, en mayor captación de luz y rapidez funcional de las hojas, y por lo tanto, mayor velocidad de brotación y mayor tamaño, en comparación al resto de variedades.

1.6 Conclusiones

En la cuantificación de carbohidratos como glucosa de los tallos, la variedad Netzahualcóyotl presentó mayor concentración con 6.16 mg, mientras que 'Black

mission', 'Kadota', y 'Gómez' presentaron: 4.32, 3.76 y 2.72 mg, respectivamente, la cantidad de carbohidratos acumulados en el tallo como glucosa, aumentan la probabilidad de brotación y enraizamiento para la variedad, ya sea mediante el cultivo *in vitro* ó enraizamiento *in vivo*.

La variedad Netzahualcóyotl también presenta mayor concentración de clorofila a y b en hojas, con respecto a 'Black mission', 'Kadota' y 'Gómez', superándolos por 0.2, 0.3 y 0.4 mg de clorofila por cada 100 mL de solución, tiene mayor eficiencia en la captación de luz por lo tanto mejora el proceso de fotosíntesis.

La relación clorofila-carbohidratos esta estrechamente relacionada, es decir, a mayor concentración de clorofila a y b en hojas, mayor acumulación de carbohidratos en forma de glucosa en los tallos, existe relevancia genotípica entre variedades.

En futuros trabajos se sugiere realizar análisis de clorofila y carbohidratos, a la par que el establecimiento *in vitro* o enraizamiento *in vivo*, para tener correlaciones directas, en tiempo de brotación, calidad del brote y enraizamiento.

1.7 Literatura citada

Espinosa T, & Rodriguez, C. 2016. Nota tecnica: Determinación del índice de calidad del agua (ICA), de los ríos Moron y Patanemo del Estado Carabobo, en Venezuela. Ingeniería uc, 206-213.

Gómez I., Figueroa, FL., Huovinen, P., Ulloa, & N., Morales, V. 2005. Photosynthesis of the red alga *Gracilaria chilensis* under natural solar radiation in an estuary in southern Chile. *Aquaculture*, 244 (1-4): 369-382.

Mendoza C.V.M. 2013. Fisiología y manejo de la higuera (*Ficus carica* L.) en producción forzada bajo cubierta plástica. Dr. Ciencias. Recursos Genéticos y Productividad-Fisiología Vegetal. Campus Montecillo- Colegio de Postgraduados. Edo. Méx. México. 86 pp.

- Nathan N, & Yocum, C. 2006. Structure and function of photosystems I and II. Annual Review of Plant Biology, 521-565.
- Newton S.G., Haruko, A.A., Sugitani, C.J., Franke, P.A.C., Rigon, S.M., Lorenci, W.A., Biasi, L.A., Ricardo, S.C. 2009. Utilization of the Biorreactor of Imersion by Bubbles at the Micropropagation of Ananas comosus L. Merrill. Brazilian Archives of Biology and Technology 2009(52): 37-43.
- Nobel P. S. 2012. Physicochemical and Plant Physiology. En P. Nobel, Physicochemical and Plant Physiology San Diego California: Academic Press Limited, 228-234.
- Pigman W. 1957. The carbohydrates. Academic Press. New York.
- Ruiz M.S., Martín, A., Villalobos, M.C., Calle, A., Serradilla, M.J., Córdoba, M.G., Hernández, A. 2016. Yeasts isolated from figs (*Ficus carica* L.) as biocontrol agents of postharvest fruit diseases. Food Microbiology. Volume 57. Pp. 45-53.
- Southgate D.A.T. 1991. Determination of Food Carbohydrates. Elsevier Applied Science, London.
- Stryer L., Berg, J., and Tymoczko, J. 2002. Biochemistry. 5ª edición Freeman, NewYork. 974 pp.
- Trumbo T, Schultz, E, Borland, M, & Pugh, M. 2013. Applied Spectrophotometry: Analysis of a Biochemical Mixture. Laboratory Exercise, 242-250.
- Witham F.H., D.F. Blaydes and R.M. Devlin. 1971. Experiments in plant physiology. Van Nostrend Reinhold Company, New York.

CAPÍTULO II. PROPAGACIÓN *in vivo* DE HIGUERA

2.1 Resumen

Existen 600 variedades de higuera descritas en el mundo, la mayoría de ellas presentan partenocarpia, en México se cuenta con 'Black mission', 'Kadota', 'Gómez' y 'Netzahualcóyotl', todas estas variedades presentan buena productividad y se propagan asexualmente. La propagación tradicional es por medio de estacas e hijuelos, este método tiene la ventaja de evitar la juvenilidad e iniciar la producción de forma precoz, desde el primer ciclo agrícola, sin embargo, existen ciertas dificultades de enraizamiento para algunas variedades, por ejemplo en la literatura se han indicado porcentajes de enraizamiento del 10 al 45 % dependiendo de la variedad. La auxina utilizada frecuentemente para enraizamiento es el ácido indol butírico (AIB) debido a su bajo costo. No obstante, se desconoce la concentración óptima para el enraizamiento de las variedades que se tienen en nuestro país. El objetivo en este trabajo fue evaluar diferentes concentraciones (0, 500, 1000, 1500 y 2000 ppm) del producto comercial Radix® 3000 para el enraizamiento de mini estacas (trozos de tallo de 5 cm de longitud) de cuatro variedades de higuera, solamente "Netzahualcóyotl" es proveniente del Valle de México, las demás provienen de Gómez Palacio, Durango. Se utilizó como sustrato un mezcla de arena, tezontle y peat moss en una relación 1:1:1 v/v, bajo condiciones de invernadero, alcanzando temperaturas promedio de 25 ± 5 °C, una humedad relativa del 70 % y con una sombra del 50 % durante 60 días. Se establecieron mini estacas de 5 cm con 2 nudos de las variedades 'Black mission', 'Kadota', 'Gómez' y 'Netzahualcóyotl'. Se obtuvo un porcentaje de enraizamiento del 52, 64, 85 y 94 respectivamente. Las mejores concentraciones del producto, oscilaron entre 500 a 1500 ppm y el número de raíces estuvo entre 16 a 19, con una longitud de 1.4 a 2.5 cm dependiendo de la variedad.

Palabras clave: partenocarpia, propagación, enraizamiento y mini estacas.

2.2 Abstract

There are 600 varieties of fig trees described in the world, most of them have parthenocarpy, in Mexico there is 'Black mission', 'Kadota', 'Gomez' and 'Netzahualcoyotl', all these varieties have good productivity and spread asexually. The traditional propagation is by means of cuttings and shoots, this method has the advantage of avoiding juvenility and starting production early, from the first agricultural cycle, however, there are certain difficulties of rooting for some varieties, for example in the literature have indicated rooting percentages of 10 to 45% depending on the variety. The auxin frequently used for rooting is indole butyric acid (IBA) due to its low cost. However, the optimum concentration for the rooting of the varieties is unknown in our country. The objective was to evaluate different concentrations (0, 500, 1000, 1500 and 2000 ppm) of the commercial product Radix[®] 3000 for the rooting of mini cuttings of four varieties of fig tree. A mixture of sand, tezontle and peat moss was used as a substrate in a 1: 1: 1 v / v ratio, under greenhouse conditions, reaching average temperatures of 25 ± 5 ° C, a relative humidity of 70% and with a 50% shadow for 60 days. Miniature 5 cm with 2 knots of the varieties 'Black mission', 'Kadota', 'Gómez' and 'Netzahualcóyotl' were established. A percentage of rooting was obtained of 52, 64, 85 and 94 respectively. The best concentrations of the product, ranged between 500 to 1500 ppm and the number of roots was between 16 to 19, with a length of 1.4 to 2.5 cm depending on the variety.

Key words: parthenocarpy, propagation, rooting and mini cuttings.

2.3 Introducción

La higuera es una especie rústica, que se adapta con facilidad a diversas condiciones edafoclimáticas, debido a ello, algunos investigadores se enfocan en variedades comerciales y buscan variantes para la caracterización y la utilización de los recursos fitogenéticos, más que en programas de mejoramiento genético. Actualmente se realizan análisis moleculares multivariados (microsatelites, RT-PCR, FLPS) para separar a nivel genético las variedades, debido a la sinonimia o identificación errónea de algunos, sobre todo en las tipo Caprifig (Aradhya et al. 2017), quedando solamente en 3 grupos; Común, San Pedro y Smyrna. Existen 600 variedades descritas en el mundo (Condit, 1955). Sin embargo, existen dificultades para la propagación en algunas variedades, principalmente del tipo Black misión, Bisi et al. (2016) reportaron 10 al 45 % de establecimiento y Aradillas (2016) un 26 %, teniendo una pérdida del 55 al 90 % de material vegetativo, relacionado directamente con pérdidas económicas haciendo que el costo por planta sea elevado (Hartmann et al., 2011). Las variedades existentes en nuestro país en su mayoría son partenocárpicas, debido a esto su propagación tradicional es por medio de estacas, este método tiene la ventaja de evitar juvenilidad e iniciar la producción en etapas tempranas, 6 meses después de su establecimiento para Black misión y 4 meses para Kadota. Por otro lado, también puede mantener los problemas de la planta madre, como son plagas, enfermedades, bacterias, virus y fitoplasmas, si se tiene un protocolo adecuado de asepsia para la varetas, solamente podemos tener problemas internos de la varetas como: virus, fitoplasmas y bacterias. Algunos de los compuestos auxínicos que se utilizan para el enraizamiento de varetas son; ácido indol butírico (AIB), ácido 1-naftalenacético (ANA), 2-4 D y el ácido indolacético (AIA), este último es fotosensible, el más utilizado es el primero debido a su estabilidad y poca movilidad. Gunver y Eartan (1998) realizaron algunas pruebas de propagación de in vivo mediante la adición de 1000 ppm de AIB, obteniendo 54 % de enraizamiento para la variedad Bursa Síyahi. De igual forma Zerhoune (2003) realizó pruebas con las variedades Kadota, Gouddane, Chiari y Ournaksi, para conocer el porcentaje de enraizamiento, aplicó AIB y estableció varetas de manera vertical, obteniendo mayor vigor en planta para 'Ournaksi', con respecto de

su establecimiento con varetas de lado. Se han utilizado diferentes sustratos, como peat moss, suelo común, arena y mezclas de ellas, Peche et al. (2017), demostraron que a 'Roxo de Valinhos' tiene mejor enraizamiento en suelo común junto con arena. A pesar de que ya existen trabajo de propagación por estacas, en nuestro país aún no se ha reportado alguno, de tal forma que se colectaron variedades comercialmente importantes que se encuentran en México; 'Black misión', 'Kadota', 'Gómez' y 'Netzahualcóyotl', todas estas presentan partenocarpia y buena productividad. El objetivo en este trabajo fue evaluar diferentes concentraciones del producto comercial Radix® 3000 para el enraizamiento de cuatro variedades de higuera, aprovechando la menor cantidad de material vegetativo.

2.4 Materiales y Métodos

2.4.1 Sitio experimental

El experimento se realizó durante el periodo de enero a diciembre de 2017, en un invernadero rústico de cubierta plástica de 9 m², a una altitud de 2240 m.s.n.m. Ubicado en el Colegio de Postgraduados, campus Montecillo en el de Estado de México.

2.4.2 Material vegetal

Se utilizaron las variedades: 'Black mission', 'Kadota', 'Gómez' y 'Netzahualcóyotl', las tres primeras procedentes de una parcela productiva en Gómez Palacio, Durango y la última es una selección realizada en el Valle de México por el M.C. Alfonso Muratalla Lúa y el Dr. Facundo Barrientos Pérez, Investigador Docente y Profesor Titular respectivamente del Colegio de Postgraduados en diciembre de 1980.

'Black mission' se caracteriza por tener la epidermis externa oscura con sus tejidos internos de color rosa, 'Kadota' tiene la epidermis externa color amarillo y su interior verde-amarillo, la variedad Gómez cuenta con epidermis externa bicolor verde-rojizo y sus tejidos internos color rojo. Las variedades anteriores se colectaron varetas (trozos de tallo de 30 cm de longitud sin hojas), de plantas en producción de 4 años de edad,

con podas anuales en sistema de conducción en V, tutoradas en macro túnel, densidad de 2200 plantas por hectárea con sistema de fertirriego establecidas en suelo, de Gómez Palacio, Durango. 'Nezahualcóyotl' tiene epidermis externa bicolor verde-morado y el color de sus tejidos internos es purpura, una variedad regional del Valle de México, las varetas de 30 cm de largo sin hojas, las otorgó el M.C. Alfonso Muratalla Lúa, profesor del Colegio de Postgraduados.

Primero en campo se cortaron los brotes del año, consiguiendo varetas de 30 cm de longitud con alrededor de 6 nudos. Una vez llegando al invernadero del Colegio de Postgraduados se procedió a cortar las estacas en mini estacas de 5 cm de longitud con al menos dos nudos, a partir de este material, se procedió a realizar la desinfestación para establecer las pruebas para enraizamiento.

2.4.3 Desinfestación de las varetas

Se realizó el siguiente procedimiento para desinfectar las varetas: se realizó un lavado con agua y jabón, posteriormente se llevó a cabo una inmersión con fungicidas 2 gr·L⁻¹ de Amistar, Cabrio C y Consist max, durante 1 h. Luego una inmersión en 6 gr·L⁻¹ de Agrygent Plus, durante 1 h y finalmente se realizó un enjuague con agua corriente.

Por último se aplicaron los tratamientos haciendo diluciones del producto comercial Radix® 3000 en líquido: T1) 0 ppm (Testigo), T2) 500 ppm y T3) 1000 ppm, T4) 1500 ppm y T5) 2000 ppm.

2.4.4 Sustrato y condiciones de enraizamiento

El experimento se realizó bajo las condiciones de un invernadero rústico con temperaturas promedio de 25 ± 5 °C y una humedad relativa del 70 % con sombra del 50 %. En pruebas iniciales se optó por utilizar como sustrato peat moss 50 % y perlita 50 %, sin embargo, se tuvieron muchos problemas con la retención de humedad, ocasionándose un ambiente propicio para el desarrollo de hongos y bacterias, por lo tanto se probaron distintos fungicidas, hasta llegar a la opción del uso de Amistar, Cabrio C y Consist Max, quienes controlaron mejor los hongos presentes en los tallos, y se cambió el sustrato, mezclando arena y tezontle para mejorar aireación y siendo

compuestos minerales sin materia orgánica, se mejoró la sanidad. Se utilizó como sustrato una mezcla de arena, tezontle y peat moss 1:1:1 v/v/v. Las mini estacas (una por cavidad) se establecieron en contenedores plásticos rígidos de celdas con 200 ml de capacidad e intercambiables tipo Ray Leach Cone-tainers número 7. Las mini estacas se mantuvieron durante 60 días bajo las condiciones antes mencionadas, con foto período de 16 h luz y 8 h de oscuridad. Se estableció el experimento en un diseño experimental en Bloques al azar.

2.4.5 Variables evaluadas

Las variables evaluadas por tratamiento fueron:

- 1) Porcentaje de mini estacas enraizadas: se contó por unidad cada mini estaca con presencia de raíz.
- 2) Porcentaje de mini estacas brotadas: se contó por unidad cada mini estaca
- 3) Longitud de raíces (LR) en cm: se midió con un vernier digital Truper® con precisión de 0.001 cm;
- 4) Número de raíces (NR) promedio. Las raíces fueron contadas después de 60 días. Los experimentos fueron repetidos en las épocas de primavera, verano y otoño.

2.4.6 Diseño Experimental

Para conocer el efecto de las diluciones del producto comercial Radix® 3000 que contiene ácido indol butírico (AIB), sobre el enraizamiento de las cuatro variedades de higo, se realizó un experimento con un diseño en bloques al azar, utilizando las variedades como bloque ('Black mission', 'Kadota', 'Gómez' y 'Netzahualcóyotl'), con 5 tratamientos: T1) 0 ppm (Testigo), T2) 500 ppm y T3) 1000 ppm, T4) 1500 ppm y T5) 2000 ppm y con 20 repeticiones. El experimento se replicó 3 veces en épocas distintas. Se realizó análisis de varianza para cada variable con el paquete SAS (Statistical Analysis System), versión 9.3., y la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$) se usó para la comparación de medias.

