



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCION DE ENSEÑANZA E INVESTIGACION EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO DE RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD

FRUTICULTURA

**MICROPROPAGACIÓN DE HIGUERA (*Ficus carica* L. cv.
Netzahualcóyotl) A PARTIR DE YEMAS EN CONDICIONES DE
INMERSION TEMPORAL.**

LUIS ÁNGEL ARADILLAS TOVAR

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL

PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MEXICO

2015

La presente tesis titulada: MICROPROPAGACIÓN DE HIGUERA (*Ficus carica* L. cv. Netzahualcóyotl) A PARTIR DE YEMAS EN CONDICIONES DE INMERSION TEMPORAL. Realizada por el alumno: Luis Ángel Aradillas Tovar, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

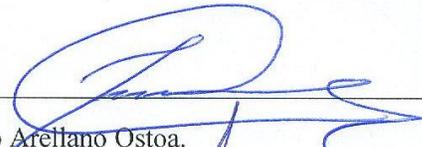
MAESTRO EN CIENCIAS

RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD

FRUTICULTURA

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO


Dr. Gregorio Arellano Ostoá.

ASESOR


Dr. Eduardo García Villanueva.

ASESOR


Dr. Víctor Manuel Mendoza Castillo.

Montecillo, Texcoco, Estado de México, Febrero del 2015

MICROPROPAGACIÓN DE HIGUERA (*Ficus carica* L. cv. Netzahualcóyotl) A PARTIR DE YEMAS EN CONDICIONES DE INMERSION TEMPORAL.

Luis Angel Aradillas Tovar, M.C.

Colegio de Postgraduados, 2015.

El Higo (*Ficus carica* L.) cuenta con un valor nutricional excelente. Tradicionalmente propagado por acodos aéreos y estacas, métodos con desventaja al generar una sola planta por material original además de ser muy tardado. Por otro lado, el cultivo *in vitro* y el uso del sistema de inmersión temporal (SIT) han demostrado ser una alternativa eficaz al producir plantas libres de enfermedades y a corto plazo, además al combinar las técnicas tradicionales de producción de estacas con el método de asepsia y desinfección del cultivo de tejidos, se creó una novedosa alternativa para cubrir la fuerte demanda de plantas que existe hoy en día, dado que en México se pretende aumentar la superficie sembrada para abastecer al menos 220 toneladas anuales de fruta fresca al mercado de exportación. El objetivo del presente trabajo fue obtener el mayor número de brotes axilares y de plantas con el cultivo de microestacas provenientes de árboles adultos de higuera cv. Netzahualcóyotl. Para el establecimiento *in vitro* de ambos métodos de micropropagación se utilizó un sistema de desinfección con fungicidas y bactericidas seguido de un tratamiento de OH 30 seg y Cl 20 min, para el cultivo de ápices se utilizó un medio semisólido MS modificado, mientras que para el uso de microestacas se manejó arena de río revuelta con agrolita 2:1 v/v. La mayor proliferación la proporciono el tratamiento con BA 0.2 mg L⁻¹ + ANA 0.02 mg L⁻¹ dando como resultado un promedio de dos brotes por explante. El tamaño de los brotes obtenidos independientemente del tratamiento osciló entre 0.2 y 1.93 cm, con 1 a 3 hojas. Mientras que con el uso de 1-Triacontanol junto con los anteriores, se aumentó el número de brotes a 3. Por otro lado el mejor tratamiento para enraizar las microestacas fue el de 1000 ppm mientras que el de 500 ppm genero las raíces de mayor tamaño (5.25 cm). Con este protocolo, la incorporación del SIT y el cultivo de microestacas se dan alternativas más eficientes para cumplir con el objetivo de abastecer el número de plantas suficientes para los productores en menor tiempo y con mayor calidad.

Palabras Clave: Cultivos semisólidos, Biorreactores, Microestacas, Micropropagación,

1-Triacontanol.

MICROPROPAGATION FIG (*Ficus carica* L. cv. Netzahualcóyotl) FROM BUDS IN CONDITIONS OF IMMERSION TIME.

Luis Angel Aradillas Tovar, M.C.

Colegio de Postgraduados, 2015.

The Fig (*Ficus carica* L.) has an excellent nutritional value. Traditionally propagated by air-layering and cuttings, methods disadvantage to generate a single plant per original material in addition to being very slow. Furthermore, *in vitro* culture system and the use of temporary immersion (SIT) have proven to be an effective alternative to produce plants free from short-term illnesses, further by combining traditional production techniques stakes with the method of sterilization and disinfection of tissue culture, a novel alternative was created to meet the strong demand of plants that exist today, Mexico aims to increase planted areas to supply at least 220 tons of fresh fruit to annually export it. The aim of this study was to obtain the highest number of axillary shoots and plants growing from adults microcuttings fig trees cv. Netzahualcóyotl. To establish *in vitro* micropropagation of both methods a disinfection system with fungicides and bactericides used followed by treatment of OH 30 sec and Cl 20 min, apices for growing a semisolid modified MS medium was used, while for the use of micropiles river sand revolt was managed with agrolita 2: 1 v / v. The most proliferation was provided for treatment with BA 0.2 mg L⁻¹ + ANA 0.02 mg L⁻¹ resulting in an average of two shoots per explant. The size of the shoots obtained regardless of treatment ranged from 0.2 to 1.93 cm, with 1-3 leaves. While using 1-Triacontanol together with the above, the number of buds was increased to 3. Furthermore the best treatment for anchoring the microcuttings was 1000 ppm while the genre 500 ppm larger roots (5.25 cm). With this protocol, the incorporation of SIT and cultivation of microcuttings more efficient to meet the objective of supplying a sufficient number of plants for producers in less time and with higher quality alternatives exist.

Keywords: Semisolid cultures, Benzyladenine, Bioreactors, Microcuttings, Micropropagation, 1-Triacontanol.

AGRADECIMIENTOS

Primeramente quiero agradecer a Dios por permitirme lograr una meta más en mi vida y sobretodo en mi formación profesional.

A la ciudadanía mexicana, que con su trabajo hace posible el financiamiento al Concejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por su apoyo al financiar parte de mi formación, al Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo al darme los conocimientos y las herramientas necesarias para llevar acabo mi desempeño en mi trabajo de investigación.

Al Consejo Mexiquense de Ciencia y Tecnología (COMECyT) por otorgarme la beca para tesis de posgrado.

Al Dr. Gregorio Arellano Ostoa por su paciencia y apoyo durante todo el desarrollo de mi trabajo, como también por sus conocimientos brindados para la realización de este.

Al Dr. Eduardo García y Dr. Víctor Mendoza (integrantes de mi concejo particular) al enseñarme sus conocimientos técnicos y científicos como también por sus buenos concejos durante todo este tiempo.

A mis padres Ma. Lucila Tovar Meléndez y Jonás Aradillas Molar por guiarme por un buen camino como también por su infinito apoyo y motivación para seguir adelante y toda mi familia por su apoyo incondicional y sus buenos deseos siempre a hacia mí, así como también a mi pareja Daniela Rangel por todo su apoyo y por estar a mi lado durante todo este camino de buenos y malos momentos en cumplimiento de esta meta.

A mi tío Luis A. Tarango y familia, a mi hermano Adoná y mis amigos Javier E., Luis A., Berenice, Claudia, Fernando como también a todas las personas que me apoyaron en el trayecto de mi estancia en el colegio.

DEDICATORIA

Con mi más grande cariño y esfuerzo dedico esta investigación a quienes me han guiado, apoyado y han sido fuente de inspiración y motivación. A mis padres Ma. Lucila Tovar y Jonás Aradillas a mis abuelitos Ma. Isabel Meléndez y Tomas Tovar, a mi pareja Daniela Rangel, a mis hermanos Rubi Arabela y Adenai Jonás a mis sobrinos Dana, Elián, Maya y Ari como también a mis tías Cecilia y Eva.