2.5 Resultados y Discusión

2.5.1 Efecto de ácido indol butírico (AIB)

En el testigo sin aplicación de Radix[®], no se obtuvo enraizamiento para las variedades 'Black Mission' y 'Kadota' (Figura 2.1) en ninguna de las épocas evaluadas. La formación de callo en la base de las varetas fue contraproducente para la formación de la raíz, estos resultados concuerdan con lo encontrado por Arellano et al., (2014) quienes indican que la formación de callo es inversamente proporcional a la formación de raíces en lináloe. Por otro lado, los tratamientos testigo en los cultivares Gómez y Netzahualcóyotl presentaron un pobre enraizamiento del orden del 4 al 27%. Hartman y Kester (1983) mencionan que la lignificación y las reservas de las varetas son de vital importancia para lograr el enraizamiento, así como la concentración de auxinas. Por otro lado, Flaishman et al. (2008) mencionaron que la información genética de cada variedad tiene un efecto significativo sobre la habilidad de emitir raíces adventicias, en su trabajo que realizaron en las variedades de higuera 'Cuello de Dama Blanco' y 'Bursa', encontraron que hubo diferencias significativas en el enraizamiento de las variedades para el mismo tratamiento auxínico. En nuestros resultados encontramos que para 'Black Mission' el tratamiento T4 (1500 ppm) y T5 (2000 ppm) fueron significativamente diferentes, donde se obtuvo un 52 y 48 % de enraizamiento respectivamente. Para 'Kadota' se consiguió el 64 y 62 % de enraizamiento en esos mismos tratamientos. Indicando que la concentración de la auxina y de las características anatómicas y fisiológicas del tejido de cada variedad tiene diferente sensibilidad a la hormona, siendo 'Netzahualcóyotl' y 'Gómez' con mejor enraizamiento a menor concentración de AIB en comparación con 'Black mission' y 'Kadota'. Cabe señalar, que en 'Kadota', Zerhoune (2003), se obtuvo un 48 % de enraizamiento utilizando varetas de 30 cm de longitud y aplicando 2000 ppm de AIB. Por otro lado, Flores et al. (2009) consiguió un 25 % de enraizamiento aplicando 600 ppm de AIB pero no indica la variedad estudiada.

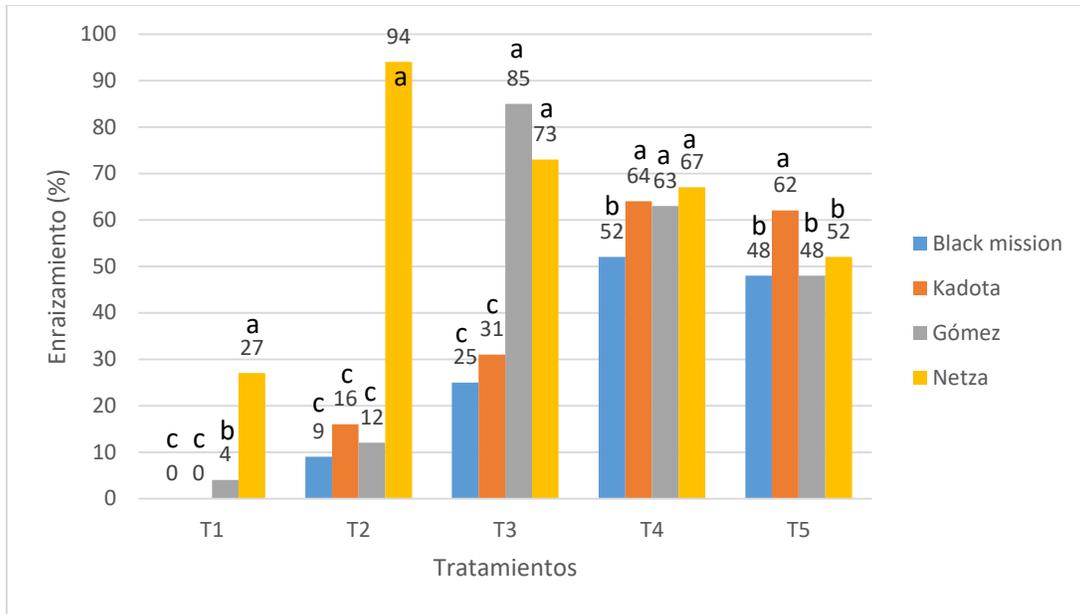


Figura 2. 1 Enraizamiento de cuatro variedades de higuera con la aplicación de diluciones de Radix® 3000. Medias con letras iguales entre las columnas del mismo tratamiento, no son estadísticamente diferentes según la prueba de Tukey, ($P \leq 0.05$). T1: 0 ppm (testigo); T2: 500 ppm; T3: 1000 ppm; T4: 1500 ppm; T5; 2000 ppm de AIB; Netza: variedad 'Nezahualcóyotl'.

Para la variedad Gómez los tratamientos T3 y T4, obtuvieron 85% y 63% de enraizamiento, respectivamente, siendo los más altos porcentajes, indicando el tejido de esta variedad enraíza favorablemente a concentraciones entre 1000 y 1500 ppm de AIB, con la variedad 'Ournaksi' Zerhoune, (2003) consiguió el 87 % de enraizamiento, él utilizó varetas de 25 cm de longitud y 1000 ppm de AIB, similar a los resultados de Bisi et al. (2016) quienes utilizaron concentraciones entre 1000 a 2000 ppm de AIB y pero solamente obtuvieron entre 10 y 45% de enraizamiento en 'Roxo de Valinhos'. Por otro lado, la variedad 'Nezahualcóyotl' fue la que respondió mejor al enraizamiento y resultó estadísticamente diferente entre concentraciones de Radix®, indicando que el aumento a concentraciones elevadas de AIB, disminuye el porcentaje de enraizamiento, debido a la mayor sensibilidad del tejido a concentraciones bajas de AIB, el exceso de la hormona causa efecto contraproducente que es la brotación de la yema en lugar de la emisión de raíces, haciendo que las reservas de la vareta se agoten y posteriormente muera el brote, obteniendo que a 500 ppm de AIB, se consiguió el mayor enraizamiento (94 %). Nava et al. (2014) reportaron que las varetas

colectadas en julio (para Brasil), tienen más reservas y por lo tanto alcanzan 30% más de enraizamiento, en comparación con las colectadas en otros meses cuando la planta aun está en crecimiento y los tejidos suaves y son suculentos. En México Aradillas (2015) reportó una supervivencia del 26% para la variedad 'Netzahualcóyotl', utilizó un método de mini estacas de 5 cm un nudo como mínimo, bajo condiciones controladas.

El número de raíces promedio se contó con base en los mejores tratamientos, por ejemplo para 'Black mission' y 'Kadota' el tratamiento T4 con 1500 ppm de AIB se obtuvo el mayor porcentaje de enraizamiento, para 'Gómez' fue el T3 con 1000 ppm de AIB y para 'Netzahualcóyotl' fue el T2 con 500 ppm de AIB. Cabe mencionar que en algunos tratamientos no existió raíz, solamente hubo presencia de callo en la base del tallo.

Cuadro 2. 1 Número y longitud de raíces de las cuatro variedades.

Variedad	Tratamiento Dilución Radix® 3000	Número de raíces	Longitud de raíz (cm)	Número de Rebrotos
Black mission	T4) 1500 ppm	19±1.14 a	2.5±0.87 a	1.2±0.33 bc
Kadota	T4) 1500 ppm	16±1.26 ab	2.2±0.49 a	1.6±0.71 ab
Gómez	T3) 1000 ppm	17±1.82 a	2.1±0.28 a	2±0.26 a
Netzahualcóyotl	T2) 500 ppm	16±0.72 ab	1.4±2.65 b	2±0.11 a

Medias con letras iguales en las columnas son estadísticamente iguales (Tukey, $P \leq 0.05$).

Entre las diferentes variedades no existió diferencia significativa en el número de raíces (Cuadro 2.1) es decir, con diferentes concentraciones de AIB se obtiene el mayor porcentaje de enraizamiento en cada variedad, indicando que algunos genotipos como 'Netzahualcóyotl' requieren de poca estimulación por parte de AIB para obtener mayor enraizamiento en contraste con 'Kadota' y 'Black mission', por otro lado, un exceso en la concentración de auxinas puede formar un menor número de raíces (4) con mayor longitud (7 cm) después de 60 días, como lo mencionó Bisi et al., (2016), quienes trabajaron con la variedad 'Roxo de Valinhos'. Sin embargo, la longitud de raíces en la

variedad 'Nezahualcóyotl', fue diferente (1.4 cm) significativamente en comparación con las demás (2.1, 2.2 y 2.5 cm), en base a estos resultados se puede inferir que el uso de 500 ppm de AIB para esta variedad ocasiona buen enraizamiento pero con corta longitud, una raíz menos vigorosa en comparación con las demás variedades, pudiendo otorgarse a el genotipo y a la competencia de nutrimentos que retraso el crecimiento de un alto número de raíces, después de 60 días. Con respecto del número de rebrotes, tomando en cuenta que a todas las mini estacas se les dejó sólo 2 yemas, 'Black mission' mostró significativamente una menor rebrotación, en comparación con las demás. Dalenuz et al. (2009), obtuvieron datos similares al enraizar estacas de 'Roxo de Valinhos', quienes aseguraron que normalmente brota la yema apical, sin embargo, en algunas variedades como Gómez y Nezahualcóyotl, puede brotar más de una yema, dependiendo del número de yemas existentes en la estaca.

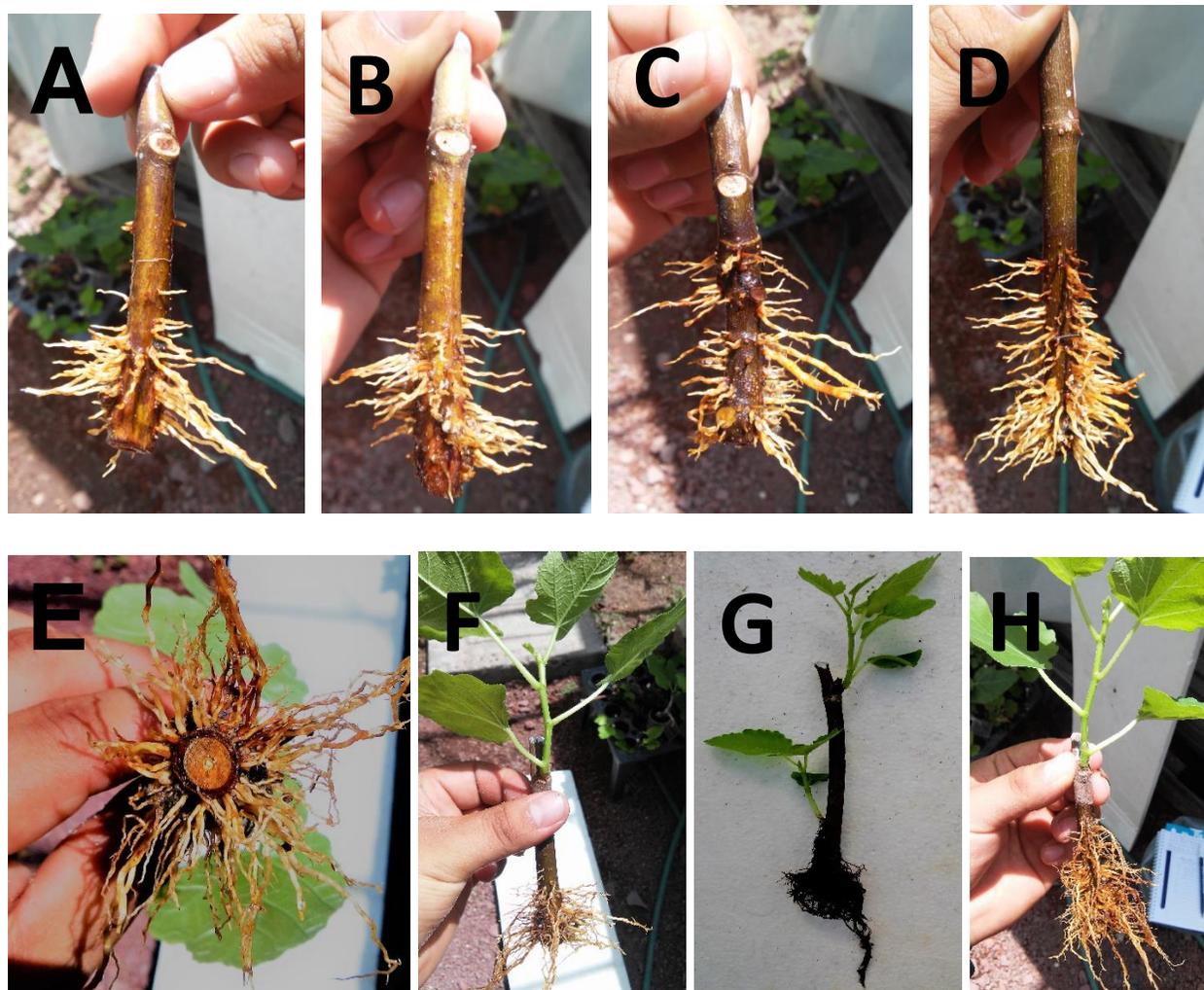


Figura 2. 2 Multiplicación *in vivo* de *Ficus carica* L. Por mini estacas. A) T4(1500 ppm de AIB) para 'Black mission'; B) T4(1500 ppm de AIB) en 'Kadota'; C) T2(1000 ppm de AIB) en 'Gómez'; D) T1(500 ppm de AIB) en 'Netzahualcóyotl'; E) Disposición de raíces del tallo; F) Mini estaca con 1 brote y raíz; G) Mini estaca con 2 brotes y raíz; H) Mini estaca con 19 raíces y 1 brote, 'Black mission'.

Las condición ambiental de humedad relativa al 70%, demandó mayor atención al experimento, ya que se realizaban 4 riegos durante el día para mantener esta condición, debido a que el sustrato que se utilizó tiene poca retención de humedad, en comparación con el mismo método pero con la adición de peat moss en la mezcla y el uso de estacas de 30 cm, como lo mencionó Sousa et al. (2013).

2.6 Conclusiones

Es posible utilizar mini estacas de 5 cm con 2 nudos, para el enraizamiento de las variedades 'Black mission', 'Kadota', 'Gómez' y 'Netzahualcóyotl', bajo condiciones de invernadero a 25 ± 5 °C y una humedad relativa del 70 % con sombra del 50 %. Las mejores concentraciones para el enraizamiento de las variedades anteriores oscilan entre 500 a 1500 ppm de AIB, en diluciones del producto comercial Radix® 3000 liquido. Existen diferencias en la capacidad de enraizamiento entre variedades, debido a la sensibilidad del tejido a la concentración de la auxina, a pesar de ser de la misma especie.

Se recomienda realizar experimentos con plantas en invernadero, aplicando fungicidas y bactericidas en campo, antes de cortar las varetas, así como utilizar varios tamaños de estacas de distintos diámetros.

2.7 Literatura citada

Aradhya M., Preece, J.E., and Velasco, D. 2017. Multivariate analysis of molecular and morphological diversity in fig (*Ficus carica* L.). *Acta Horticulturae* 1173: 23-28.

Aradillas T.L. 2015. Micropropagación de higuera (*Ficus carica* L. cv. Netzahualcóyotl) a partir de yemas en condiciones de inmersión temporal. Mtro. Ciencias. Recursos Genéticos y Productividad-Fruticultura. Campus Montecillo-Colegio de Postgraduados. Edo. Méx. México. 86 pp.