CONTENIDO

LISTA DE CUADROS.	xi
LISTA DE FIGURAS	xiii
1. INTRODUCCIÓN	1
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	3
2.1 Propiedades y fisiología de la higuera como también su producción mundial y nacional.	3
2.2 Aspectos fisiológicos y propiedades de la higuera.	3
2.2.1 Producción mundial y nacional de higuera.	5
2.3 Métodos de propagación de la planta de higuera.	7
2.3.1 Propagación tradicional de higuera.	8
2.4 Biotecnología.	9
2.4.1 Propagación <i>in viro</i> de higuera.	9
2.4.2 Cultivo <i>in vitro</i> en sistema tradicional ST.	10
2.4.3 Asepsia en el cultivo <i>in vitro</i>	10
2.4.4 Establecimiento <i>in vitro</i>	12
2.5 Multiplicación <i>in vitro</i>	14
2.5.1 Características de los reguladores de crecimiento.	14
2.5.2 Uso de las fitohormonas en el cultivo <i>in vitro</i>	15
2.5.3 Reguladores de crecimiento de nueva generación.	18

2.6	Uso de biorreactores.	18
2.7	Propagación <i>in vitro</i> por microestacas.....	20
2.7.1	Aclimatización.	21
3.	OBJETIVOS.....	23
3.1	Objetivo general.....	23
3.2	Objetivos específicos.	23
4.	HIPOTESIS.....	23
5.	MATERIALES Y MÉTODOS.	24
5.1	Área de trabajo.....	24
5.2	Desinfestación de los explantes a utilizar.	24
5.3	Establecimiento <i>in vitro</i> en el ST.....	25
5.4	Multiplicación <i>in vitro</i> en el ST.....	27
5.5	Comparación entre 1-Triacontanol (TRIA), ANA y BA.	27
5.6	Multiplicación en Sistema de inmersión temporal (RITA [®])	28
5.6.1	Material vegetal.....	28
5.6.2	Multiplicación en el SIT.....	29
5.7	Enraizamiento de microestacas en condiciones asépticas <i>in vitro</i>	29
5.7.1	Desinfestación de microestacas.....	30
5.7.2	Material usado para la siembra de microestacas.	30
5.7.3	Etapas de establecimiento y enraizamiento de microestacas.....	31

5.8 Variables estudiadas.	32
5.9 Análisis Estadístico.	32
5.9.1 Propagación en el ST y SIT.	32
5.9.2 Propagación por microestacas.	33
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.	34
6.1 Etapa de desinfestación.	34
6.2 Capacidad de brotación de los explantes durante los primeros subcultivos.	36
6.3 Periodo de estabilización de los cultivos.	37
6.3.1 Efecto de los reguladores de crecimiento ANA, BA y TDZ.	38
6.4 Multiplicación del cultivar con 1-TRIACONTANOL.	42
6.4.1 Efecto de 1-TRIACONTANOL en el sistema tradicional <i>in vitro</i> de higuera cultivar Netzahualcóyotl.	42
6.5 Multiplicación en el sistema de inmersión temporal SIT.	46
6.5.1 Comparación entre la micropropagación generada en el sistema tradicional en semisólidos (ST) y el sistema de inmersión temporal (SIT) con el uso de hormonas convencionales y de nueva generación.	46
6.6 Enraizamiento de microestacas de higuera cultivar Netzahualcóyotl en condiciones <i>in vitro</i> con el uso de peat moss y arena de río como sustrato.	51
6.6.1 Efecto de cuatro concentraciones de enraizador formulado a partir del producto comercial Radix 10000 [®]	54

6.6.2 Emisión de raíces durante las tres épocas del año evaluadas bajo 4 tratamientos formulados a partir del enraizador comercial Radix 10000 [®] y un testigo sin enraizador.	56
7. Conclusiones	61
8. Literatura Citada.....	62

LISTA DE CUADROS.

Cuadro 1. Producción Mundial de higo por año.	5
Cuadro 2. Producción anual de higo a nivel nacional.	7
Cuadro 3. Tratamientos de Etanol y Cloro comercial par desinfestación de ápices de higuera.	25
Cuadro 4. Medio de cultivo utilizado para la micropropagación de higuera.	26
Cuadro 5. Tratamientos de 1-Triacontanol contra ANA y BA.	28
Cuadro 6. Porcentaje de ápices libres de agentes fúngicos y bacterianos con 4 distintos tiempos de etanol al 70 % y cloro comercial al 20 %.....	35
Cuadro 7. Número total de brotes, hojas y tamaño alcanzado durante el primer subcultivo de ápices de higuera cultivar Netzahualcóyotl, establecidos en un medio ms modificado con dos relaciones de BA y ANA.....	36
Cuadro 8. Efecto de ANA, BA y TDZ en tres distintos tratamientos en relación a número de brotes, hojas y tamaño del explante de higuera en el sistema tradicional (ST).	40
Cuadro 9. Respuesta al uso de 1-TRIACONTANOL en el sistema tradicional semisólido (ST).....	44
Cuadro 10. Uso del sistema de inmersión temporal (ST) con RITAS [®] en comparación al sistema tradicional (ST) bajo las mismas condiciones de incubación y con dos diferentes tratamientos.....	49
Cuadro 11. Número y tamaño de raíces generadas en base al promotor de enraizamiento AIB liquido en 5 distintas concentraciones con un testigo sin enraizador.	53

Cuadro 12. Porcentaje de enraizamiento en promedio de las tres épocas del año causado por las 4 distintas formulaciones de Radix 10000®.....	54
Cuadro 13. Porcentaje de sobrevivencia de microestacas evaluadas durante las tres diferentes épocas del año (primavera verano y otoño).....	56
Cuadro 14. Emisión de raíces por época de año y tratamientos de 0, 250, 500, 750, 1000 ppm en condiciones in vitro evaluadas al paso de 30 días después de ser sembradas.	57
Cuadro 15. Efecto de cada tratamiento formulada a partir del enraizador comercial Radix 10000® en cuanto el tamaño obtenido de raíces generadas en las microestacas durante tres épocas distintas en el año.....	59

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Explante de higuera en desarrollo y libre de agentes contaminantes..... 35
- Figura 2.** Etapa de estabilización de *Ficus carica* L. cultivar Netzahualcóyotl bajo tres distintos tratamientos de ANA, BA y TDZ en el sistema tradicional de cultivo in vitro..... 38
- Figura 3.** Aspecto de brotes de higuera cultivar Netzahualcóyotl en el sistema tradicional (ST). a) Condiciones de cultivo en los tres diferentes tratamientos de hormonas de crecimiento convencionales. b) Modo de localización de los explantes dentro de su frasco. c) Número de brotes y número de hojas con BA 0.2 mg L⁻¹ + ANA 0.02 mg L⁻¹. c) Tamaño promedio obtenido por explante en relación al tratamiento de BA 0.5 mg L⁻¹ + ANA 0.05 mg L⁻¹ 41
- Figura 4.** Efecto de 1-Triacontanol sobre el cultivo de higuera en el sistema semisólido. a) Número de brotes por efecto de TRIA 5 µg L⁻¹. b) Aspecto y número de hojas obtenidas con la hormona de crecimiento TRIA. c) Tamaño alcanzado por los explantes desarrollados con 5 µg L⁻¹ de TRIA. d) Desarrollo de la raíz por motivo del 1-Triacontanol en el (ST)..... 45
- Figura 5.** Explantes generados con base al sistema de inmersión temporal RITA[®]. a) Modo de empleo y condiciones de incubación para el (SIT). b) Desarrollo de los explantes de higuera dentro de los recipientes de inmersión temporal RITA[®]. c) Número de brotes por efecto del TRIA en condiciones de inmersión temporal. d) Tamaño obtenido y número de hojas generadas a partir de la inmersión temporal. 50

Figura 6. Primer ensayo de microestacas en charolas SIGMA™ con AIB líquido como enraizador. a) Exceso de humedad en las microestacas enraizadas con AIB dentro de la charola. b) Enraizamiento generado a partir de 0.1 mg L ⁻¹ de AIB líquido.	53
Figura 7. Porcentaje de enraizamiento resultado tanto de las 4 formulaciones a partir del enraizador comercial Radix 10000® como también por el efecto de la época del año.....	55
Figura 8. Producción de microestacas de higuera bajo la combinación del sistema tradicional y el sistema del cultivo in vitro. a) Modo de esterilización de los tubetes contenedores del sustrato y la microestaca. b) Método de siembra de las microestacas dentro de los tubetes. c) Proceso de limpieza de las raíces generadas por los tratamientos formulados a partir del enraizador comercial Radix 10000®. d) Raíces generadas en la mejor época de enraizamiento (primavera). e) Número y tamaño generado a partir de 500 ppm de Radix 10000® en la época de primavera. f) Microestacas llevadas a condiciones de invernadero.....	58
Figura 9. Plantas de higuera cultivar Netzahualcóyotl obtenidas a través del cultivo de microestacas in vitro en condiciones de invernadero.....	60

1. INTRODUCCIÓN

El higo es un fruto que proporciona un alto valor nutricional, ya sea tanto como fruta fresca o seca, una cualidad mas es que aporta una alta alcalinidad y acción laxante en fármacos de preparación (Criticar y Basu, 1986). También este fruto es rico en azúcares y vitaminas A, B y C (Flores y Jiménez, 2007).