- Arellano Ostoia, G., González-Bernal, S. y Arellano-Hernández, G. 2014. El lináloe (*Bursera linanoe* (La Llave) Rzedowski, Calderón & Medina), especie maderable amenazada: una estrategia para su conservación. *Agroproductividad* Año 7 vol 7(3):42-51.
- Bisi R.B., Locatelli, G., Barbosa, C.M.A., Pio, R., Balbi, R.V. 2016. Rooting of stem segments from fig tree cultivars. *Acta Scientiarum – Agronomy* Volume 38(3): 379-385.
- Condit I.J. 1955. Fig Varieties. A Monograph. *Hildgardia*. 23(11). 323-539.
- Daneluz S., Pio, R., Chagas, E. A., Barbosa, W., Ohland, T., & Kotz, T. E. (2009). Propagação da figueira 'Roxo de Valinhos' por alporquia. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 31(1), 285-290.
- Flaishman M.; Rodov, V. y Stover, E. (2008): The Fig: Botany, Horticulture and Breeding; *Hort. Rev.* (34); pp. 113-196.
- Flores M. D.M., Jiménez B.V., y Chacón C.R. (2009). Cultivo de tejidos en *Ficus carica* Con miniestacas. *Agronomía Mesoamericana* 20(2): 319-325.
- Gunver S., Ertan, B., Dag, S., and Gorucuoglu, P.(2017). Effect of in vitro thermotherapy application on shoot development in some fig cultivars. *Acta Horticulturae* 1173. ISHS 2017. V International Symposium on Fig. Napoly, Italy. 195-197 pp.
- Hartman H.T. and Kester, D.L. 1983. *Plant propagation: principles and practices*. 4th edition, Prentice-Hall, Inc., Englewood Cliffs, New Jersey. 854 p.
- Hartmann H. T., Hudson, T., Kester, D. E., Dale, E. K., Davies Junior, F. T., & Geneve, R. L. 2011. *Plant propagation: principles e practices*. 8th ed. Boston, MA: Prentice Hall. 915 p.
- Hartmann H., D. Kester, F. Davies and R. Geneve. 2002. *Hartmann and Kester's: Plant propagation principles and practices*. Seventh edition. Prentice-Hall. New Jersey. 880 pp.

- Nava G.A., Wagner, A., Mezalira, E., Cassol, D.A., Alegretti, A.L. 2014. Rooting of hardwood cuttings of roxo de valinhos fig (*Ficus carica* L.) with different propagation strategies. *Revista Ceres* Volume 61(6): 989-996.
- Sousa C. M., Busquet, R. N., Vasconcellos, M. A. S., & Miranda, R. M. (2013). Effects of auxin and misting on the rooting of herbaceous and hardwood cuttings from the fig tree. *Revista Ciência Agronômica*, 44(2): 334-338.
- Zerhouni M. (2003). Propagation of Five Fig (*Ficus carica* L.) Varieties under Field Conditions. II International Symposium on Fig. *Acta Horticulturae* 605: 103-106.

CAPÍTULO III. MULTIPLICACIÓN *in vitro* DE CUATRO VARIEDADES DE HIGUERA

3.1 Resumen

La higuera (*Ficus carica* L.), tiene importancia en México debido al valor nutritivo de su fruto, el higo, que aporta diferentes minerales como K, Ca, Mg, Na, Zn y Cu, además de las vitaminas A, C, E, K, B6, niacina, tiamina, riboflavina, folato alimenticio y fibra asimilable, y presenta 74 kcal por cada 100 g del fruto. La propagación, principalmente se realiza mediante estacas, lo que conlleva a mantener los problemas fitosanitarios de la planta madre. El objetivo fue evaluar la respuesta de los tejidos a diferentes concentraciones de nano partículas de plata (Ag NPs) para desinfectar los explantes de higuera en cultivo *in vitro*, así como el potencial de multiplicación comparando los sistemas tradicionales e inmersión temporal en biorreactores tipo RITA[®], junto con la aplicación de 1-triacontanol (TRIA) para aumentar la tasa de multiplicación. El medio de cultivo empleado fue el de Murashige y Skoog (MS), suplementado con sacarosa (30 g L⁻¹), ácido cítrico (0.5 mg L⁻¹), ácido naftalén acético (0.01 mg L⁻¹), bencil adenina (0.1 mg L⁻¹) y agar agar Merck[®] (7 g L⁻¹), y el pH del medio se ajustó a 5.7, se adicionó 1-triacontanol (TRIA) a tres concentraciones: 0 (testigo), 5 y 10 µg L⁻¹, en medio semisólido con agar y en medio líquido utilizando biorreactores tipo RITA[®]. Las Ag NPs a concentraciones de 50 ppm y 75 ppm, fueron significativamente diferentes, logrando un 20 % y 28 % de contaminación en el establecimiento. El uso de 1-triacontanol a 10 µg L⁻¹ incrementa el número de brotes en 'Black mission', 'Kadota' y 'Gómez', en agar, a 2.8, 2.9 y 3.4 brotes por explante, respectivamente, mientras que a concentración de 5 µg L⁻¹ incrementa el número de brotes en 'Netzahualcóyotl' a 4.2 brotes. En el sistema de inmersión temporal RITA[®] y adicionado con 5 µg L⁻¹ de TRIA, se obtuvieron para 'Netzahualcóyotl' 4.4 brotes por explante y para 'Gómez' 3.6. En ambos cultivares el sistema de cultivo de biorreactores obtuvo brotes más largos 3.4 cm en promedio y con 7 hojas en comparación con los obtenidos en agar.

Palabras clave; *Ficus carica* L., biorreactores, micropropagación, sistema de inmersión temporal.

3.2 Abstract

The fig tree (*Ficus carica* L.), is important in Mexico due to the nutritional value of its fruit, the fig, which provides different minerals such as K, Ca, Mg, Na, Zn and Cu, as well as vitamins A, C, E, K, B6, niacin, thiamin, riboflavin, food folate and assimilable fiber, and presents 74 kcal per 100 g of the fruit. The propagation is mainly carried out by cuttings, which leads to maintaining phytosanitary problems of the mother plant. The objective was to evaluate the nano silver particles (AgNPs) in the establishment and the in vitro multiplication potential of two varieties; 'Netzahualcóyotl' and 'Gómez' in semi-solid medium and liquid medium in RITA[®] type bioreactors, together with the application of 1-triacontanol. The culture medium used was that of Murashige and Skoog (MS), supplemented with sucrose (30 g L⁻¹), citric acid (0.5 mg L⁻¹), naphthalene acetic acid (0.01 mg L⁻¹), benzyl adenine (0.1 mg L⁻¹) and Merck[®] agar agar (7 g L⁻¹), and the pH of the medium was adjusted to 5.7, 1-triacontanol (TRIA) was added at three concentrations: 0 (control), 5 and 10 µg L⁻¹, in semi-solid medium with agar and in liquid medium using RITA[®] type bioreactors. Ag NPs at concentrations of 50 ppm and 75 ppm were significantly different, achieving 20% and 28% contamination in the establishment. The use of 1-triacontanol at 10 µg L⁻¹ increases the number of outbreaks in 'Black mission', 'Kadota' and 'Gómez', on agar, to 2.8, 2.9 and 3.4 shoots per explant, respectively, while at concentration of 5 µg L⁻¹ increases the number of shoots in 'Netzahualcóyotl' to 4.2 shoots. In the RITA[®] temporary immersion system and added with 5 µg L⁻¹ of TRIA, for 'Netzahualcóyotl' 4.4 shoots were obtained per explant and for 'Gómez' 3.6. In both varieties, the bioreactor culture system obtained longer shoots 3.4 cm on average and with 7 leaves compared with those obtained in agar.

Key words; *Ficus carica* L., bioreactors, micropropagation, temporary immersion system.

3.3 Introducción

Existen diferentes genotipos de higuera en México (García, 2015), la mayoría presentan partenocarpia, cualidad de las variedades 'Black misión', 'Kadota', 'Gómez' y 'Netzahualcóyotl', importantes comercialmente (Juárez et al., 2018). Se conoce que algunas variedades de higuera son difíciles para propagarse asexualmente, debido a la contaminación por hongos y bacterias (Mitrafanova et al. 2016). Existen técnicas de propagación en donde se logra obtener plantas sanas, incluso se puede aplicar termoterapia para eliminar virus como realizaron Gunver et al.,(2017), para 'Sarilop' y 'Bursa Síyahi', este método también se realiza en menor tiempo, caso del cultivo *in vitro*, esta técnica está dividida en cuatro etapas; establecimiento, multiplicación, enraizamiento y aclimatación, en el primero, se utilizan diversos compuestos como agentes microbicidas para asegurar la asepsia del explante, para después establecerlos en un medio aséptico (Puente et al., 2017). Spinoso et al., (2017), en los últimos años ha propuesto el uso de las nano partículas de plata (Ag NPs), logrando menor contaminación de los explantes, que cuando se utiliza hipoclorito de calcio y etanol. También con la utilización de nuevos métodos como la implementación de Sistemas de Inmersión Temporal (SIT), se obtiene un mayor número de brotes por explante como lo obtuvieron Nava et al. (2014) y Quiala et al. (2012), quienes demostraron que con la utilización del Sistema de Inmersión Temporal (SIT) se obtienen el doble de brotes por explante (10.3) en comparación con el Sistema Semisólido Tradicional (SST). Dentro de los promotores de crecimiento existen algunos de última generación, como el 1-triacontanol (TRIA), un alcohol saturado de cadena larga, que promueve el crecimiento en aplicación exógena, además aumenta el contenido de clorofila y sacarosa (Neem et al., 2011), disminuyendo el daño oxidativo, promoviendo la emisión de brotes (Xiaochun et al., 2016).

'Black misión' se caracteriza por el color negro de su epidermis externa, 'Kadota' con amarilla, 'Gómez' de rojo y 'Netzahualcóyotl' de morado pálido, las tres primeras procedentes de Gómez Palacio, Durango, comercialmente importantes, las dos primeras demandadas en mercados extranjeros, para exportación, en fresco o como deshidratados o procesados, 'Gómez' tiene características similares a 'Brown turkey'

sin embargo la infrutescencia es de mayor tamaño, todas ellas tolerantes a condiciones ambientales extremas, prevaleciendo en la región lagunera de Durango y Coahuila, y por último esta 'Netzahualcóyotl', es una selección regional muy productiva, utilizada para fines de investigación logrando obtener hasta 80 toneladas por hectáreas (Mendoza , 2015), sin embargo tiene poca vida en postcosecha, y no tiene aceptación comercial en mercados extranjeros, lo que la hace no apta para viajes largos, utilizada mayormente para procesos, este cultivar es proveniente del valle de México proporcionada por el Maestro Alfonso Muratalla Lúa, del Postgrado de Recursos Genéticos y Productividad del Colegio de Postgraduados Campus Montecillo.

El cultivo *in vitro* utiliza varias partes de la planta, haciendo uso de la totipotencia celular, para distintos fines. Se ha utilizado para saneamiento viral, en cultivo de higuera, partiendo del cultivo de meristemos como explante (Mitrofanova et al., 2016). Bayouhd et al. (2015) encontró que el medio de Murashige y Skoog (MS) que contiene 0,2 mg L⁻¹ benzyle amino purina (BAP), 0,1 mg L⁻¹ 1-naftalenacetico Ácido (NAA) y 0,1 mg L⁻¹ de ácido giberélico (AG3) es útil para la formación de raíces, tamaño de 0.96 cm en la variedad Soltani. Por otro lado Aradillas (2015) mencionó que con la aplicación de 2 µg L⁻¹ de 1-Triacontanol, 0.1 mg L⁻¹ de benciladenina (BA) y 0.01 mg L⁻¹ de ácido naftal- acético (ANA) se aumenta la tasa de multiplicación a 2 brotes por explante, 4 hojas y 2.3 cm de tamaño, en la variedad Netzahualcóyotl. Por otro lado, Corredoira et al., (2011) encontró que en la multiplicación de *Alnus glutinosa* el mejor tratamiento fue el 2 mg L⁻¹ de BA y 0,5 mg L⁻¹ de AIA, estabiliza entre 5 y 12 meses. Uribe et al. (2012) obtuvieron un 87,5 % de enraizamiento adventicio con 1 mg L⁻¹ de AIB y un 75% con 3 mg L⁻¹ de ANA, también encontraron que se tiene un 100 % de supervivencia con la adición de 3 mg L⁻¹ de AIB al medio de cultivo en plantas de *Nothofagus glauca*. Por otro lado Sharma et al. (2015) encontraron que en un medio MS adicionado con 7,5 M de 6-benciladenina (BA) más 0.5 µM ácido alfa-naftalenacético (NAA) mejora la tasa de multiplicación en higuera.

El 1-Triacontanol, es un promotor del crecimiento, es un alcohol saturado de cadena larga, que promueve el crecimiento en aplicación exógena, se ha probado en crecimiento de algas aumentando su biomasa 2 veces más en comparación sin su

aplicación (Tastan et al. 2016). Además se ha encontrado que cuando se aplica 1-Triacontanol (10 μM) aumenta el contenido de clorofila y sacarosa, disminuyendo el daño oxidativo, mejoró significativamente la actividad de la catalasa (CAT) y la peroxidasa de guaiacol (POD), demostrando que el POD puede desempeñar un papel importante en la eliminación de H_2O_2 , promoviendo también la emisión de tallos, en el cultivo de arroz (Xiaochun et al. 2016).

El objetivo fue evaluar la respuesta de los tejidos a diferentes concentraciones de nano partículas de plata (Ag NPs) para desinfectar los explantes de higuera en cultivo *in vitro*, así como el potencial de multiplicación comparando los sistemas tradicionales e inmersión temporal en biorreactores tipo RITA[®], junto con la aplicación de 1-triacontanol (TRIA) para aumentar la tasa de multiplicación.

3.4 Materiales y Métodos

3.4.1 Sitio experimental

El experimento se realizó en dos etapas, la primera que fue el establecimiento, se llevó de febrero a diciembre de 2017, y la segunda que es la multiplicación fue de los meses de enero-septiembre del 2018, en el Laboratorio de Biorreactores de Inmersión Temporal, la sala de incubación tenía las siguientes condiciones ambientales: 16 h de luz blanca y 8 h de obscuridad a una intensidad luminosa de $45 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, a temperatura de $25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$, durante 30 días, en el Colegio de Postgraduados, Montecillo, Estado de México.

3.4.2 Material vegetal

Se utilizaron explantes, brotes de un año de edad, color café claro, de consistencia rígida, de un diámetro aproximado de 0.5 cm, se removieron las hojas y se cortaron trozos de tallo de 2 cm de longitud con un nudo como mínimo, de las cuatro variedades: Black mission, Kadota, Gómez y Netzahualcóyotl, las tres primeras procedentes de Gómez Palacio, Durango, y la última es una selección regional

proporcionada por el Maestro Alfonso Muratalla Lúa, del Postgrado de Recursos Genéticos y Productividad del Colegio de Postgraduados Campus Montecillo.

3.4.3 Desinfección de los explantes

Se realizó un lavado con agua y jabón, para eliminar impurezas y el látex de la vareta, en seguida se realizó una inmersión en cloro al 20 % durante 20 minutos, y etanol al 70% durante 30 segundos, con inmersión en fungicida ($2 \text{ gr}\cdot\text{L}^{-1}$ de Amistar y Consist max, durante 1 h), para después inmersión en bactericida ($6 \text{ gr}\cdot\text{L}^{-1}$ de Agrygent Plus, durante 1 h), se realizó un enjuague con agua estéril para después utilizar tres tratamientos de AgNPs; T1) 25 ppm, T2) 50 ppm y T3) 75 ppm, estableciendo un explante por tubo de ensaye, con 25 repeticiones, se realizó la medición de contaminación a los 60 días.

3.4.4 Medio de cultivo y condiciones de incubación

El medio de cultivo para establecimiento fue el de Murashige y Skoog (1962) (MS) a la concentración del 75 % de sus macrosales, suplementado con sacarosa (30 g L^{-1}), ácido cítrico (0.5 mg L^{-1}), y agar agar (Merck®, 7 g L^{-1}). El pH del medio se ajustó a 5.7 con NaOH o HCl 1N y se esterilizó en una autoclave automática digital (STIK®, Modelo MJ-78A) a $121 \text{ }^\circ\text{C}$ y 1.5 kg cm^{-2} de presión por 20 min.

El medio de cultivo empleado para la multiplicación de los brotes, fue el Murashige y Skoog (1962) (MS) a la concentración del 100% de sus macrosales, suplementado con sacarosa (30 g L^{-1}), ácido cítrico (0.5 mg L^{-1}), ácido naftalenacético (0.01 mg L^{-1}), bencil adenina (0.1 mg L^{-1}) y agar agar (Merck®, 7 g L^{-1}). El pH del medio se ajustó a 5.7 con NaOH o HCl 1N y se esterilizó en una autoclave automática digital (STIK®, Modelo MJ-78A) a $121 \text{ }^\circ\text{C}$ y 1.5 kg cm^{-2} de presión por 20 min.