En México, tiene un uso mínimo, usándose solo para producir fruta cristalizada, siendo así un complemento en la alimentación y progresando tan solo como un huerto de traspatio. Sin embargo, su antigüedad abarca desde las primeras higueras introducidas en 1560, cultivándose de manera aislada. Mientras que en lugares como Estados Unidos, esta especie se cultiva de manera comercial; un ejemplo de ello es el estado de California contando con 8,000 hectáreas, lo cual genera un valor superior a los 15 millones de dólares (Reyes, 2010).

La higuera se ha multiplicado tradicionalmente por medio de estacas y acodos, dando buenos resultados en países que son grandes productores (Flores, 1990). En la aplicación de estas técnicas se requiere que las plantas se encuentren en etapa vegetativa y solo produce una planta por estaca, en muchos de los casos, no cumple con las exigencias del mercado, limitando así la producción masiva de este cultivo (Rojas *et al.*, 2004).

El cultivo *in vitro* se caracteriza por producir plantas masivamente en espacios reducidos y en un menor tiempo, como también en conseguir plántulas libres de cualquier agente patógeno, y es muy utilizado también para la preservación de las especies de importancia, ya que se puede obtener plantas en cualquier época del año y su máximo aprovechamiento del propágulo vegetal (Flores, 1990).

Recientemente se han implementado nuevas estrategias en el cultivo de tejido buscando superar las limitaciones que puede presentar la micropropagación. Una de las más importantes es el uso de biorreactores de inmersión temporal entre otros sistemas líquidos presentan producción a bajo costo, se ha reportado que la producción de plantas en este sistema de inmersión temporal a comparación a el cultivo de tejidos convencional ha logrado reducir los costos en la producción de entre 40 y 60 % pero también mejora de manera significativa la calidad de la planta (Chu, 1995), por estos motivos se decidió utilizar estos sistemas en esta especie.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 Propiedades y fisiología de la higuera como también su producción mundial y nacional.

2.2 Aspectos fisiológicos y propiedades de la higuera.

La higuera tiene una clasificación taxonómica perteneciente al reino plantae, filo Magnoliophyta, clase Urticales, familia Moraceae, genero Ficus y su especie corresponde a carica (Flores y Jiménez, 2007). El fruto de higuera como tal aporta a la nutrición humana tanto como glucosa y fructuosa, pero también provee importantes minerales como los son el calcio y magnesio (Sabed y Sabir, 2005; Goncalves *et al.*, 2006; Aljane *et al.*, 2007). Al consumir un higo fresco, se está adquiriendo también un alto porcentaje de antocianinas, polifenoles totales y flavonoides totales (Mendoza, 2009). Donde (Solomon *et al.*, 2006) aseveran que estos compuestos son asociados a actuar como antioxidante contribuyendo así a mejorar la salud y prolongación de la juventud en quien los consuma.

Las hojas de *F. carica* poseen un aceite de categoría esencial donde se han logrado identificar los monoterpenos beta farneseno, limoneno, linalol, mirceno, beta-ocimeno, alfa y beta-pineno y sabineno; y los sesquiterpenos cariofileno, alfa-farneseno y germacreno D. Asimismo, las hojas también contienen las camarinas bergapteno, marmesín, psobrán, psoralén, el 4'-5'-dihidro-compuesto, umbeliferona, xantotoxín y xantotoxol; los triterpenos beta-amirina, acetato de calotropenol, 24-meti-lene-cicloartenol, acetato de lupeol, ácido oleanólico, taraxasterol, baurenol; los flavonoides, rutín, schaftósido y el iso-componente;

los alcaloides N.N-dimetil-antranilato y *Ficus carica* piridilos I, II, III, IV y V; la sapogenina ficosugenín; y el componente fenílico, glucofuranósido del ácido ficosumárico.

Los flavonoides específicos que se han podido observar en el fruto son antocianina, astragalín, rutinósido de quercetín, rutín, schaflóside; la cumarina glucósido de psoralén, el carotenoide beta-caroteno; y el componente azufrado 2-etil-1-2-dehidro-tiofeno. La planta completa presenta cumarinas bergapteno, psoralen, escopoletín y umbeliferona. (Zolla y Argueta, 2011).

La composición nutrimental constituye una de las características más importantes, pues de ello depende la calidad comercial que tome el fruto. Al alcanzar su madurez proporciona azúcares como la glucosa en cantidades de 1.216 a 6.133 g 100⁻¹g de peso fresco en el fruto y fructuosa 1.916 a 4.658 g 100⁻¹ g de peso fresco del fruto (Aljane *et al.*, 2007).

Tanto el higo fresco como seco aportan elementos minerales como el K, Ca, Mg y Zn de los cuales se destacan el Ca y el Mg (Aljane *et al.*, 2007). El jugo del higo que ha sido extraído de la pulpa presenta: P, Ca, Mg, K, Na, Fe y en menores cantidades Cu, Ni, Co, Ba, Zn, Cr, Mn, Sr, Cd y Al. Fundamentales en las exigencias dietéticas de los humanos (Saber y Sabir, 2005).

También por su contenido de antocianinas, polifenoles totales y flavonoides totales, presentan una función como antioxidante en el cuerpo humano. (Solomon *et al.*, 2006).

2.2.1 Producción mundial y nacional de higuera.

Este frutal tiene una procedencia de la zona del mediterráneo (Khadari *et al.*, 2005). En algunos países como Turquía, Brasil, España y Portugal, entre otros, disponen de grandes cantidades de su territorio para su cultivo. Esto debido a su valor económico que ha ido ascendiendo, en muchos países (Flores y Jiménez, 2007). Los únicos países que compiten contra ellos son Irán, EE.UU. y Brasil (Agusti, 2010) (Cuadro 1).

Cuadro 1. Producción Mundial de higo por año.

País	Toneladas producidas por año					
	2007	2008	2009	2010	2011	2012
Turquía	210,152	205,067	244,351	254,838	260,508	274,535
España	25,906	30,828	24,400	30,351	28,993	24,900
Brasil	23,225	22,565	24,146	25,727	26,233	28,010
Italia	17,013	15,900	18,000	12,022	12,171	10,054
China	8,000	9,000	10,000	10,000	11,000	12,000
México	6,123	5,000	3,186	3,640	3,642	4,591
Francia	2,251	3,577	3,494	3,405	2,678	3,187
Total	292,670	291,937	327,577	339,982	345,225	357,277

Principales países productores de Higo fresco por volumen anual en toneladas y total mundial 2007-2012. Fuente elaboración propia según FAO (2014).

Si bien la producción de Higo en algunos países europeos está decreciendo al igual que en México estos últimos años, mientras que en otros como en Turquía va en ascenso.

En México el cultivo de la higuera solo cuenta con una superficie plantada de aproximadamente 840 hectáreas, lo cual solo nos produce anualmente 3,400 toneladas, en donde presenta un precio de 5 y 10 pesos por kilogramo. Mientras que en los estados de Baja California y Sonora su precio difiere, esto debido a la calidad que presenta producto, alcanzando hasta los 20 pesos por kilogramo (Reyes, 2010).

Los estados productores de higo en el país son Morelos (85 %), Hidalgo (14 %), Veracruz (10 %), Baja California Sur (6.5 %), Distrito Federal (3.5%), Puebla (2.6), Durango (2.4 %), San Luis Potosí (1.5%), Sonora (1.1 %) y Baja California Norte (0.4 %) (Cuadro 2) (Reyes, 2010).

Cuadro 2. Producción anual de higo a nivel nacional.