Los cultivos se mantuvieron durante 30 días a $25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$, 16 h de luz blanca y 8 h de oscuridad a una intensidad luminosa de $45 \text{ } \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$.

3.4.5 Establecimiento en Magentas y Biorreactores

Para la evaluación del sistema de cultivo en medio semi sólido (SSS), se utilizaron magentas de 200 ml de capacidad (v), a las que se les agregaron 40 ml de medio base MS, y se sembraron de forma vertical 5 explantes por magenta. Mientras que, para evaluar el sistema de inmersión temporal, se utilizaron biorreactores del tipo RITA[®] (recipiente de inmersión temporal automatizado por sus siglas en inglés) de 1 L de capacidad y se agregaron 250 ml de medio MS en estado líquido, sin agar, colocándose 5 explantes por biorreactor. En este sistema el tiempo de inmersión fue de 1 min cada 4 h bajo las mismas condiciones de incubación antes mencionadas.

3.4.6 Tratamientos, diseño y unidad experimental

Para el establecimiento se realizó un análisis en bloques ('Black mission', 'Kadota', 'Gómez' y 'Netzahualcóyotl') completamente al azar, con tres tratamientos; T1) 25 ppm, T2) 50 ppm y T3) 75 ppm de AgNPs, en un arreglo factorial completo, con 25 repeticiones por tratamiento. Se realizó análisis de varianza para cada variable con el paquete SAS (Statistical Analysis System), versión 9.3., y la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$) se usó para la comparación de medias.

Para conocer el efecto de 1-triacontanol (TRIA) sobre la brotación en los explantes de las variedades 'Netzahualcóyotl' y 'Gómez', en ambos sistemas de cultivo se estudiaron tres concentraciones del regulador: 0 (testigo), 5 y 10 $\mu\text{g L}^{-1}$. Se utilizó un diseño experimental de bloques al azar generalizado, con 3 tratamientos resultantes de un arreglo factorial completo con dos bloques (variedades) y tres niveles (concentraciones) para cada factor. La unidad experimental estuvo conformada por un explante, con 20 repeticiones por tratamiento.

Se realizó análisis de varianza para cada variable con el paquete SAS (Statistical Analysis System), versión 9.3., y la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$) se usó para la comparación de medias.

3.4.7 Variables evaluadas

Las variables evaluadas por tratamiento fueron: 1) Porcentaje de mini estacas contaminadas, por tratamiento de AgNPs: se midió por unidad de cada explante contaminado, hasta los 60 días después del establecimiento; 2) longitud de brote (LB) en cm, por variedad y por sistema de cultivo: se midió con un vernier digital Truper® con precisión de 0.001 cm; 3) número de hojas promedio por brote (NHB); 4) Longitud promedio de hojas por explante (LHE) en cm: se midió con un vernier digital Truper® con precisión de 0.001 cm; 5) Número de brotes promedio por explante (NBE). Todas fueron evaluadas después de 30 días de haberse establecido el experimento.

Los dos experimentos fueron repetidos dos veces en el tiempo, mediante subcutivos sucesivos.

3.5 Resultados y Discusión

3.5.1 Efecto de las AgNPs

No hubo contaminación en todos los tratamientos durante las dos primeras semanas, mientras que, en la tercera semana se observó contaminación en los tratamientos T1 y T2 (Figura 3.1), al final se encontró una diferencia estadística entre el tratamiento (T1) y los tratamientos (T2 y T3). Los fitopatógenos causantes de la contaminación fueron; *Fusarium solani*, *Fusarium spp.*, *Aspergillus spp.*, y *Penicillium spp.*, además se encontraron bacterias, color rosa y blanca, quienes dificultaron el establecimiento y por lo cual se establecieron en 12 ocasiones para obtener material sano para la siguiente etapa.

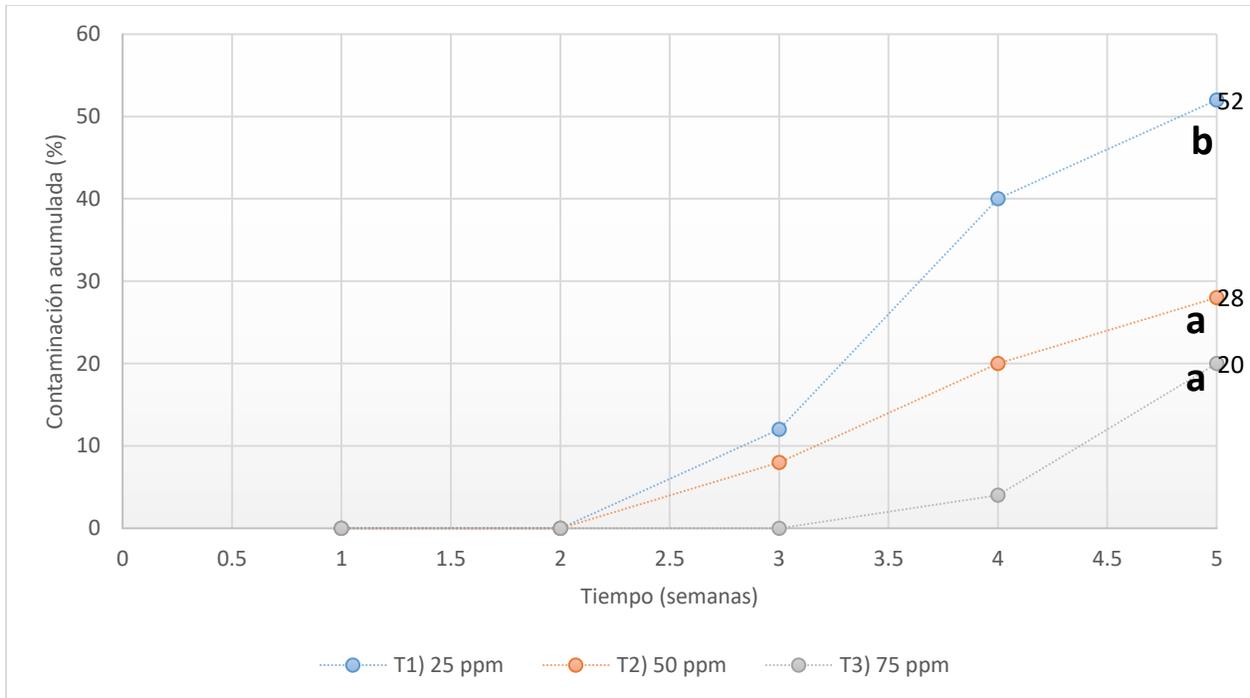


Figura 3. 1 Contaminación de explantes tratados con diferentes concentraciones de AgNPs. Medias con letras iguales no son estadísticamente diferentes (Tukey, $P \leq 0.05$). T1) 25 ppm; T2) 50 ppm; T3) 75 ppm de AgNPs.

El efecto microbicida de las AgNPs, está relacionado directamente con la concentración, y con su periodo de efectividad, no se observó oxidación ni toxicidad con los tratamientos empleados en las mini estacas de higuera a las concentraciones utilizadas. Después de 40 días el porcentaje de contaminación por tratamiento fue: T1) 52 %, T2) 28 % y T3) con 20 %.

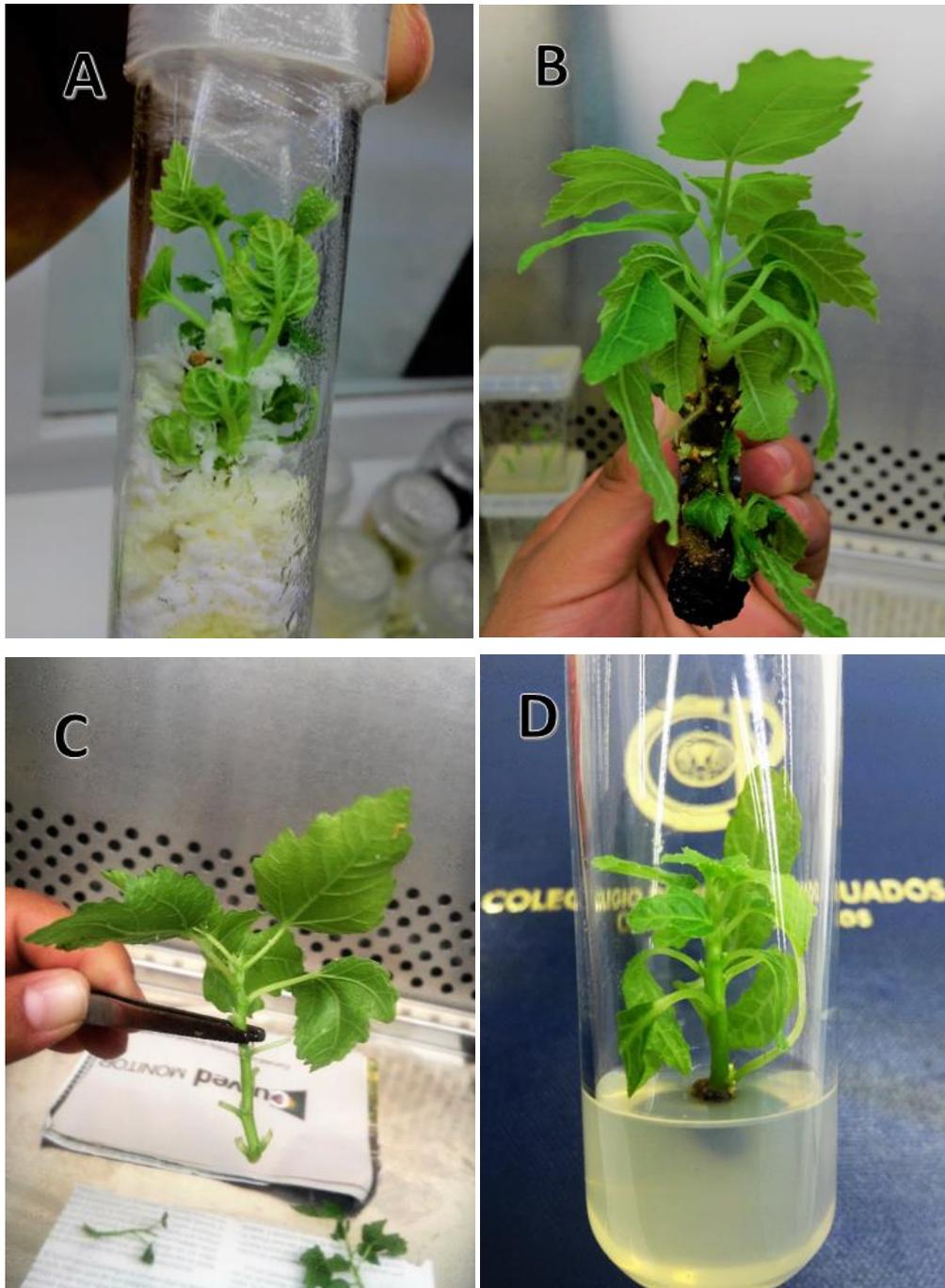


Figura 3. 2 Establecimiento *in vitro* de *Ficus carica* L. A) Explante de higuera sano a 45 días; B) Rebrote del explante después de 50 días en medio de cultivo; C) Rebrote retirado del explante después de los 60 días; D) Rebrote subcultivado en tubo de ensayo en medio semisólido-agar.

La rebrotación de los explantes fue más rápida cuando se usaron mayores concentraciones de AgNPs, Reddy et al. (2017), menciona que existe mayor elongación

célular a concentraciones entre 50 a 200 ppm de AgNPs, logrando mayor desarrollo de brotes en *Ficus religiosa*, también encontró que casua toxicidad a concentraciones de 500 ppm. La rebrotación inició a las cuatro semanas en 'Netzahualcóyotl' y en 'Gómez' inició a las 6 semanas, mientras que, para 'Kadota' y 'Black mission' la rebrotación se observó después de las 8 semanas (Figura 3.1). En el T1 con menor concentración de AgNPs, se presentó la mayor contaminación, así como la brotación fue menor en todas las variedades, indicando que la concentración no fue suficiente para hacer efecto en los tejidos y esporas de hongos, así como en bacterias, las mismas que dañan el tejido del explante, promoviendo estrés y evitando el enraizamiento como la brotación. El T3, presentó mayor uniformidad en la brotación, Zerhoune (2003) menciona que se acelera la mitosis en las células, y promueve la brotación y el crecimiento del sistema radical, también mostró una reducción del estrés oxidativo del explante, inhibiendo radicales libres, propiciando el crecimiento y la brotación de la yema. Frohlich (2017) encontró que a concentraciones de 200 ppm de AgNPs causan inhibición en el crecimiento celular y toxicidad, causando efectos adversos en tejido animal, indicando que a las concentraciones utilizadas, de 25 a 75 ppm, no se tiene efectos contraproducentes, pudiendo elevar la concentración en futuros trabajos para obtener el menor porcentaje de explantes contaminados.

Por otro lado, y debido a la alta contaminación por bacterias principalmente, además del lento crecimiento *in vitro* en medio semisólido de las variedades 'Black mission' y 'Kadota', no fue posible obtener suficientes explantes de estas variedades para realizar la multiplicación en RITA®, por lo tanto solamente se realizó la multiplicación en agar, únicamente se realizó la etapa de multiplicación en RITA® con 'Gómez' y 'Netzahualcóyotl'.

3.5.2 Efecto del sistema de cultivo

El sistema de cultivo (agar vs. líquido), influyó significativamente la longitud promedio de los brotes, obteniéndose para ambas variedades, brotes dos veces más largos en el sistema RITA® que en el de agar, debido a la mejor absorción del medio nutritivo líquido por el mayor contacto con el tejido del explante, además del intercambio

gaseoso de CO₂ y oxígeno, aumentando la biomasa del explante. Para el número y longitud promedio de la hoja, no hubo diferencias significativas, la diferenciación de los tejidos es la misma, sólomente el tallo y pecíolo tuvieron mayor crecimiento en RITA[®] en ambas variedades. En la Figura 3.3, se observó que la variedad Gómez tuvo una longitud promedio de brotes de 1.7 cm en el sistema de agar, mientras que en el sistema RITA[®] se obtuvo una longitud de 3.4 cm, en promedio el número de hojas para agar fue 7, mientras que en RITA[®] 6.8, sin embargo, estadísticamente no existen diferencias significativas, estos resultados concuerdan con los de Debnath (2008) en su trabajo con fresa, en donde obtuvo en promedio 1.3 cm más de longitud en el brote, y 2 hojas más, en comparación con el sistema con agar. Por otro lado, Sharma et al. (2015), obtuvieron un promedio en longitud de brotes de higuera de 3 cm, en un sistema de cultivo con agar, sin embargo no mencionó la variedad utilizada de higuera, empero sus resultados indican que el sistema de inmersión temporal RITA[®] mejoró la longitud de los brotes, obteniendo 1.3 cm más de longitud versus agar, en *Stevia rebaudiana* Bert (Ramirez et al.,2016).

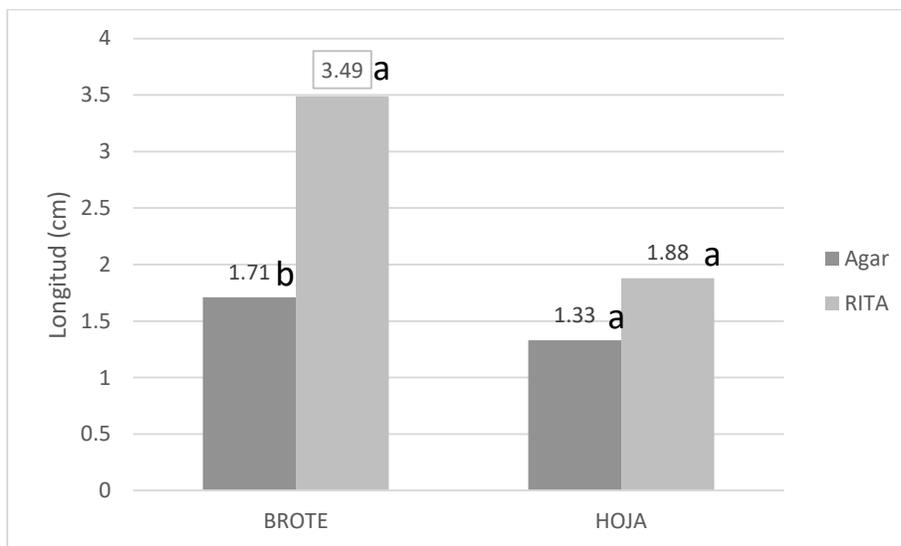


Figura 3. 3 Resultados en la variedad Gómez, Agar versus RITA[®]. Medias con letras iguales en las columnas no son estadísticamente diferentes (Tukey, $P \leq 0.05$). cm: centímetros; Agar: establecido en medio semisólido; RITA; establecido en medio líquido en inmersión temporal.