Año	Sup. Sembrada (Ha)	Sup. Cosechada (Ha)	Producción (Ton)	Rendimiento (Ton/Ha)
1999	1,213.00	853	3,067.70	3.6
2000	1,170.00	825	2,425.26	2.94
2001	942	828	2,798.90	3.37
2002	994.5	898.5	2,770.20	3.08
2003	998.5	895	3,094.70	3.46
2004	1,024.60	919.1	3,893.20	4.24
2005	1,051.40	976.7	4,644.40	4.76
2006	1,047.35	1,034.35	6,340.65	6.13
2007	1,086.05	1,084.05	6,122.89	5.65
2008	836.45	803.45	3,430.01	4.27
2009	860.95	814.95	3,185.87	3.91
2010	1,201.45	826.45	3,640.30	4.4
2011	1,302.55	813.55	3,641.63	4.48
2012	1,204.55	1,092.55	4,590.78	4.20
2013	1,194.55	1,155.55	5,255.03	4.56
Totales	16,127.90	13,820.20		

Producción agrícola de Higo en México (<http://www.siap.gob.mx>)

2.3 Métodos de propagación de la planta de higuera.

El árbol de higuera tiene la habilidad de poderse adaptar a distintos tipos de suelo, sin embargo tiende a presentar un mejor desarrollo y productividad en suelos fértiles y profundos como también en suelos aluviales bien drenados, cuando las raíces de la higuera

se desarrollaron hacia la profundidad del suelo y no sobre la superficie se presenta una mejor absorción de agua y nutrientes favoreciéndole en periodos de escasas de lluvia (Sintes, 1996).

2.3.1 Propagación tradicional de higuera.

La higuera se ha multiplicado tradicionalmente por medio de estacas y acodos, dando buenos resultados en países que son grandes productores (Flores, 1990). Teniendo ventaja como la producción de individuos genotípicamente iguales al progenitor, y bajo costo. Además, en la aplicación de estas técnicas se requiere que las plantas se encuentren en etapa vegetativa y solo produce una planta por estaca, en muchos de los casos, no cumple con las exigencias del mercado, limitando así la producción masiva de este cultivo (Rojas *et al.*, 2004). Una estaca de higuera adecuada debe de tener un tamaño de entre 30 y 40cm (Espinosa, 1996).

En Brasil, la propagación en el cultivo de la higuera es por el medio de estacas, método más utilizado en el país (Almeida y Silveira, 1997), estos segmentos desprendidos de la madre colocados en condiciones adecuadas generan raíces y producen una planta idéntica a la que le dio origen (Valio, 1986). Nogueira *et al.* (2006), utilizaron estacas de higuera de 25 cm y 15 mm de diámetro provenientes de árboles de aproximadamente 8 años de edad, y dándoles tres tratamientos que consistían en 0, 150 y 300 mg L⁻¹ de AIB, a las estacas que se les aplico estos tratamientos se les realizo un corte en la parte basal y se les dé una inmersión en 5cm de la estaca durante 24 horas seguido de una inmersión en Captan 2.5 %. Después de haber sido expuestas a los tratamientos fueron colocadas en bolsas de

polietileno color negra de dimensiones de 18 x 30 cm. Dando como mejor resultado para enraizar el tratamiento de 300 mg L⁻¹ de AIB, y llega a concluir que las estacas colocadas con hojas y sin hojas tienen gran diferencia al momento de enraizar esto cuando no se les coloca ningún estimulante. Dolgun y Ekmel (2008), implementaron un sistema con menor gasto monetario al sembrar plantas madre de higo de forma horizontal, con distancias de 70 x 60 cm buscando producir un mayor número de brotación, los brotes formados de lado de la tierra fueron separados con alambre galvanizado en forma de u siendo estos como tutores para estos brotes, las plantas que alcanzaban los 20 cm de altura eran cubiertas con tierra hasta 10 cm. Se logró un 77.5 % de plantas con características cualitativas y cuantitativas adecuadas para su venta. Concluyen que es un método económico para producir plantas de higuera bajo condiciones de vivero.

Otra de las técnicas más empleadas en la producción de higuera es el acodo aéreo, donde la planta obtenida es genéticamente igual a la utilizada para llevar a cabo este método de regeneración (Harrison, 1990).

2.4 Biotecnología.

2.4.1 Propagación *in vitro* de higuera.

Pero como cualquier frutal, es posible multiplicarlo con el método de cultivo *in vitro*. De manera que es aplicado para que las plantas producidas por este método no presenten infestación de virus. Además de que permite obtener plantas en cualquier época del año, masivamente y a corto tiempo dando así un impulso a la motivación de los productores en

nuestro país (Rojas *et al.*, 2004), teniendo como vías alternas la organogénesis, propagación por microestacas y el uso de biorreactores.

2.4.2 Cultivo *in vitro* en sistema tradicional ST.

El cultivo de tejidos es basado principalmente en la “totipotencia celular”, a lo cual refiere a la capacidad de una célula vegetal para dar lugar al desarrollo de una planta completa, dando a lugar a la regeneración rápida y masiva de plantas idénticas a la planta madre (clones) a partir de cualquier segmento aislado de la planta (Pierik, 1990).

El cultivo de tejidos ha sido utilizado por mucho tiempo para distintos fines, de los cuales se destacan los siguientes a) estudios básicos de fisiología, genética, bioquímica y ciencias a fines; b) bioconversión y conversión de compuestos útiles; c) incremento de la variabilidad genética; d) obtención de plantas libres de patógenos; e) propagación de plantas; f) conservación e intercambio de germoplasma (Mroginsky y Roca, 1991).

2.4.3 Asepsia en el cultivo *in vitro*.

La integración entre el explante y su medio, las condiciones físicas en que son incubados los cultivos acceden a un ambiente propicio para la regeneración tanto de hongos como de bacterias (microorganismos), los cuales pueden dañar severamente al explante donde se presente dicho microorganismo, ya que puede competir por el medio de cultivo, cambiarlo o hasta destruir el cultivo. Para lograr un cultivo libre de cualquier microorganismo es

necesario llevar a cabo las siguientes prácticas; a) trabajar en áreas adecuadas, b) esterilizar los medios de cultivo, c) desinfectar previamente los explantes a utilizar liberándolos de hongos y bacterias exógenos. Para llevar a cabo dicha actividad existen diversos compuestos químicos tal y como son el etanol al 70 % y de hipoclorito de sodio (NaOCl) del 1 % al 3 %, aclarando que es un producto de uso doméstico. También se puede utilizar el hipoclorito de calcio [$\text{Ca}(\text{OCl})_2$ 6 % a 12 %] y el cloruro de mercurio (HgCl_2 , 0.1 % a 1.5 %), aunque con menos frecuencia pues este último compuesto es altamente tóxico y es muy difícil de retirar del explante. También en algunos de los casos puede ser de utilidad emplear Tewwn-20, agente tensoactivo (Mroginsky y Roca, 1991).

Después del método de desinfección es necesario retirar todo tipo de residuo que pudiese presentar del componente que se empleó en el explante, esto se puede llevar a cabo mediante varios enjuagues con agua destilada estéril haciendo un mínimo de 3 enjuagues sucesivos (Mroginsky y Roca, 1991). Con este método de desinfección superficial se nos permite obtener explantes con un mínimo daño y lo más importante libres de cualquier microorganismo que nos pudiese afectar a la hora de llevar a cabo el establecimiento.

Flores y Jiménez (2007), llevaron a cabo la desinfección de estacas de *Ficus carica* L. con un lavado de agua y jabón comercial, sin embargo utilizaron fungicidas y bactericidas como 6 g L^{-1} Benlate, 6 g L^{-1} Agri-mycim y 3.5 g L^{-1} de Ferbán por un periodo de 75 min, donde posteriormente se realizaron 3 enjuagues con agua destilada estéril, enseguida se les colocó hipoclorito de sodio al 3.5 % durante 10 minutos dentro de la campana de flujo laminar y nuevamente se le realizó 3 enjuagues más. Mientras que Hepaksoy y Aksoy (2006), nos hacen mención de que al realizar la etapa de desinfección, su procedimiento fue el siguiente tomaron puntas de brotes de entre 3 y 4 cm de largo de árboles de 20 años de edad de Higo

y se evaluaron tres clones 37, 50 y 82. Las puntas fueron lavadas con agua corriente del grifo y mantenidas durante 20 minutos en 2% de hipoclorito de sodio con 1 o 2 gotas de Tween 20, después fueron enjuagadas con agua destilada estéril tres veces por 5 minutos.

2.4.4 Establecimiento *in vitro*.

Una parte fundamental para el establecimiento del cultivo con el que se está trabajando es el explante, su dominio en el medio de cultivo se ha confirmado (Villalobos *et al.*, 1984). Pues depende de la edad que tenga el explante que se desea utilizar (Bonga, 1982), habitualmente, la micropropagación tiende a ser respectivamente sencilla cuando se utilizan tejidos juveniles.

Otro punto importante, son los componentes del medio de cultivo que se utiliza, estos generalmente se han agrupado en cinco clases de compuestos: a) macro y microelementos, b) sacarosa, c) vitaminas, d) nitrógeno reducido y e) reguladores de crecimiento. La clave para que exista la regeneración del explante por medio de brotes es el uso de cinctina, pero el uso de auxinas en bajas concentraciones también ha presentado favorables resultados en algunas especies de árboles leñosos (Villalobos y Thorpe, 1991).

Existen también los factores físicos, siendo los más importantes los siguientes: a) la forma física del medio, b) humedad en el medio y su atmósfera gaseosa, c) la exposición a la luz, y d) la temperatura (Villalobos y Thorpe, 1991).

En la mayoría de los casos, se es necesario el trasplante a un medio modificado en cuanto al balance tanto hormonal como nutricional, para la formación de brotes adventicios. En otras

circunstancias, el trasplante a un segundo medio de cultivo, tiene como objetivo, el desarrollo de los tallos, en este caso el constante cambio de medio nos permite la regeneración de una gran cantidad de brotes.

En cuanto al recipiente que se utiliza para mantener los tejidos vegetales *in vitro*, es un factor importante, ya que su volumen puede ser determinante, tanto para el almacenamiento óptimo de los explantes, como también para definir la frecuencia en que se realizaran los subcultivos (Engelmann 1991; Keller *et al.*, 2006). Tal y como lo probó Cousins y Adelberg (2008), aumentando el tiempo de almacenamiento de seis semanas en recipientes de 180ml, a un periodo prolongado de hasta 23 semanas en recipientes de 2.5 l, logrando así la optimización del almacenamiento.

La reducción del explante se puede lograr tanto con el control adecuado de fitohormonas como también la disminución del oxígeno (Sánchez y Jiménez, 2010). Sin embargo usar este último método tiene como consecuencia conseguir explantes que presenten sobre hidratación, necróticos y su crecimiento sea más lento (Engelmann, 1991).

Sin embargo en el establecimiento es posible el uso de reguladores de crecimiento, llamado establecimiento con inducción rápida de brotes, tal y como lo realizó Ocampo y Núñez, (2007) en el cultivo de *Psidium guajaba* donde evaluaron diferentes medios de cultivo, MS (Murashige y Skoog, 1962), Mc (George, Puttock y George, 1982) y WPM (Woody Plant Medium, Lloyd and McCown, 1980), adicionados con 0,1 mg L⁻¹ de ácido indol acético (AIA) y 0,25 mg L⁻¹ de 6-benzil aminopurina (BAP), 15 % y 30 % de sacarosa. Los medios fueron ajustados a un pH de 5.8, se esterilizaron con autoclave durante 15 minutos a 15 libras de presión y 121 °C. Para la solidificación de los medios se utilizó gelrite al 2%, el medio de cultivo fue suministrado en 10 ml en cada recipiente donde se colocarían los

explantes. Al igual que hizo Kyung- Moon *et al.* (2007), que al momento del establecimiento utilizó un medio (MS), adicionado con sales basales, vitaminas y 1.0g L^{-1} de 6-bencilaminopurina (BAP), floroglucinol 0.5 mM, 3 mM de 2-(N-morfolino) ácido estanosulfónico (MES), 3 % de sacarosa y 0.7 % de Gellix[®]. Cada recipiente que se usó contenía 50 ml de este medio con cuatro brotes ubicados horizontalmente.

2.5 Multiplicación *in vitro*.

2.5.1 Características de los reguladores de crecimiento.

Las hormonas vegetales se caracterizan por ser pequeñas moléculas químicas capaces de afectar tanto el desarrollo como el crecimiento de las plantas en bajas concentraciones, estas hormonas son sintetizadas por las plantas. En etapa, cada planta se desarrolla y genera cierto número de brotes, los cuales son subcultivados y transferidos a un medio de cultivo fresco, dependerá de la especie que se trabaja el éxito del trabajo, pero siempre se usará el medio de cultivo utilizado para el establecimiento, sin embargo en esta etapa se es necesario el aumento en la concentración de los reguladores de crecimiento (citoquinina) (Hartmann y Kester, 1995).

El descubrimiento de las primeras hormonas de crecimiento, tiene mucho que ver con la observación común de las partes aéreas de las plantas, pues en su estudio se demuestra que se inclinan hacia una fuente unidireccional de luz. Esta desviación es a causa de un crecimiento desigual en los dos lados de la planta madre, dándonos a conocer que es más favorable el crecimiento del lado donde la planta recibe más luz a comparación de la parte

donde no hay luminosidad. Durante casi 50 años de estudio, varios científicos lograron establecer que la flexión se debe a una sustancia natural, llamada ácido indol acético (AIA), generado en la punta de la planta y que se difunde hacia la parte de abajo, provocando un desarrollo desigual en los dos lados. Por ser una sustancia difusible, se puede almacenar y, aplicar en los explantes, dando así una respuesta medible y creando así el primer bioensayo para crear una hormona vegetal. En los años 1950 y 1960, surgieron otras sustancias de origen natural, tales y como son las giberelinas (GAs), citoquininas (CQs), ácido abscísico (ABA) y etileno, mostrando que su uso influye y presenta muchas respuestas en las plantas, estas se encuentran entre las principales hormonas vegetales de uso común (Srivastava, 2002).

2.5.2 Uso de las fitohormonas en el cultivo *in vitro*.

Las fitohormonas pueden tener un distinto fin, ya que pueden promover o inhibir algunos desarrollos en las plantas a las que se les administran. Es por esto que se han clasificado en estas dos acciones, donde dentro de las que promueven el desarrollo son cuatro grupos destacando las auxinas, citocininas, giberelinas y etileno (Rost y Elliot, 1979). Las auxinas como tal promueven la división celular en el cultivo de tejidos. También son caracterizadas por ser “naturales” dentro de las que se encuentran AIA, indol-3-acetonitrilo, etilindol-3-acetato, indol-3-carboxialdehído, indol-3-acetaldehído, indol-3-acetamida, ácido indol-3-carboxílico, ácido indol-3-propiónico, y otros; de todo este grupo la más usada es AIA (Scout, 1984). De igual manera existe un grupo de auxinas sintéticas provocando un efecto fisiológico similar al ya mencionado, en ellas se encuentran las siguientes: el 2,4-D, ANA y

ABI; el uso de cada una de estas es denominado como un arte, pues no existe aún una concentración específica de auxina que su uso es un arte ya que no es posible establecer una concentración particular de auxina que actué de manera satisfactoria en todos los cultivos (Roca, 1993).

Las giberelinas tienen una procedencia del hongo *Gibberella fujikuroi*, estas intervienen en el desarrollo celular, en la elongación de los entrenudos y el crecimiento de los meristemas o yemas del explante *in vitro*; una función más que presentan es que también pueden romper la dormición de embriones aislados o yemas (Pierik, 1990).

Skoog propuso el término cinina como genérico en el año de 1955, para toda aquella sustancia que tuviera el mismo fin de actividad biológica, así fuesen naturales o sintéticos. Pues el principal papel de las citoquininas es promover la división celular o citosinesis, la inducción de yemas adventicias en callos y la proliferación de brotes axilares por la ruptura de la dominancia apical (Murashige y Skoog, 1962). La mayor parte de las citoquininas son derivados de la adenina, ya sean naturales o sintéticas (Hurtado y Merino, 1988). Las citoquinas que tienen un uso más frecuente son la KIN, BAP (bencil amino purina), kinetina, 2-ip (isopentenil-adenina) y zeatina (extraída del endospermo del maíz) (Gamborg *et al.*, 1968). Algunas citoquininas como la KIN no presentan alguna actividad si no es en presencia y conjunción con una auxina.

Y en el grupo que tiene la acción de inhibir se encuentran las el ácido abscísico (ABA), los inhibidores, morfotinas y retardantes del crecimiento (Rost y Elliot, 1979). Pero cabe mencionar que el (ABA) tiene otras funciones, en algunos casos interviene en la maduración de embriones y en los cultivos de células en suspensión provee la sincronización de la división celular (Pierik, 1990).

En el cultivo de higuera ha demostrado tener tanto auxinas como giberelinas, en altas concentraciones Bradley y Crane (1969). En general, las concentraciones de auxina fueron mayores en la primera cosecha de fruto, y las concentraciones de giberelinas mayor en el segundo. Las altas concentraciones de giberelinas coincidieron con los bajos de auxinas y viceversa.