Por otra parte, 'Netzahualcóyotl' (Figura 3.3) aumento al doble, 1.7 cm la longitud del brote, y en 0.6 cm la longitud de la hoja en el sistema RITA[®] versus agar,

consiguiéndose una longitud promedio de brotes de 3.4 cm, teniendo un mejor desarrollo, el explante absorbió mejor los nutrimentos en el medio líquido, en promedio el número de hojas para agar fue 6.1, mientras que en RITA® 7.7, sin embargo, estadísticamente no existe diferencia significativa, debido al aumento solamente en 1.6 hojas, indicando que no es representativo.

Etienne y Berthouly (2002), realizaron la primera compilación en la implementación de SIT, en ella destacan varios cultivos con sus tiempos de inmersión recomendados, en la que no se encuentra la especie de *Ficus carica* L. Aradillas (2015), realizó multiplicación en SIT utilizando una inmersión de 1 minuto cada 6 horas, obteniendo 2.4 brotes por explante para 'Netzahualcóyotl', debido a ello se optó por mantener el mismo tiempo de inmersión, sin embargo en ambas variedades se observó la presencia de brotes sobre hidratados, debido al tiempo del explante inmerso en el medio líquido, cuando se desarrollaron en el sistema RITA®.

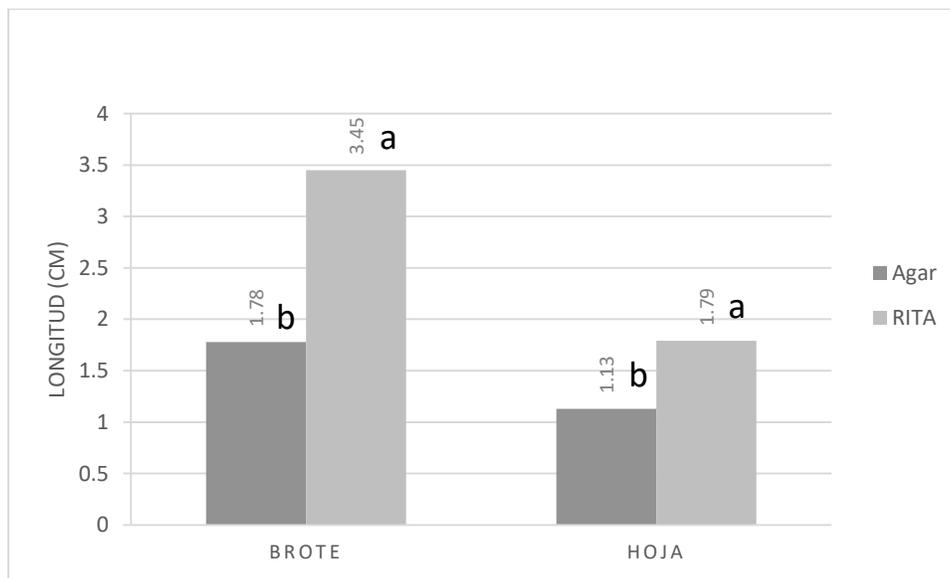
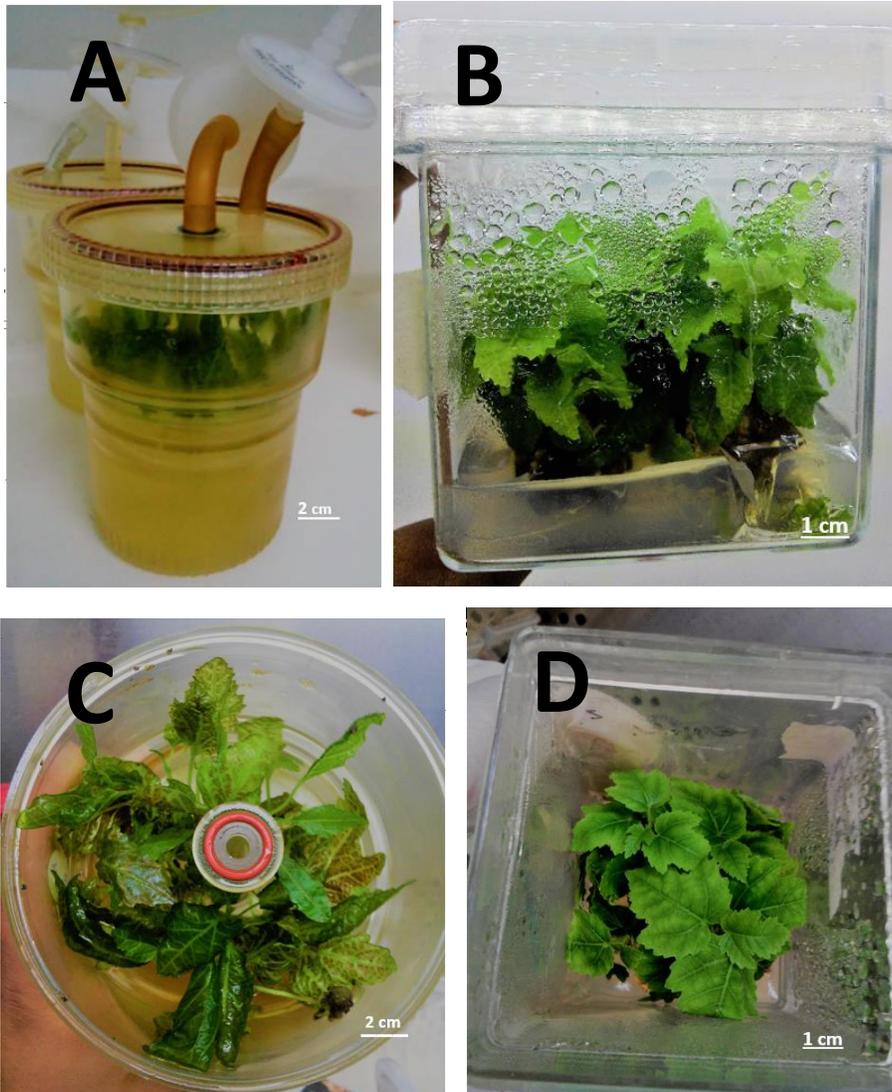


Figura 3. 4 Resultados con la variedad Netzahualcóyotl, Agar versus RITA®. Medias con letras iguales en las columnas no son estadísticamente diferentes (Tukey, $P \leq 0.05$). cm: centímetros; Agar: establecido en medio semisólido; RITA; establecido en medio líquido en inmersión temporal.

A pesar de que el comportamiento de ambas variedades fue diferente, la variedad Netzahualcóyotl presentó mayor vigor que 'Gómez', sin importar el sistema de cultivo utilizado, sin embargo, en ambas variedades el sistema de inmersión temporal fue más

eficiente, debido al aumento en brote como de hoja en ambas variedades, lo que coincide con lo expuesto por Mitrafanova et al. (2016), quienes realizaron la regeneración de higueras de un jardín botánico.



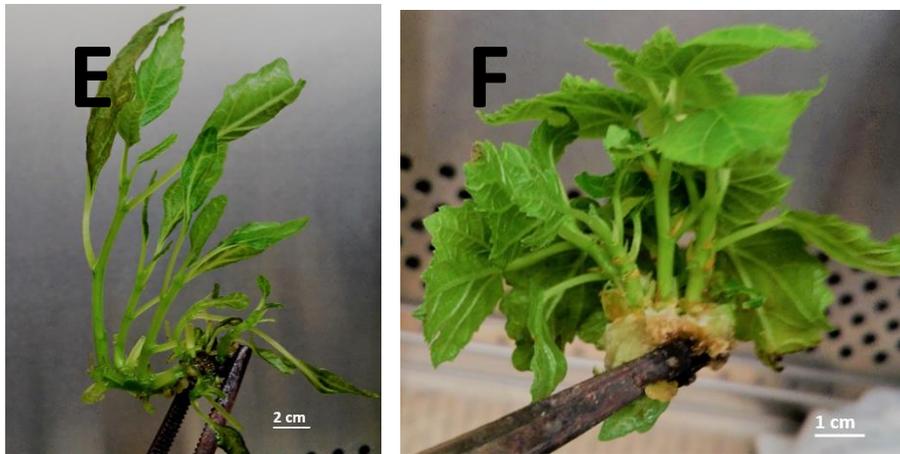


Figura 3. 5 Multiplicación *in vitro* de *Ficus carica* L. RITA® versus Agar. A) RITA® con explantes de higuera; B) Magenta con explantes; C) Brotes en RITA® después de 30 días de establecimiento; D) Brotes en Magenta-Agar después de 30 días de establecimiento; E) 5 brotes de un solo explante establecido en RITA®; F) 4 brotes de un explante establecido en Magenta- Agar.

Otro aspecto importante es el tiempo en que los brotes de ambas variedades estuvieron listas en cada uno de los sistemas de cultivo evaluado. Los brotes que crecieron en el sistema líquido estuvieron listos para ser transferidos a suelo a los 23 días del ciclo de cultivo, mientras que los que crecieron en el sistema semisólido, estuvieron listos hasta el día 30, indican que la absorción de los nutrimentos aumenta en medio líquido, además de que el explante tiene mayor contacto y existe un movimiento de los gases dentro del sistema, ayudando a una mayor absorción de CO₂, favoreciendo el crecimiento del explante en menor tiempo, en comparación con el medio semisólido, quien el explante solamente tiene contacto con el agar en una área definida, y obtiene mayor resistencia a la absorción de nutrimento debido al medio semisólido, estos resultados concuerdan con lo obtenido por Flores et al. (2009), quienes desarrollaron un protocolo para *Ficus carica*, quienes obtuvieron en promedio 3 brotes por explante, en 25 días, su mejor tratamiento fue MS al 100 % adicionando 1 mg L⁻¹ de BAP.

3.5.3 Efecto de la concentración de 1-triacontanol.

El 1-triacontanol (TRIA), se ha utilizado en la agricultura desde 1983 (Rama et al., 1983), en aplicaciones en alfalfa y tomate, para aumentar el periodo de vida postcosecha del fruto y del forraje, actualmente existe una molécula que cuenta con mayor pureza, que ha sido probada para distintos fines en el cultivo de tejidos *in vitro*, por ejemplo en multiplicación se han utilizado pequeñas cantidades desde 0.01 $\mu\text{g L}^{-1}$ hasta 0.1 $\mu\text{g L}^{-1}$ (Sontakke et al., 2018).

Para el caso de Black mission y Kadota, solamente se establecieron en agar, debido al poco material que se obtuvo a partir del establecimiento, se aplicaron tres tratamientos de 1-Triacontanol (Figura 3.6), obteniendo lo siguiente;

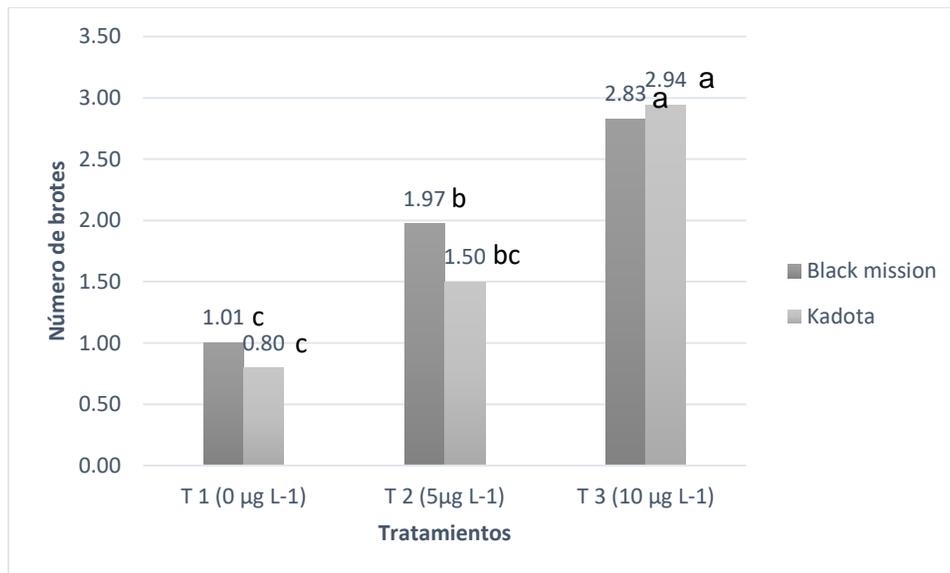


Figura 3. 6 Establecimiento en agar, con diferente concentración de 1-triacontanol, en 'Black mission' y 'Kadota', respecto a número de brotes por tratamiento. Medias con letras iguales en las columnas no son estadísticamente diferentes (Tukey, $P \leq 0.05$).

Solamente los tratamientos testigos T1, obtuvieron un solo brote por explante, en ambas variedades, es decir, de manera normal es el número de brotes emitidos por yema, no obstante, el tratamiento T2 (5 μg de TRIA) se obtuvieron 1.5 y 1.9 brotes por explante, aumentó el número de brotes debido a la aplicación de TRIA, ya que fomenta una mayor estimulación hormonal y síntesis de proteínas (Tastan et al. 2016), para 'Kadota' y 'Black mission', respectivamente, con el tratamiento T3 (10 μg de TRIA)

se aumentó al doble la concentración de TRIA en comparación con T2, se obtuvo 2.8 y 2.9 brotes por explante, en las mismas variedades, Pantikis et al. (1986) obtuvieron 2.6 brotes por explante en su mejor tratamiento con 'Lampa', aplicando 2.5 mg L^{-1} de AIB. El aumento en concentración de 1-triacontanol es proporcional al aumento en número de brotes por explante, en ambas variedades, no se encontró toxicidad, hiperhidricidad o deformación de los brotes por el aumento de la concentración de TRIA, de forma que existe diferencia significativa estadísticamente entre tratamientos, solamente 'Kadota' en el T2 tiene el mismo resultado que en T1. En trabajos futuros será interesante aumentar concentraciones de TRIA hasta encontrar un mayor número de explantes en las dos variedades.

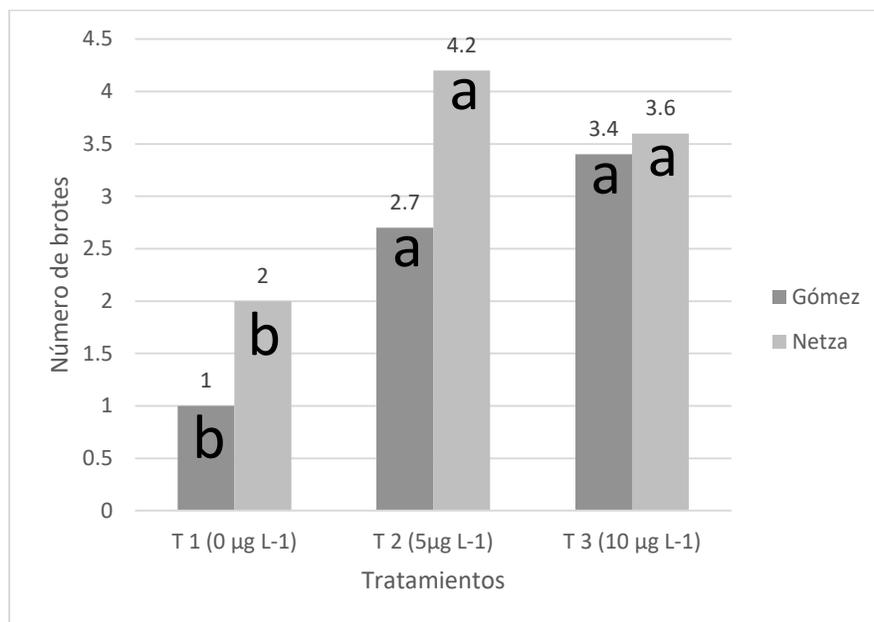


Figura 3. 7 Establecimiento en agar, con diferente concentración de 1-triacontanol, en 'Netzahualcóyotl' (Netza) y 'Gómez', respecto a número de brotes por tratamiento. Medias con letras iguales en las columnas no son estadísticamente diferentes (Tukey, $P \leq 0.05$).