Kumar *et al.* (1998), nos comentan el uso de algunas fitohormonas en el cultivo de tejidos de higuera, empleando en un medio (MS) (1962) suplementado con 2.0 mg L⁻¹ BAP y 0.2 mg L⁻¹ ANA. Los brotes regenerados *in vitro* se multiplicaron aún más en esas condiciones y la tasa de multiplicación promedio fue de cuatro por subcultivo y se estableció en un 90 %.

Existen hormonas de crecimiento que tienden a sustituir tanto la actividad de la citoquinina como la actividad de la auxina (Mok *et al.*, 1982; Visser *et al.*, 1992; Huetteman y Preece 1993; Murthy *et al.*, 1998), también se ha comprobado que en muchos cultivos el uso de este regulador de crecimiento es eficaz para la estimulación y regeneración de brotes (Yakushiji *et al.*, 2003; Gu y Zhang 2005; Du *et al.*, 2006; Debnath *et al.*; 2006), tal y como lo menciona Wang *et al.* (2008), al demostrar que el uso de TDZ en el cultivo de *Boehmeria nivea* (L.) Gaud, fue más eficaz al momento de compararlo con BAP, KT y ZT bajo las mismas condiciones. Olivera *et al.* (2000) al utilizar TDZ comprueba que con el uso de esta fitohormona es posible obtener brotación anticipada, en comparación con la aplicación de la ciatina y BA, ya que con el TDZ se logró obtener brotes en un periodo de 8 días transcurridos desde el cultivo en *Gerbera jamesonii* H. Bolus.

2.5.3 Reguladores de crecimiento de nueva generación.

Existen hormonas promotoras de crecimiento denominadas de “nueva generación” tal y como es el 1-TRIACONTANOL (TRIA). El 1-Triacontanol es un alcohol saturado de cadena larga ($C_{30} H_{62} O$) que se sabe tiende a presentar una actividad promotora de crecimiento cuando se suministra exógenamente en la planta además de una alta tasa de asimilación fotosintética de CO_2 (Houtz *et al.*, 1985). Es un componente natural que crece en la parte epicuticular de las plantas. Investigaciones recientes en distintas variedades de plantas han aportado pruebas convincentes sobre el uso de esta fitohormona (Borowski *et al.*, 2000, Kumaravelu *et al.*, 2000). La aplicación exógena de TRIA en combinación con Ca^{+2}/Mg^{+2} genera una rápida estimulación en las raíces (Lesniak *et al.*, 1986). Se ha utilizado también para la inducción de embriogénesis somática en *Coffea Arabica* L. donde el uso de TRIA provocó el aumento de la media de embriones por explante y el alza de explantes productores de embriones (Gatica *et al.*, 2008). También se han mostrado buenos resultados en *Bupleurum fruticosum*, con la aplicación del TRIA (Fraternali *et al.*, 2002).

2.6 Uso de biorreactores.

En los últimos años se ha tratado de mejorar el sistema de cultivo de tejidos, principalmente en el costo-beneficio, se ha realizado el uso del medio líquido, sin embargo el contacto constante del explante con el medio puede producir vitrificación en estos, para lograr reducir o eliminar de forma permanente este problema, se proponen sistemas donde el explante está en un contacto intermitente con el medio, este sistema produce una renovación continua de la atmosfera evitando así la acumulación de gases tóxicos como por

ejemplo el etileno (Giménez y Colmenares, 2004); Con este fin se han logrado diseñar distintos sistemas semi-automatizados también conocidos como biorreactores, los cuales han tenido un éxito usual quienes lo han aplicado en distintos cultivos. Este tipo de sistema provee una mejor asimilación de nutrientes a los explantes ya que se está en contacto total con el medio líquido. En los últimos años se ha dado a conocer el uso de un nuevo tipo de biorreactor denominado RITA[®] (récipient á inmersión temporaire automatique), su funcionamiento es sumergir el cultivo vegetal por cortos periodos de tiempo (Etienne y Berthouly, 2002). Este sistema ha proporcionado resultados importantes tanto en producción como en calidad de las vitroplantulas que se llegan a obtener, así lo ha sido en cultivares como café, rábano, banano, palma de aceite, cítricos, entre otros. Sin embargo es de gran importancia administrar los tiempos de inmersión que se les den a los explantes, pues de esto depende su desarrollo y el evitar la hiperhidricidad (Berthouly y Etienne, 2005). Resultados que sin duda han logrado una reducción en los costos de producción y coeficientes de multiplicación altos. Teisson *et al.* (1993), indican que los explantes obtenidos a base de este sistema tienden a presentar un alto porcentaje de enraizamiento y sobrevivencia en la etapa de aclimatización.

Quiala *et al.* (2012), mencionan la comparación de ambos sistemas de cultivo de tejidos, utilizando la misma concentración de BA para estos dos sistemas, los resultados fueron los siguientes; en el sistema de inmersión temporal logro una media de 7.7 en brotación, mientras que en el sistema tradicional semisólido los resultados arrojaron una media de 3.6 brotes, comprobando de esta manera que el SIT es un sistema eficaz en cuanto a la regeneración de brotes en *Tectona grandis* L. Este sistema ha sido probado en distintos cultivos, tal es el caso donde Vilchez *et al.* (2007), demuestran una vez más que el uso del

SIT es más eficiente ante el sistema tradicional semisólido, esto en zabila, donde obtuvieron mejores resultados tanto en multiplicación como en longitud del explante. Otro ensayo con este tipo de sistema fue realizado por Castro y González (2002), al multiplicar *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden y proponer una cantidad de nueve explantes como número óptimo para el desarrollo de estos, permitiendo lograr así un coeficiente de multiplicación de 11.5 brotes y la mejor calidad de estos. Dando como resultado cinco brotes nuevos por vitroplantula que se colocó.

2.7 Propagación *in vitro* por microestacas

Ya que la producción de plantas producidas *in vitro* ha generado sin duda grandes beneficios a quien busca la conservación de especie, producción masiva de plantas madre, la generación de plantas en un menor o corto tiempo entre otros puntos importantes que presenta esta técnica.

Berthouly (1995), al buscar nuevas alternativas para mejorar resultados y beneficios para la micropropagación de café, usan como explantes de partida microestacas, con el uso del sistema de inmersión temporal RITA[®]. Estas microestacas que utilizan para su propagación tienen como característica un tamaño medio de entre 3 a 4 cm de largo presentando de una a dos hojas. Colocando 10 explantes por unidad de cultivo denominados RITA[®]. Los resultados que obtuvieron en esta investigación fueron realmente buenos pues disminuyeron el tiempo de la tasa de multiplicación a comparación del sistema tradicional, ya que la misma tasa de multiplicación que se obtiene en un periodo de 3 meses en el sistema tradicional en este sistema se reduce a tan solo 6 semanas, logrando

así llevarlas a la etapa de subcultivo en condiciones de invernadero directamente en tan solo dos meses, con plantas que tenían 4 pares de hojas y entrenudos elongados tamaño ideal para lograr esta fase de la investigación.

2.7.1 Aclimatización.

El proceso de aclimatización de las plántulas que se obtienen con el sistema de cultivo *in vitro* tiende a ser muy complicado, sobretodo en este tipo de especies consideradas leñosas Martínez *et al.* (2005), realizaron un ensayo con la variedad de *Eucalyptus Urophylla S. T. Blake Eucalyptus Grandis Hill Ex Maiden*, donde tomo como plantas ideales para la fase de aclimatización explantes que van de 3 a 7 cm de longitud con por lo menos 3 raíces, fueron colocadas en bolsas que contenían suelo arcilloso arenoso como sustrato, teniendo un 70 % de sombra en el vivero donde fueron colocadas, dándoles aspersión durante 15 días y fertilización a los 25 días de que se inició la etapa de aclimatización y aspersiones con oxiclورو de cobre cada 7 días. Con este proceso lograron obtener plantas de aproximadamente 20 cm de altura en un tiempo de dos meses las cuales fueron consideradas para ser trasplantadas a campo, con la variedad de *E. urophylla* se obtuvo un 85 % de aclimatización y *E. grandis* 75 %.

Fráguas *et al.* (2012), indican que la falta de información sobre el cultivo de *Ficus carica* es una gran limitante tanto para su establecimiento como para su aclimatización. El objetivo de su trabajo fue la evaluación de distintos tiempos en el medio de cultivo y el sustrato donde se tenían las plantas. Las plantas provenientes de *in vitro* estuvieron en un medio de cultivo Wood Plant Medium (WPM), y las evaluaciones en la etapa de aclimatización

fueron en 0, 15, 30, 45 y 60 días. Las plantas con mejor característica para ser llevadas a etapa de aclimatización son las obtenidas después de estar durante 30 días en el medio de cultivo (WPM), llega a la conclusión que las plantas *in vitro* tienen diferencia estomática a comparación de las plantas que son generadas en viveros.

3. OBJETIVOS.

3.1 Objetivo general.

Diseñar un protocolo eficiente para el establecimiento y multiplicación *in vitro* del cv. Netzahualcóyotl de higo, seleccionado en el estado de México por su alta productividad y calidad, utilizando diferentes reguladores del crecimiento bajo un sistema de inmersión temporal.

3.2 Objetivos específicos.

- 1.- Evaluar el uso de diferentes reguladores de crecimiento en la multiplicación masiva y enraizamiento de higo generados *in vitro* bajo tres sistemas de micropropagación (ST, SIT y por microestacas).
- 2.- Evaluar la tasa de multiplicación *in vitro* de brotes axilares entre los sistemas semisólidos con agar (ST) y el sistema de inmersión temporal (SIT).

4. HIPOTESIS.

La capacidad morfogénica *in vitro* del higo (*Ficus crica L.*) será más eficiente y productiva en un sistema de micropropagación por inmersión temporal (SIT) que en los sistemas semisólidos (SS).

5. MATERIALES Y MÉTODOS.

5.1 Área de trabajo.

Laboratorio de cultivo *in vitro* y área de invernaderos, Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, Estado de México durante 2011 al 2013.

5.2 Desinfestación de los explantes a utilizar.

Se utilizó como material de partida 100 ápices de árboles adultos de higuera cultivar Netzahualcóyotl de aproximadamente 10 años de edad, con alrededor de 1 cm, provenientes de invernadero, de la Universidad Autónoma Chapingo. La etapa de desinfestación consistió en retirar las hojas más grandes de los ápices y posteriormente lavarlos con jabón comercial y agua corriente durante 10 min, de esta manera se facilitó la limpieza de los ápices retirando el polvo u otro material ajeno al necesario. Posteriormente, fueron tratados con 2 g L⁻¹ de fungicidas y bactericidas comerciales (Captan[®], Promyl[®] y Agry-gent plus 806[®]) en agitación (250 rpm) durante 15 min. Se evaluaron diferentes tiempos de Hipoclorito de calcio comercial (20 %) y etanol (OH al 70 %), según (Hepaksoy y Aksoy, 2006) y (Kumar *et al.*, 1992); Cuadro 3. Por último los explantes fueron enjuagados durante 5 min, tres veces con agua destilada estéril en la campana de flujo laminar (Cura *et al.*, 2004) retirándoles las partes vegetativas dañadas por la desinfestación, de esta manera se

obtuvo la parte adecuada quedando en un tamaño aproximado de 0.5 cm (Salazar *et al.*, 2009).

Cuadro 3 . Tratamientos de Etanol y Cloro comercial par desinfestación de ápices de higuera.

Tratamientos para la desinfestación de ápices de higuera cultivar Netzahualcóyotl.

T1 Etanol (OH) 70 % durante 30 seg. + Cloro comercial (Cl) 20 % durante 30 min.

T2 Etanol (OH) 70 % durante 1 min + Cloro comercial (Cl) 20 % durante 30 min.

T3 Etanol (OH) 70 % durante 30 seg + Cloro comercial (Cl) 20 % durante 20 min.

T4 Etanol (OH) 70 % durante 1 min + Cloro comercial (Cl) 20 % durante 20 min.

5.3 Establecimiento *in vitro* en el ST.

Para el establecimiento *in vitro* se introdujo un ápice por tubo de ensaye de una dimensión de 15 x 100 mm que tuvieron 10 mL de medio MS (Murashige y Skoog 1962) modificado con la sustitución del Cloruro de calcio por el Nitrato de calcio y se eliminó el Ioduro de potasio (Cuadro 4). El medio fue solidificado con 6 g L⁻¹ de agar y complementado con 30 g L⁻¹ de sacarosa y 1 g L⁻¹ de carbón activado, para disminuir la oxidación del explante. El pH se ajustó antes de la esterilización con autoclave a 5.7. Todos los explantes fueron colocados de manera vertical sobre el medio de cultivo en una cámara de incubación a 25 ± 2 °C con 16 horas luz y 8 de obscuridad y una intensidad luminosa de 47.3 μmol·m⁻²·s⁻¹. Colocando un total de 25 explantes por tratamiento y por repetición.

Cuadro 4. Medio de cultivo utilizado para la micropropagación de higuera.

Medio MS	
Macronutrientes	mM
Nitrato de Amonio	20
Nitrato de Potasio	18.8
Nitrato de Calcio	30
Sulfato de Magnesio	15
Fosfato de Potasio	12
Micronutrientes	μM
H ₃ BO ₃	100
MnSO ₄ 4H ₂ O	100
ZnSO ₄ 7H ₂ O	30
Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ O	1
CuSO ₄ 5H ₂ O	0.1
CoCl ₂ 6H ₂ O	0.1
Quelatos	μM
FeSO ₄ 7H ₂ O	2.72
EDTA	1
Vitaminas	mg L⁻¹
Inositol	100
Acido nicotínico	0.5
Piridoxina HCl	0.5
Tiamina HCl	0.1
Ácido ascórbico	100
Agar	6 g L ⁻¹
Azúcar	30 g L ⁻¹
Carbón Activado	1 g L ⁻¹

5.4 Multiplicación *in vitro* en el ST.

Durante la etapa de multiplicación, que inició después de 30 días de su establecimiento se evaluaron los siguientes tratamientos: T1 0.2 mg L⁻¹ de Benciladenina (BA) + 0.02 mg L⁻¹ de Ácido Naftalen Acético (ANA) y T2 0.5 mg L⁻¹ de BA + 0.05 mg L⁻¹ de ANA. Estos tratamientos fueron evaluados cada treinta días durante cuatro subcultivos. Para el subcultivo cinco se incorporó un tercer tratamiento con 0.1 mg L⁻¹ de Thidiazuron (TDZ) + 0.01 mg L⁻¹ de ANA. Con la finalidad de conocer a qué tipo de hormonas de crecimiento responde de mejor manera el cultivar de higuera Netzahualcóyotl. Para la implementación de este tercer tratamiento se utilizó material vegetal proveniente de los dos primeros tratamientos, también se decidió cambiar el uso de tubos de ensaye por frascos de vidrio de 100 mL con 20 mL de medio, ya que el explante tiende a producir hojas de gran tamaño afectando su desarrollo dentro de los tubos de ensaye, de igual manera se probó la posición de los explantes en forma horizontal eliminando los ápices, buscando un mejor aprovechamiento e interacción entre el tejido y el medio de cultivo dentro de los frascos.

5.5 Comparación entre 1-Triacontanol (TRIA), ANA y BA.

El experimento se realizó con la finalidad de visualizar el comportamiento de las plantas a la exposición del TRIA (Sigma[®] catalogo N° T3777) denominado como regulador de nueva generación. Los efectos se compararon con los reguladores comunes, utilizando un medio de cultivo igual a la etapa de multiplicación. El 1-triacontanol se usó en distintas concentraciones 0, 2, 5, 10 µg L⁻¹ junto con 0.1 mg L⁻¹ de BA + 0.01 mg L⁻¹ de ANA, los

tratamientos fueron comparados con la mejor relación y concentración de la multiplicación (0.5 mg L⁻¹ de BA + 0.05 mg L⁻¹ de ANA) que fungió como testigo (Cuadro 5). Los tejidos fueron colocados en frascos de vidrio de 100 mL con 20 mL de medio en posición horizontal, eliminando el ápice y las hojas. Todos los tejidos fueron colocados en una cámara de incubación a 25 ± 2 °C con 16 horas luz y 8 de oscuridad y una intensidad luminosa de 47.3 μmol·m⁻²·s⁻¹.

Cuadro 5. Tratamientos de 1-Triacontanol contra ANA y BA.