Únicamente el testigo resultó significativamente diferente a los demás tratamientos, mientras que la aplicación de 5 ó 10 μg de TRIA resultaron iguales en el número de brotes en ambas variedades, tanto en agar como en RITA[®], registrándose un aumento de 2 brotes por explante (Figuras 3.6 y 3.7), Tastan et al. (2016), encontraron en su estudio que el TRIA aumentó el nivel de clorofila a y b, ocasionando un aumento de la

biomasa, aspecto que coincide con nuestros resultados. En el estudio similar de multiplicación que realizaron en higo Sharma et al. (2015), obtuvieron 6 brotes en promedio por explante en un sistema de cultivo de agar a los 30 días, ellos añadieron diferentes concentraciones de ANA, AIB y AIA, sin embargo, no mencionan el nombre de la variedad, que es fundamental. Por otra parte Bayoudh et al. (2015), encontraron que con 0.5 mg L^{-1} BAP y 0.1 mg L^{-1} ANA, se obtiene 4.5 brotes por explante, en 60 días, para la variedad ‘Soltani’, que es un higo blanco, indicando que con RITA es posible acercarnos a su promedio en solamente 40 días. Las concentraciones de BAP y ANA son indispensables para la multiplicación, sin embargo, la concentración puede hacer la diferencia, entre obtener brotación u obtener tejido calloso, tal como lo mencionaron Uribe et al. (2012). Vidal et al. (2015), mencionaron que se puede utilizar un método híbrido de multiplicación, que tenga en un inicio el uso de los sistemas de inmersión temporal RITA[®] y en seguida un paso en sistema de agar, con lo que se obtiene una mayor homogeneidad en el tamaño de los brotes, así como un mejor control para plantas de porte alto.

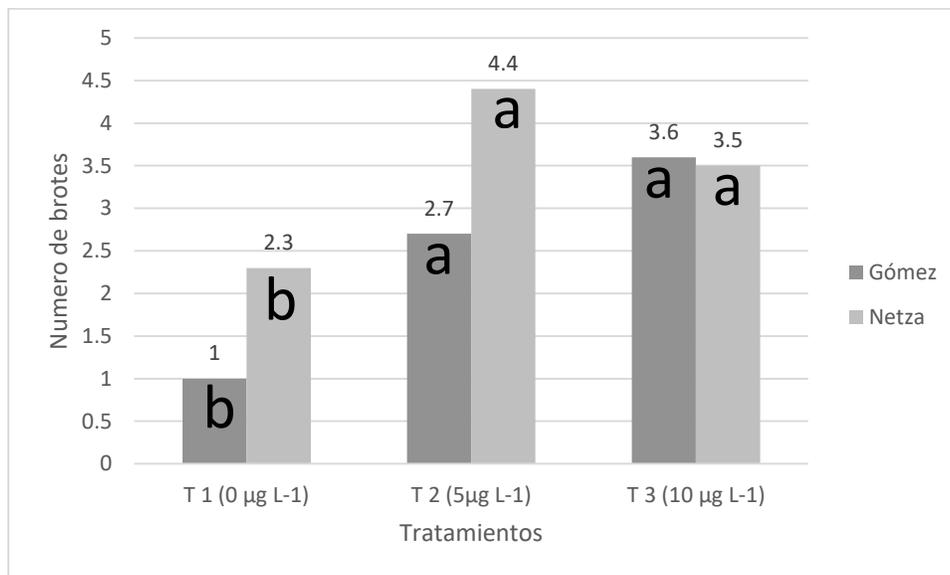


Figura 3. 8 Establecimiento en RITA[®], con diferente concentración de 1-triacontanol, en ‘Netzahualcóyotl’ (Netza) y ‘Gómez’, respecto a número de brotes por tratamiento. Medias con letras iguales en las columnas no son estadísticamente diferentes (Tukey, $P \leq 0.05$).

Con el uso de sistemas de inmersión temporal se han conseguido aumentar el número de brotes en piña (Newton et al., 2009), *Coriamdrum sativum* L (Asadi y Keramat, 2017). Por otro lado, Quiala et al. (2012), concluyeron que la asimilación de nutrientes en tallos y hojas en una vitroplanta, no está definida completamente, y debido a la apertura de los estomas por un ambiente húmedo constante, la asimilación de nutrientes es mayor en RITA[®], debido al mayor contacto entre el medio y el explante. A pesar de obtener resultados significativamente diferentes entre tratamientos, también existen otros sistemas de inmersión temporal (SIT) como los BIT[®] y BIF[®], Ramírez et al. (2016), compara varios SIT, obteniendo que BIT[®], es mejor que RITA[®], en la multiplicación de *Vanilla planifolia* Jacks, coincidiendo con Sharma et al. (2015) al obtener 3 veces más brotes que en RITA[®], siendo opción para futuros estudios. También están diseñando nuevos SIT, como el descrito en el trabajo de Welander et al. (2014), quienes obtuvieron mayor proliferación con su diseño para *Digitalis lutea*, además se realizan mejoras y adaptaciones a sistemas ya existentes o en invención, para aumentar la capacidad del biorreactor, como lo describe Georgiev et al. (2014), al obtener mayor capacidad del SIT para así llegar a obtener una adaptación de manera comercial para gran escala en propagación de plantas.

Texeira et al. (2016), en sus resultados obtuvo que utilizando RITA[®] en la propagación de palma de aceite (*Elaeis guineensis*), en aclimatación obtiene mayor porcentaje (40 %) de plantas aclimatadas *versus* agar, debido al intercambio gaseoso que existe en RITA, ingresando CO₂ inyectado al sistema, información que concuerda con Florez et al. (2016), confirmando que el uso del SIT aumenta los porcentajes de supervivencia en aclimatación de las plantas.

Estadísticamente existe diferencia entre bloques, que son las variedades: Netzahualcóyotl tiene mayor vigor que Gómez, resultados parecidos observados en diferentes variedades de frambuesa (Arencibia et al., 2013). Estadísticamente el potencial de multiplicación de 'Netzahualcóyotl' es mayor que 'Gómez'; sin embargo, en RITA[®] adicionado con TRIA 5 µg L⁻¹, se puede obtener hasta 4.4 y 3.6 brotes por explante, respectivamente, similar (4.43) a lo obtenido por Demiralay et al. (1998) para

la variedad Bursa Siyahi. Debido a los resultados encontrados es factible realizar establecimiento *in vitro* por agar y multiplicación en RITA® para *Ficus carica* L.

3.6 Conclusiones

El uso de nano partículas de plata (Ag Nps), usado como microbicida, para lograr mayor asepsia en las mini estacas de higuera, fue efectivo a concentración de 50 y 75 ppm. Se observó mayor velocidad (4 semanas) de brotación en la mini estacas de 'Netzahualcóyotl', en comparación con 'Gómez', 'Kadota', y 'Black mission', con 6, 8 y 8 semanas a brotación, respectivamente.

El uso de 1-triacontanol a $10 \mu\text{g L}^{-1}$ incrementa el número de brotes en 'Black mission' y 'Kadota', en agar, mientras que a concentración de $5 \mu\text{g L}^{-1}$ incrementa el número de brotes en 'Netzahualcóyotl' y 'Gómez'. El genotipo marca diferencia en la etapa de la multiplicación. El sistema de biorreactores de inmersión temporal RITA® mejoró la longitud promedio de los brotes y las hojas por explante, en 'Netzahualcóyotl' y 'Gómez', por lo tanto es posible realizar multiplicación *in vitro* mediante RITA® para la especie *Ficus carica* L.

Se recomienda disminuir el tiempo de inmersión o aumentar el tiempo de intervalo de inmersión, en RITA®, así como utilizar otros tipos de sistemas comerciales, por ejemplo BIT® ó BIF®. Se puede continuar el presente trabajo aumentando las concentraciones de 1-triacontanol y realizando las etapas de enraizamiento y aclimatación, para tener el protocolo completo de propagación.

3.7 Literatura Citada

Arencibia D.A., Vergara C., Quiroz K., and Carrasco B. 2013. Establishment of photomixotrophic cultures for raspberry micropropagation in Temporary immersion Biorreactors. *Scientia Horticulturae* 160: 49-53.

- Asadi K. E., and Keramat B. 2017. Foliar spray of triacontanol improves growth by alleviating oxidative damage in coriander under salinity. *Indian Journal Plant Physiology* 22(1): 120–124.
- Bayouth C., Labidi R., Majdoub A., and Mars M. 2015. In vitro propagation of caprifig and female fig varieties (*Ficus carica* L.) from shoot-tips. *Journal of Agricultural Science and Technology* 17(6): 1597-1608.
- Bisi R.B., Locatelli G., Barbosa C.M.A., Pio R., and Balbi R.V. 2016. Rooting of stem segments from fig tree cultivars. *Acta Scientiarum – Agronomy Volume* 38(3): 379-385.
- Debnath S. C. 2008. Developing a scale-up system for the in vitro multiplication of thidiazuron-induced strawberry shoots using a bioreactor. *Canadian Journal of Plant Science* 88: 737-746.
- Demilaray A., Yalcim, M.Y., Aka, K.Y., and Cetiner, S. 1998. *In vitro* Propagation of *Ficus carica* L. Var. Bursa Sıyahi Thorough Meristem Culture. *Acta Horticulturae* 480. ISHS 1998. First International Symposium on Fig. Izmir, Turkey.165-167 pp.
- Etienne H., and Berthouly M. 2002. Temporary immersion systems in plant micropropagation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 69: 215–231.
- Flores M. D.M., Jiménez B.V., y Chacón C.R. 2009. Cultivo de tejidos en *Ficus carica* Con miniestacas. *Agronomía Mesoamericana* 20(2): 319-325.
- Florez L.S., Curtis S.M., Shaw E. S., Hamaker K. N., Larsen S.J., and Curtis R.W. 2016. A Temporary Immersion Plant Propagation Bioreactor with Decoupled Gas and Liquid Flows for Enhanced Control of Gas Phase. Wiley Online Library. Dept. of Chemical Engineering. The Pennsylvania State University, University Park. 337-345 pp.
- Frohlich E. 2017. Hemocompatibility of inhaled environmental nanoparticles: Potential used of *in vitro* testing. *Journal of Hazardous Material* (336): 158-167 pp.
- García R. M. 2015. Caracterización Morfológica y Genética de variedades mexicanas de higo (*Ficus carica* L.). Tesis de Doctorado en Ciencias. Recursos Genéticos y

Productividad-Fisiología Vegetal. Campus Montecillo- Colegio de Postgraduados. Edo. Méx. México. 158 pp.

Georgiev V., Schumann A., Pavlov A., and Bley T. 2014. Temporary immersion systems in plant biotechnology. *Engineer Life Science* 14: 607–621.

Gunver S., Ertan, B., Dag, S., and Gorucuoglu, P. 2017. Effect of in vitro thermotherapy application on shoot development in some fig cultivars. *Acta Horticulturae* 1173. ISHS 2017. V International Symposium on Fig. Napoly, Italy. 195-197 pp.

Quiala E., Cañal, M.J., Mejion, M., Rodríguez, R., Chávez, M., Valledor, L., de Feria, M., Barbón, R. 2012. Morphological y Physiological Responses of Proliferating Shoots of Teak to Temporary Inmersionand BTA Treatments.*Plant Cells Tiss Organ Cult* 109:223-234.

Mitrofanova I.V., Mitrofanova O.V., Lesnikova S.N.P., Chelombit S.V., Shishkina E.L., and Chirkov S.N. 2016. Phytosanitary status of *Ficus carica* collection orchards in Nikita Botanical Gardens and biotechnology of fig plants regeneration. *Acta Horticulturae* 1139: 303-309.

Murashige T., and Skoog F. 1962. A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *PHYSIOLOGIA PLANTARUM* 15: 473-497.

Nava G.A., Wagner A., Mezalira E., Cassol D.A., and Alegretti A.L. 2014. Rooting of hardwood cuttings of Roxo de Valinhos fig (*Ficus carica* L.) with different propagation strategies. *Revista Ceres* 61(6): 989-996.

Newton S.G., Haruko A.A., Sugitani C.J., Franke P.A.C., Rigon S.M., Lorenci W.A., Biasi L.A., and Ricardo S.C. 2009. Utilization of the biorreactor of immersion by bubbles at the micropropagation of *Ananas comosus* L. Merril. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 52: 37-43.

Pantinkis C.A. and Melas P. 1986. Micropropagation of *Ficus carica* L. *Horticulture Science* 21 (1): 156 p.

- Puente G.C.A., García, L.S., and Gutierrez, U.J. 2017. Enhancement of saponins and flavonols by micropropagation of *Agave salmiana*. *Industrial Crops & Products* 105:225-230.
- Quiala E., Cañal M.J., Mejion M., Rodríguez R., Chávez M., Valledor L., de Feria M., and Barbón R. 2012. Morphological y physiological responses of proliferating shoots of teak to temporary immersion and BTA treatments. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 109:223-234.
- Rama R. A.V., Yadav J.S., and Annapurna G.S. 1983. Synthesis of 1–triacontanol. *Synthetic Communications* 13 (4): 331-334
- Ramírez M.M.A., Iglesias A.L.G., Ramírez M. G., and Hernández R.E.U. 2016. Micropropagation of *Stevia rebaudiana* Bert, in temporary immersion systems and evaluation of genetic fidelity. *South African Journal of Botany* 106: 238 –243.
- Ramírez M.M.A., and Iglesias A.L.G. 2016. Evaluation of different temporary immersion systems (BIT®, BIG, and RITA®) in the micropropagation of *Vanilla planifolia* Jacks. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* 52: 154–160.
- Reddy N.J., Mata, R., Rani S.S. 2017. Green synthesized nano silver: Synthesis, physicochemical profiling, antibacterial, anticancer activities and biological in vivo toxicity. *Journal of Colloid and Interface Science* 499: 33–45.
- SAS, Statistical Analysis System 2011. Versión 9.3. SAS Institute Inc.
- SIAP, Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. 2015. Anuario Estadístico de Producción Agrícola. México D.F. 28 de abril de 2016. <<http://www.siap.gob.mx/cierre-de-la-produccion-agricola-por-cultivo/>>.
- Sharma S., Shahzad A., Mahmood S., and Saeed T. 2015. High-frequency clonal propagation, encapsulation of nodal segments for short-term storage and germplasm exchange of *Ficus carica* L. *Trees* 29(2): 345-353.
- Sontakke S., Nagavekar N., Kumari D. K., and Singhal R. 2018. Supercritical carbon dioxide extraction of triacontanol from green tea leaves and its evaluation as an

- unconventional plant growth regulator for spinach tissue culture. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* 16: 476-482.
- Teixeira G.H., Monah C. B.P., Aparecida B.T., and Scherwinski P.J.E. 2016. Regeneration of somatic embryos of oil palm (*Elaeis guineensis*) using temporary immersion bioreactors. *Industrial Crops and Products* 89: 244–249.
- Uribe E.M., Ulloa J., Delaveau C., Saez C., Muñoz F., and Cartes P. 2012. Influence of auxins on in vitro rooting of microshoots of *Nothofagus glauca* (Phil.) Krasser. *Gayana Botanica* 69(1): 105-112.
- Vidal N., Blanco D., and Cuenca B. 2015. A temporary immersion system for micropropagation of axillary shoots of hybrid chestnut. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 123: 229–243.
- Welander M., Persson J., Asp H., and Zhu L. H. 2014. Evaluation of a new vessel system based on temporary immersion system for micropropagation. *Scientia Horticulturae* 179: 227-232.
- Xiaochun L., Qiuyi Z., Yuxiang L., Ganghua L., Yanfeng D., Shaohua W., Zhenghui L., She T., Chengqiang D., and Lin C. 2016. Triacantanol reduces transplanting shock in machine-transplanted rice by improving the growth and antioxidant systems. *Frontier in Plant Science* 7(872): 1-10.
- Zerhoune M. 2003. Propagation of Five Fig (*Ficus carica* L.) Varieties under Field Conditions. II International Symposium on Fig. *Acta Horticulturae* 605: 103-106.

DISCUSIÓN GENERAL

1. Discusión

En esta investigación se integraron temas relacionados con la propagación vegetativa de higuera en cuatro variedades: Black mission, Kadota, Gómez y Netzahualcóyotl, partiendo desde la cuantificación de carbohidratos en tallos y determinación de clorofila en hojas, aplicando los métodos *in vivo* por mini estacas como *in vitro* en medios semisólido y en líquido en sistemas de inersión temporal (RITA®), con la finalidad de realizar un protocolo viable, para la propagación asexual masiva de higuera, adoptando e innovando las últimas tecnologías utilizadas en la horticultura para obtener plantas de calidad fitosanitaria, con el propósito de utilizar la menor cantidad de material vegetativo posible.

En la primera parte de esta investigación, se realizó la cuantificación de carbohidratos en tallos de las cuatro variedades analizadas, encontrando que a pesar de tener la misma edad y estando en la misma etapa fenológica, tienen diferente cantidad de glucosa en sus tallos, la acumulación de carbohidratos en tallos y hojas está relacionada con la etapa fenológica, la capacidad de absorción de luz de las hojas y el tipo de fotosíntesis (Pigman, 1957), otros autores mencionan que los azúcares (glucosa y fructosa) disminuyen al entrar en dormancia, pero aumentan los niveles de almidón en tallos (Ruiz et al. 2016), siendo una referencia para época de colecta de varetas de higuera con la finalidad de propagación. Se encontró que la variedad Netzahualcóyotl, tiene 6.16 mg, mientras que 'Black mission', 'Kadota', y 'Gómez' presentaron: 4.32, 3.76 y 2.72 mg, sobrepasando a las otras variedades por: 2.1, 3.6, y 4.6 mg más de glucosa en sus tallos, respectivamente. Indicando que tiene una ventaja fisiológica en reservas de glucosa con respecto a las demás, marcada por el genotipo, para el cultivo *in vitro* ó *in vivo* la cantidad de reservas del tallo ya sea en almidón ó glucosa es importante, debido a la mayor disponibilidad de nutrimentos para los procesos biológicos dentro de la estaca, aumentando la probabilidad de supervivencia y brotación del explante (Newton et al. 2009), de igual forma la asepsia del explante es relevante, debido a que, explantes contaminados a pesar de tener mayor crecimiento

pueden morir, en comparación con explantes con pocas reservas y lenta brotación, pero sin agentes contaminantes. La cantidad de reservas también afecta el tiempo de brotación de una variedad a otra, a pesar de ser de la misma especie, da pauta a manejar distintos métodos para cada una, en tiempos estimados para los cultivos subsecuentes o tiempo total de propagación (Quiala et al., 2012).

En cuanto a la determinación en concentración de clorofila de las hojas, de las cuatro variedades, se pudo observar el espectro característico de las clorofilas con su banda espectral entre los 645 y 663 nm, lo cual corresponde a clorofila a y b respectivamente (Stryer, 2002). Se encontró variación en concentración de clorofila por variedad: Nezhahualcóyotl al igual que en carbohidratos, presenta mayor concentración de clorofila a y b en hojas con 0.77 mg, con respecto a 'Black mission', 'Kadota' y 'Gómez', con 0.54, 0.47 y 0.34 mg de clorofila por cada 100 mL de solución, notándose claramente en el color de las muestras extraídas por variedad. Cuando existe mayor concentración de clorofila, indica que es más eficiente en la captación de luz para transformarla en carbohidratos mediante la fotosíntesis (Trumbo et al., 2013), sin embargo 'Black mission', y 'Kadota' se mantienen entre 0.4-0.5 mg/100 mL de clorofila, indicando su menor capacidad de absorción del espectro de luz. Por otro lado, 'Gómez' es la variedad con menor concentración de clorofila con 0.3 mg/ 100 mL. La mayor concentración de clorofila esta relacionada directamente con la concentración de carbohidratos, es decir, aumento de concentración de clorofila y un aumento de concentración de carbohidratos, para el caso de higuera de las cuatro variedades.

Los resultados obtenidos, correlacionan el genotipo con la concentración de clorofila de cada variedad, Nezhahualcóyotl es más eficiente en la captación de luz en comparación con las demás, por la mayor concentración de clorofila, dando ventaja respecto a las demás si se midiera la eficiencia fotosintética por área. En el cultivo *in vitro*, en la etapa de multiplicación, un factor a medir es el número de hojas, en donde algunas ocasiones no se tienen diferencia significativa, sin embargo, la cantidad de clorofila puede marcar una tendencia, en mayor captación de luz y rápida funcionalidad de las hojas, y por lo tanto, mayor velocidad de brotación y mayor tamaño, en comparación al resto de variedades.

La propagación tradicional de higuera es por medio de estacas e hijuelos, este método tiene la ventaja de evitar la juvenilidad e iniciar la producción de forma precoz, desde el primer ciclo agrícola, sin embargo, existen ciertas dificultades de enraizamiento para algunas variedades, por ejemplo en la literatura se han indicado porcentajes de enraizamiento del 10 al 45 % dependiendo de la variedad (Bisi et al., 2016; Espitia et al., 2014; Aradillas, 2016). Debido a lo anterior se realizó enraizamiento *in vivo*, con mini estacas de 5 cm, de las cuatro variedades, bajo condiciones de invernadero, con temperaturas promedio de 25 ± 5 °C y una humedad relativa del 70 % con sombra del 50 %, se utilizó como sustrato una mezcla de arena, tezontle y peat moss 1:1:1 v/v/v, utilizando diferentes concentraciones de AIB, del producto comercial Radix®. En el testigo sin aplicación de Radix®, no se obtuvo enraizamiento para las variedades 'Black Mission' y 'Kadota' en ninguna de las épocas evaluadas. La formación de callo en la base de las varetas fue contraproducente para la formación de la raíz, estos resultados concuerdan con lo encontrado por Arellano et al., (2014) quienes indican que la formación de callo es inversamente proporcional a la formación de raíces en lináloe. Por otro lado, los tratamientos testigo en los cultivares Gómez y Netzahualcóyotl presentaron un pobre enraizamiento del orden del 4 al 27%. Hartman y Kester (1983) mencionan que la lignificación y las reservas de las varetas son de vital importancia para lograr el enraizamiento, así como la concentración de auxinas. Por otro lado, Flaishman et al. (2008) mencionaron que la información genética de cada variedad tiene un efecto significativo sobre la habilidad de emitir raíces adventicias, en su trabajo que realizaron en las variedades de higuera 'Cuello de Dama Blanco' y 'Bursa', encontraron que hubo diferencias significativas en el enraizamiento de las variedades para el mismo tratamiento auxínico. Para la variedad Gómez los tratamientos T3 y T4, obtuvieron 85% y 63% de enraizamiento, respectivamente, siendo los más altos porcentajes, indicando el tejido de esta variedad enraíza favorablemente a concentraciones entre 1000 y 1500 ppm de AIB, con la variedad 'Ournaksi' Zerhoune, (2003) consiguió el 87 % de enraizamiento, él utilizó varetas de 25 cm de longitud y 1000 ppm de AIB, similar a los resultados de Bisi et al. (2016) quienes utilizaron concentraciones entre 1000 a 2000 ppm de AIB y pero solamente obtuvieron entre 10 y 45% de enraizamiento en 'Roxo de Valinhos'.

El mejor tratamiento para 'Black mission' y 'Kadota' fue T4 con 1500 ppm de AIB se obtuvo el mayor porcentaje de enraizamiento, para 'Gómez' fue el T3 con 1000 ppm de AIB y para 'Nezahualcóyotl' fue el T2 con 500 ppm de AIB. Cabe mencionar que en algunos tratamientos no existió raíz, solamente hubo presencia de callo en la base del tallo. Por otro lado, un exceso en la concentración de auxinas puede formar un menor número de raíces (4) con mayor longitud (7 cm) después de 60 días, como lo mencionó Bisi et al., (2016), quienes trabajaron con la variedad 'Roxo de Valinhos'. Sin embargo, la longitud de raíces en la variedad 'Nezahualcóyotl', fue diferente (1.4 cm) significativamente en comparación con las demás (2.1, 2.2 y 2.5 cm), en base a estos resultados se puede inferir que el uso de 500 ppm de AIB para esta variedad ocasiona buen enraizamiento pero con corta longitud, pudiendo otorgarse a el genotipo, después de 60 días. Indicando que la concentración de la auxina y de las características anatómicas y fisiológicas del tejido de cada variedad tiene diferente sensibilidad a la hormona, siendo 'Nezahualcóyotl' y 'Gómez' con mejor enraizamiento a menor concentración de AIB en comparación con 'Black mission' y 'Kadota'. Los resultados tienen congruencia con lo obtenido en al cuantificación de carbohidratos y clorofila, el tiempo de brotación de Netzahualcóyotl es en las primeras 4 semanas, mientras que 'Kadota' y 'Black mission' brotaron hasta 8 semanas después, mientras que 'Gómez' resulto intermedia ya que broto a las 6 semanas, a pesar de haber presentado menor contenido de carbohidratos en sus tallos. Nava et al. (2014) encontraron que la distribución de biomasa en la planta esta correlacionada con la concentración de reservas y azucares totales, concordando con los resultados de Mendoza Castillo (2015), quien analiza la cantidad de biomasa en frutos, tallos y hojas de higuera, de la variedad Netzahualcóyotl, en donde encontró mayor acumulación en tallos y hojas después de un ciclo de cultivo.

También se realizó propagación *in vitro*, los principales fitopatógenos causantes de la contaminación en establecimiento fueron; *Fusarium solani*, *Fusarium spp.*, *Aspergillus spp.*, y *Penicillium spp.*, además se encontraron bacterias, color rosa y blanca, quienes dificultaron el establecimiento y por lo cual se establecieron en 12 ocasiones para obtener material sano para la siguiente etapa. Sin embargo, se utilizó nano partículas de plata (AgNPs), por su efecto microbicida, en distintas concentraciones. No hubo

contaminación en todos los tratamientos durante las dos primeras semanas, mientras que, en la tercera semana se observó contaminación en los tratamientos T1 y T2, al final se encontró una diferencia estadística entre el tratamiento (T1) y los tratamientos (T2 y T3). El efecto microbicida de las AgNPs, está relacionado directamente con la concentración, y con su periodo de efectividad, no se observó oxidación ni toxicidad con los tratamientos empleados en las mini estacas de higuera a las concentraciones utilizadas. Después de 40 días el porcentaje de contaminación por tratamiento fue: T1) 52 %, T2) 28 % y T3) con 20 %. La rebrotación de los explantes fue más rápida cuando se usaron mayores concentraciones de AgNPs, Reddy et al. (2017), menciona que existe mayor elongación celular a concentraciones entre 50 a 200 ppm de AgNPs, logrando mayor desarrollo de brotes en *Ficus religiosa*, también encontró que causa toxicidad a concentraciones de 500 ppm. La rebrotación inició a las 4 semanas en 'Netzahualcóyotl' y en 'Gómez' inició a las 6 semanas, mientras que, para 'Kadota' y 'Black mission' la rebrotación se observó después de las 8 semanas. En el T1 con menor concentración de AgNPs, se presentó la mayor contaminación, así como la brotación fue menor en todas las variedades, indicando que la concentración no fue suficiente para hacer efecto en los tejidos y esporas de hongos, así como en bacterias, las mismas que dañan el tejido del explante, promoviendo estrés y evitando el enraizamiento como la brotación. El T3, presentó mayor uniformidad en la brotación, Zerhoune (2003) menciona que se acelera la mitosis en las células, y promueve la brotación y el crecimiento del sistema radical, también mostró una reducción del estrés oxidativo del explante, inhibiendo radicales libres, propiciando el crecimiento y la brotación de la yema. A las concentraciones utilizadas, de 25 a 75 ppm, no se tiene efectos contraproducentes, pudiendo elevar la concentración en futuros trabajos para obtener el menor porcentaje de explantes contaminados.

Debido a la alta contaminación por bacterias principalmente, además del lento crecimiento *in vitro* en medio semisólido de las variedades 'Black mission' y 'Kadota', solamente se realizó la multiplicación en agar, únicamente se realizó la etapa de multiplicación en RITA® con 'Gómez' y 'Netzahualcóyotl'.

En la etapa de multiplicación en el cultivo *in vitro* utilizando Sistemas de Inmersión Temporal (SIT), tipo RITA[®] (medio líquido), comparado con el sistema semi sólido tradicional en agar, Etienne y Berthouly (2002), realizaron la primera compilación en la implementación de SIT, en ella destacan varios cultivos con sus tiempos de inmersión recomendados, en la que no se encuentra la especie de *Ficus carica* L. Aradillas (2015), realizó multiplicación en SIT utilizando una inmersión de 1 minuto cada 6 horas, obteniendo 2.4 brotes por explante para 'Netzahualcóyotl', debido a ello se optó por mantener el mismo tiempo de inmersión, sin embargo en ambas variedades se observó la presencia de brotes sobre hidratados, debido al tiempo del explante inmerso en el medio líquido, cuando se desarrollaron en el sistema. Los resultados indican que el tipo de sistema RITA[®] influyó significativamente la longitud promedio de los brotes, obteniéndose para 'Netzahualcóyotl' y 'Gómez', brotes dos veces más largos en el sistema RITA[®] que en el de agar, debido a la mejor absorción del medio nutritivo líquido por el mayor contacto con el tejido del explante, además del intercambio gaseoso de CO₂ y oxígeno, aumentando la biomasa del explante. Se observó que la variedad Gómez tuvo una longitud promedio de brotes de 1.7 cm en el sistema de agar, mientras que en el sistema RITA[®] se obtuvo una longitud de 3.4 cm, en promedio el número de hojas para agar fue 7, mientras que en RITA[®] 6.8, sin embargo, estadísticamente no existen diferencias significativas. Sharma et al. (2015), obtuvieron un promedio en longitud de brotes de higuera de 3 cm, en un sistema de cultivo con agar, sin embargo no mencionó la variedad utilizada. Por otra parte, 'Netzahualcóyotl' aumento al doble, 1.7 cm la longitud del brote, y en 0.6 cm la longitud de la hoja en el sistema RITA[®] versus agar, consiguiéndose una longitud promedio de brotes de 3.4 cm, teniendo un mejor desarrollo, el explante absorbió mejor los nutrimentos en el medio líquido, en promedio el número de hojas para agar fue 6.1, mientras que en RITA[®] 7.7, sin embargo, estadísticamente no existe diferencia significativa.

Otro aspecto importante es el tiempo en que los brotes de ambas variedades estuvieron listas en cada uno de los sistemas de cultivo evaluado. Los brotes que crecieron en el sistema líquido estuvieron listos para ser transferidos a suelo a los 23 días del ciclo de cultivo, mientras que los que crecieron en el sistema semisólido,

estuvieron listos hasta el día 30, indican que la absorción de los nutrimentos aumenta en medio líquido, además de que el explante tiene mayor contacto y existe un movimiento de los gases dentro del sistema, ayudando a una mayor absorción de CO₂, favoreciendo el crecimiento del explante en menor tiempo, en comparación con el medio semisólido, quien el explante solamente tiene contacto con el agar en una área definida, y obtiene mayor resistencia a la absorción de nutrimento debido al medio semisólido. Flores et al. (2009), desarrollaron un protocolo para *Ficus carica*, quienes obtuvieron en promedio 3 brotes por explante, en 25 días, su mejor tratamiento fue MS al 100 % adicionando 1 mg L⁻¹ de BAP. A pesar de que el comportamiento de ambas variedades fue diferente, la variedad Netzahualcóyotl presentó mayor vigor que 'Gómez', al igual que en enraizamiento *in vivo* nuevamente esta correlacionada con los niveles de carbohidratos y clorofila, sin importar el sistema de cultivo utilizado, sin embargo, en ambas variedades el sistema de inmersión temporal fue más eficiente, debido al aumento en brotes en ambas variedades, existiendo una diferencia de genotipo entre variedades.

El 1-triacontanol (TRIA) es un promotor del crecimiento de última generación, es un alcohol saturado de cadena larga, que promueve el crecimiento en aplicación exógena, se ha probado en crecimiento de algas aumentando su biomasa 2 veces más en comparación sin su aplicación (Tastan et al. 2016). Además se ha encontrado que cuando se aplica 1-Triacontanol (10 µM) aumenta el contenido de clorofila y sacarosa, disminuyendo el daño oxidativo (Xiaochun et al. 2016). Debido a lo anterior fue ha sido probada para distintos fines en el cultivo de tejidos *in vitro*, por ejemplo en multiplicación se han utilizado pequeñas cantidades desde 0.01 µg L⁻¹ hasta 0.1 µg L⁻¹ (Sontakke et al., 2018). Se utilizó para la etapa de multiplicación en las cuatro variedades, sin embargo, para 'Black mission' y 'Kadota', solamente se establecieron en agar, debido al poco material que se obtuvo a partir del establecimiento, en 'Netzahualcóyotl' y 'Gómez' también se utilizó en RITA®, en todas las variedades se aplicaron tres tratamientos de 1-Triacontanol.

En 'Black mission' y 'Kadota', en agar, los tratamientos testigos T1, obtuvieron un solo brote por explante, en ambas variedades, no obstante, el tratamiento T2 (5 µg de TRIA)

se obtuvieron 1.5 y 1.9 brotes por explante, aumentó el número de brotes debido a la aplicación de TRIA, ya que fomenta una mayor estimulación hormonal y síntesis de proteínas (Tastan et al. 2016), y con el tratamiento T3 (10 μg de TRIA) se obtuvo 2.8 y 2.9 brotes por explante, en las mismas variedades. Pantikis et al., (1986) obtuvieron 2.6 brotes por explante en su mejor tratamiento con 'Lampa', aplicando 2.5 mg L^{-1} de AIB. El aumento en concentración de 1-triacontanol es proporcional al aumento en número de brotes por explante, en ambas variedades, no se encontró toxicidad, hiperhidricidad o deformación de los brotes por el aumento de la concentración de TRIA.

Para 'Netzahualcóyotl' y 'Gómez', únicamente el testigo resultó significativamente diferente a los demás tratamientos, mientras que la aplicación de 5 ó 10 μg de TRIA resultaron iguales en el número de brotes en ambas variedades, tanto en agar como en RITA[®], registrándose un aumento de 2 brotes por explante. Tastan et al. (2016), encontraron en su estudio que el TRIA aumentó el nivel de clorofila a y b, ocasionando un aumento de la biomasa, aspecto que coincide con nuestros resultados. Sharma et al. (2015), obtuvieron 6 brotes en promedio por explante en un sistema de cultivo de agar a los 30 días, ellos añadieron diferentes concentraciones de ANA, AIB y AIA, sin embargo, no mencionan el nombre de la variedad, que es fundamental. Por otra parte Bayoudh et al. (2015), encontraron que con 0.5 mg L^{-1} BAP y 0.1 mg L^{-1} ANA, se obtiene 4.5 brotes por explante, en 60 días, para la variedad 'Soltani', que es un higo blanco, indicando que con RITA[®] es posible acercarnos a su promedio en solamente 40 días. Las concentraciones de BAP y ANA son indispensables para la multiplicación, sin embargo, la concentración puede hacer la diferencia, entre obtener brotación u obtener tejido calloso, tal como lo mencionaron Uribe et al. (2012). Vidal et al. (2015), mencionaron que se puede utilizar un método híbrido de multiplicación, que tenga en un inicio el uso de los sistemas de inmersión temporal RITA[®] y en seguida un paso en sistema de agar, con lo que se obtiene una mayor homogeneidad en el tamaño de los brotes, así como un mejor control para plantas de porte alto. Con el uso de sistemas de inmersión temporal también han conseguido aumentar el número de brotes en piña (Newton et al., 2009). Por otro lado, Quiala et al. (2012), concluyeron que la asimilación de nutrientes en tallos y hojas en una vitroplanta, no está definida completamente, y debido a la apertura de los estomas por un ambiente húmedo constante, la asimilación

de nutrientes es mayor en RITA[®], debido al mayor contacto entre el medio y el explante, para la variedad Bursa Siyahi. Existen otros sistemas de inmersión temporal (SIT) como los BIT[®] y BIF[®], Ramírez et al. (2016), compara varios SIT, obteniendo que BIT[®], es mejor que RITA[®], en la multiplicación de *Vanilla planifolia* Jacks, coincidiendo con Sharma et al. (2015) al obtener 3 veces más brotes que en RITA[®], siendo opción para futuros estudios. También están diseñando nuevos SIT, como el descrito en el trabajo de Welander et al. (2014), quienes obtuvieron mayor proliferación con su diseño para *Digitalis lutea*, además se realizan mejoras y adaptaciones a sistemas ya existentes o en invención, para aumentar la capacidad del biorreactor, como lo describe Georgiev et al. (2014), al obtener mayor capacidad del SIT para así llegar a obtener una adaptación de manera comercial para gran escala en propagación de plantas. Netzahualcóyotl tiene mayor vigor que Gómez, resultados similares a los observados en la multiplicación *in vitro* de diferentes variedades de frambuesa (Arencibia et al., 2013). Estadísticamente el potencial de multiplicación de 'Netzahualcóyotl' es mayor que 'Gómez'; sin embargo, en RITA[®] adicionado con TRIA 5 µg L⁻¹, se puede obtener hasta 4.4 y 3.6 brotes por explante.

De acuerdo a los resultados obtenidos, la concentración de clorofila en hojas está estrechamente relacionada con la cantidad de carbohidratos (glucosa) en los tallos, en cada variedad, demostrado en el enraizamiento *in vivo* y en la propagación *in vitro*, notándose claramente que existe diferencia por el genotipo, a pesar de ser de la misma especie.

2. Literatura citada

Aradillas T.L. 2015. Micropropagación de higuera (*Ficus carica* L. cv. Netzahualcóyotl) a partir de yemas en condiciones de inmersión temporal. Mtro. Ciencias. Recursos Genéticos y Productividad-Fruticultura. Campus Montecillo-Colegio de Postgraduados. Edo. Méx. México. 86 pp.

Arellano Ostoia, G., González-Bernal, S.y Arellano-Hernández, G. 2014. El lináloe (*Bursera linanoe* (La Llave) Rzedowski, Calderón & Medina), especie maderable

- amenazada:una estrategia para su conservación. *Agroproductividad* Año 7 vol 7(3):42-51.
- Arencibia D.A., Vergara C., Quiroz K., and Carrasco B. 2013. Establishment of photomixotrophic cultures for raspberry micropropagation in Temporary immersion Biorreactors. *Scientia Horticulturae* 160: 49-53.
- Bayoudh C., Labidi R., Majdoub A., and Mars M. 2015. In vitro propagation of caprifig and female fig varieties (*Ficus carica* L.) from shoot-tips. *Journal of Agricultural Science and Technology* 17(6): 1597-1608.
- Bisi R.B., Locatelli G., Barbosa C.M.A., Pio R., and Balbi R.V. 2016. Rooting of stem segments from fig tree cultivars. *Acta Scientiarum – Agronomy* Volume 38(3): 379-385.
- Espitia Flores, C. B.; Arellano Ostoia, G.; Aradillas Tovar, L.A. y Mendoza Castillo, V.M. 2014. Efecto De La Época De Enraizamiento En Microestacas *In Vitro* De Higuera C.V. Netzahualcóyotl. *Acta Fitogenetica* Año 1 (1) pp:114.
- Etienne H., and Berthouly M. 2002. Temporary immersion systems in plant micropropagation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 69: 215–231.
- Flaishman M.; Rodov, V. y Stover, E. (2008): *The Fig: Botany, Horticulture and Breeding*; Hort. Rev. (34); pp. 113-196.
- Flores M. D.M., Jiménez B.V., y Chacón C.R. 2009. Cultivo de tejidos en *Ficus carica* Con miniestacas. *Agronomía Mesoamericana* 20(2): 319-325.
- Georgiev V., Schumann A., Pavlov A., and Bley T. 2014. Temporary immersion systems in plant biotechnology. *Engineer Life Science* 14: 607–621.
- Hartman H.T. and Kester, D.L. 1983. *Plant propagation: principles and practices*. 4th edition, Prentice-Hall, Inc., Englewood Cliffs, New Jersey. 854 p.

- Quiala E., Cañal, M.J., Mejion, M., Rodríguez, R., Chávez, M., Valledor, L., de Feria, M., Barbón, R. 2012. Morphological y Physiological Responses of Proliferating Shoots of Teak to Temporary Inmersionand BTA Treatments.Plant Cells Tiss Organ Cult 109:223-234.
- Mendoza C.V.M. 2013. Fisiología y manejo de la higuera (*Ficus carica* L.) en producción forzada bajo cubierta plástica. Dr. Ciencias. Recursos Genéticos y Productividad-Fisiología Vegetal. Campus Montecillo- Colegio de Postgraduados. Edo. Méx. México. 86 pp.
- Nava G.A., Wagner A., Mezalira E., Cassol D.A., and Alegretti A.L. 2014. Rooting of hardwood cuttings of Roxo de Valinhos fig (*Ficus carica* L.) with different propagation strategies. Revista Ceres 61(6): 989-996.
- Newton S.G., Haruko A.A., Sugitani C.J., Franke P.A.C., Rigon S.M., Lorenci W.A., Biasi L.A., and Ricardo S.C. 2009. Utilization of the biorreactor of immersion by bubbles at the micropropagation of *Ananas comosus* L. Merril. Brazilian Archives of Biology and Technology 52: 37-43.
- Pantinkis C.A. and Melas P. 1986. Micropropagation of *Ficus carica* L. Horticulture Science 21 (1): 156 p.
- Pigman W. 1957. The carbohydrates. Academic Press. New York.
- Quiala E., Cañal M.J., Mejion M., Rodríguez R., Chávez M., Valledor L., de Feria M., and Barbón R. 2012. Morphological y physiological responses of proliferating shoots of teak to temporary immersion and BTA treatments. Plant Cell, Tissue and Organ Culture109:223-234.
- Reddy N.J., Mata, R., Rani S.S. 2017. Green synthesized nano silver: Synthesis, physicochemical profiling, antibacterial, anticancer activities and biological in vivo toxicity. Journal of Colloid and Interface Science 499: 33–45.
- Ruiz M.S., Martín, A., Villalobos, M.C., Calle, A., Serradilla, M.J., Córdoba, M.G., Hernández, A. 2016. Yeasts isolated from figs (*Ficus carica* L.) as biocontrol agents of postharvest fruit diseases. Food Microbiology. Volume 57. Pp. 45-53.

- Sharma S., Shahzad A., Mahmood S., and Saeed T. 2015. High-frequency clonal propagation, encapsulation of nodal segments for short-term storage and germplasm exchange of *Ficus carica* L. *Trees* 29(2): 345-353.
- Sontakke S., Nagavekar N., Kumari D. K., and Singhal R. 2018. Supercritical carbon dioxide extraction of triacontanol from green tea leaves and its evaluation as an unconventional plant growth regulator for spinach tissue culture. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* 16: 476-482.
- Stryer L., Berg, J., and Tymoczko, J. 2002. *Biochemistry*. 5^a edición Freeman, NewYork. 974 pp.
- Tastan B.E., Duygu, E., Ilbas, M., Donmez, G. 2016. Enhancement of microalgal biomass production and dissolved inorganic C fixation from actual coal flue gas by exogenous salicylic acid and 1-triacontanol growth promoters. *Scientific and Technological Research Council of Turkey (103)*: 598-604.
- Trumbo T, Schultz, E, Borland, M, & Pugh, M. 2013. *Applied Spectrophotometry: Analysis of a Biochemical Mixture. Laboratory Exercise*, 242-250.
- Uribe E.M., Ulloa J., Delaveau C., Saez C., Muñoz F., and Cartes P. 2012. Influence of auxins on in vitro rooting of microshoots of *Nothofagus glauca* (Phil.) Krasser. *Gayana Botanica* 69(1): 105-112.
- Vidal N., Blanco D., and Cuenca B. 2015. A temporary immersion system for micropropagation of axillary shoots of hybrid chestnut. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 123: 229–243.
- Welander M., Persson J., Asp H., and Zhu L. H. 2014. Evaluation of a new vessel system based on temporary immersion system for micropropagation. *Scientia Horticulturae* 179: 227-232.
- Xiaochun L., Qiuyi Z., Yuxiang L., Ganghua L., Yanfeng D., Shaohua W., Zhenghui L., She T., Chengqiang D., and Lin C. 2016. Triacontanol reduces transplanting shock in machine-transplanted rice by improving the growth and antioxidant systems. *Frontier in Plant Science* 7(872): 1-10.

Zerhoune M. 2003. Propagation of Five Fig (*Ficus carica* L.) Varieties under Field Conditions. II International Symposium on Fig. *Acta Horticulturae* 605: 103-106.

CONCLUSIONES GENERALES

En la cuantificación de carbohidratos como glucosa de los tallos, la variedad Netzahualcóyotl presentó mayor concentración con 6.16 mg, mientras que 'Black mission', 'Kadota', y 'Gómez' presentaron: 4.32, 3.76 y 2.72 mg, respectivamente, en clorofila también presenta mayor concentración de clorofila a y b en hojas, superándolos por 0.2, 0.3 y 0.4 mg de clorofila por cada 100 mL de solución, tiene mayor eficiencia en la captación de luz, por lo tanto mejora el proceso de fotosíntesis, aumentando la cantidad de carbohidratos acumulados en el tallo como glucosa.

La relación clorofila-carbohidratos está relacionada, es decir, a mayor concentración de clorofila a y b en hojas, mayor acumulación de carbohidratos en forma de glucosa en los tallos, existe variación genotípica entre variedades.

Para la propagación *in vivo* es posible utilizar mini estacas de 5 cm con 2 nudos, para el enraizamiento de: 'Black mission', 'Kadota', 'Gómez' y 'Netzahualcóyotl', bajo condiciones de invernadero a 25 ± 5 °C y una humedad relativa del 70 % con sombra del 50 %.

Las mejores concentraciones para el enraizamiento de las variedades anteriores oscilan entre 500 a 1500 ppm de AIB, en diluciones del producto comercial Radix® 3000 líquido. Existen diferencias en la capacidad de enraizamiento entre variedades, debido a la sensibilidad del tejido a la concentración de la auxina, a pesar de ser de la misma especie, relacionado directamente con la concentración de glucosa en tallos.

El en cultivo *in vitro*, el uso de nano partículas de plata (Ag Nps), usado como microbicida, para lograr mayor asepsia en las mini estacas de higuera, fue efectivo a concentración de 50 y 75 ppm. Se observó mayor velocidad (4 semanas) de brotación en la mini estacas de 'Netzahualcóyotl', en comparación con 'Gómez', 'Kadota', y 'Black mission', con 6, 8 y 8 semanas a brotación, respectivamente.

En la etapa de multiplicación del cultivo *in vitro*, el uso de 1-triacontanol a $10 \mu\text{g L}^{-1}$ incrementa el número de brotes en 'Black mission' y 'Kadota', en agar, mientras que a

concentración de 5 $\mu\text{g L}^{-1}$ incrementa el número de brotes en 'Netzahualcóyotl' y 'Gómez'. El genotipo marca diferencia en la etapa de la multiplicación.

El sistema de biorreactores de inmersión temporal RITA[®] mejoró la longitud promedio de los brotes y las hojas por explante, en 'Netzahualcóyotl' y 'Gómez', por lo tanto es posible realizar multiplicación *in vitro* mediante RITA[®] para la especie *Ficus carica* L.

Se recomienda realizar experimentos con plantas en invernadero, aplicando fungicidas y bactericidas en campo, antes de cortar las varetas, así como utilizar varios tamaños de estacas de distintos diámetros. A su vez, se sugiere realizar análisis de clorofila y carbohidratos, a la par que el establecimiento *in vitro* o enraizamiento *in vivo*, para tener correlaciones directas, en tiempo de brotación, calidad del brote y enraizamiento.

Para la propagación *in vitro* mediante RITA[®] se recomienda disminuir el tiempo de inmersión o aumentar el tiempo de intervalo de inmersión, así como utilizar otros tipos de sistemas comerciales, por ejemplo BIT[®] ó BIF[®]. Se puede continuar el presente trabajo aumentando las concentraciones de 1-triacontanol y realizando las etapas de enraizamiento y aclimatación, para tener el protocolo completo de propagación.