Tratamientos
TRIA 2 μg L ⁻¹ + BA 0.1 mg L ⁻¹ + ANA 0.01 mg L ⁻¹
TRIA 5 μg L ⁻¹ + BA 0.1 mg L ⁻¹ + ANA 0.01 mg L ⁻¹
TRIA 10 μg L ⁻¹ + BA 0.1 mg L ⁻¹ + ANA 0.01 mg L ⁻¹
BA 0.5 mg L ⁻¹ + ANA 0.05 mg L ⁻¹

5.6 Multiplicación en Sistema de inmersión temporal (RITA[®])

5.6.1 Material vegetal

Una vez definido el protocolo de multiplicación en agar se procedió a implementar su uso en el sistema de inmersión temporal (SIT). Se usaron porciones de tallo (nudos con 1 o 2 yemas) que fueron multiplicados en sistema semisólido de aproximadamente 1 cm de longitud. Para este procedimiento de multiplicación fue necesario retirar por completo las

hojas y el ápice, para romper la dominancia apical y que se lograra obtener mayor brotación.

5.6.2 Multiplicación en el SIT.

Para la prueba de este sistema, se colocaron 10 explantes por biorreactor tipo RITA[®] de 1 L de capacidad previamente esterilizados en autoclave durante 20 minutos a 1.5 lb pulgada² con 150 ml de medio líquido. Se usó el medio MS con las mismas características que el medio de cultivo utilizado en el sistema tradicional (ST) sin agar ni carbón activado. Se evaluaron los siguientes tratamientos: BA 0.5 g L⁻¹ + ANA 0.05 g L⁻¹ y TRIA 10 µg L⁻¹ + BA 0.1 g L⁻¹ + ANA 0.01 g L⁻¹. Las condiciones de incubación en la cámara fueron de 25 ± 2 °C, con 16 horas luz y 8 de oscuridad y una intensidad luminosa de 47.3 µmol·m⁻²·s⁻¹. Se probaron 3 intervalos de inmersión de 1 min cada 4, 6 y 12 horas, destinándose dos RITA[®] por tratamiento. La evaluación de los explantes fue realizado 30 días después de establecidos los experimentos.

5.7 Enraizamiento de microestacas en condiciones asépticas *in vitro*.

Se planteó una alternativa más para generar plantas de higuera intensivamente. Con este sistema se pretendió generar un mayor número de plantas en el menor tiempo posible con uniformidad y libres de enfermedades. Se utilizaron porciones de tallo con uno o dos nudos

de árboles adultos de higuera provenientes de invernadero ubicado en las instalaciones de la Universidad Autónoma Chapingo.

5.7.1 Desinfestación de microestacas.

Las microestacas fueron tratadas con jabón comercial y agua corriente, durante 10 min, posteriormente, una vez ya limpias fueron sometidas a 2 g L⁻¹ de fungicidas (Captan[®] y Promyl[®]) y bactericidas comerciales (Agry-gent plus 806[®]), los explantes fueron expuestos a estos productos durante 15 min a 250 rpm, posteriormente se les aplicó el tratamiento de desinfestación obtenido en el sistema semisólido de etanol (OH) al 70 % durante 30 segundos y cloro comercial (Cl) al 20 % durante 20 min.

5.7.2 Material usado para la siembra de microestacas.

En el primer experimento se usaron charolas marca SIGMA[®] completamente estériles provenientes de fábrica, con peat moss y agrolita 2:1 v/v. La mezcla se esterilizó durante una hora un día antes de ser utilizado en la siembra de los explantes.

En el segundo, tercer y cuarto experimento se utilizaron tubetes de 11.5 cm de alto por 6 cm de ancho que fueron previamente desinfestados con cloro y se utilizó como sustrato arena de río con agrolita 2:1 v/v, que fue previamente esterilizado por lo menos 1 hora antes de ser utilizado. Los tubetes fueron cubiertos con bolsas de polipapel, que fungieron como domos y tela rafe en la base de este para evitar la pérdida del sustrato.

5.7.3 Etapa de establecimiento y enraizamiento de microestacas.

El uso de microestacas en el experimento donde se usaron charolas SIGMA[®], presentaban por lo menos una yema axilar y estuvieron sujetas a los siguientes tratamientos de AIB; 10 $\mu\text{g L}^{-1}$, 20 $\mu\text{g L}^{-1}$, 30 $\mu\text{g L}^{-1}$, 40 $\mu\text{g L}^{-1}$ y 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ y el testigo sin hormonas. Después de la aplicación de los tratamientos, las charolas fueron colocadas en la cámara de incubación que presenta las siguientes condiciones 25 ± 2 °C, con 16 horas luz en donde duraron un periodo de 30 días consecutivos, monitoreadas constantemente durante su estancia en la cámara de incubación.

Las microestacas que fueron empleadas en los siguientes experimentos tuvieron por lo menos una yema axilar y fueron preparadas igual que las anteriores. Los tratamientos que se probaron fueron cuatro concentraciones 250, 500, 750 y 1000 ppm formuladas a partir del enraizador comercial Radix 10000[®] más un testigo. El modo de riego para este sistema fue por medio de capilaridad con agua destilada agregando 2 g L⁻¹ de Captan[®] para así mantenerlas libres de algún contaminante que les pudiera afectar, este proceso se llevó a cabo en el interior de la cámara de incubación, donde nuestras estacas estuvieron por un periodo de 30 días.

5.8 Variables estudiadas.

En la etapa de desinfestación se evaluó el porcentaje de ápices libres de hongos y bacterias generados por los tratamientos compuestos por etanol e hipoclorito de calcio comercial. Una vez conseguido el establecimiento del cultivar de higuera Netzahualcóyotl se evaluaron el número de brotes, hojas y el tamaño por explante, variables que se estudiaron en el sistema semisólido con hormonas de crecimiento de uso común y con 1-triacontanol, así como también en el sistema de inmersión temporal. Por otro lado las variables estudiadas en los experimentos con microestacas fueron el porcentaje de sobrevivencia, enraizamiento, raíz con mayor longitud y número de raíces por microestaca.

5.9 Análisis Estadístico.

5.9.1 Propagación en el ST y SIT.

Se condujeron cuatro experimentos por separado. Para la etapa de establecimiento se utilizó un diseño completamente al azar con cuatro tratamientos los cuales constaron de 25 repeticiones. La unidad experimental consto de un explante. Repitiéndose dos veces en el tiempo. En el uso de hormonas convencionales también fue usado un diseño completamente al azar que consto de seis repeticiones por tratamiento, la unidad experimental consto de cuatro explantes por frasco de vidrio de 100 mL con 20 mL de medio y se repitió 11 veces mediante subcultivos sucesivos. Los experimentos llevados a cabo para evaluar el regulador de crecimiento 1-triacontanol (TRIA), se utilizó un diseño

completamente al azar con ocho repeticiones por tratamiento y la unidad experimental constó de cuatro explantes por frasco de vidrio de 100 mL con 20 mL de medio y se repitió seis veces en el tiempo. Por otro lado, los experimentos llevados a cabo para evaluar el sistema de inmersión temporal SIT, se utilizó un diseño completamente al azar con dos repeticiones por tratamiento. La unidad experimental constó de un biorreactor tipo RITA[®] con 10 explantes cada uno y los experimentos fueron repetidos durante tres veces mediante subcultivos sucesivos. Los resultados fueron analizados por medio del ANOVA y cuando hubo diferencias significativas se utilizó la separación de medias con la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$), utilizando el paquete The SAS System for Windows 9.0.

5.9.2 Propagación por microestacas.

En el experimento con AIB líquido se produjeron 6 tratamientos con una repetición cada uno. La unidad experimental consto de 20 explantes por tratamiento, el experimento se realizó una vez en el tiempo para el análisis de las variables estudiadas utilizó un ANOVA con una prueba de medias de Tukey con un nivel de significancia de $\alpha = 0.05$. Por otro lado en el experimento para evaluar el uso de Radix 10000[®] se realizaron 5 tratamientos con 3 repeticiones cada uno. La unidad experimental consto de 20 explantes por tratamiento, el experimento se realizó durante tres veces en el tiempo. En el análisis de las variables se utilizó un ANOVA con una prueba de medias de Tukey con un nivel de significancia de $\alpha = 0.05$ utilizando el paquete The SAS System for Windows 9.0.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Etapa de desinfestación.

Durante la etapa de desinfestación de los ápices de *Ficus carica* L. utilizados para el establecimiento del cultivo *in vitro*. Se observó una diferencia significativa ($p \leq 0.05$) entre los tratamientos evaluados. El mejor resultado lo mostro etanol al 70 % durante 30 seg y una inmersión de 20 min en la solución de cloro comercial al 20 %, registrando un 90 % de explantes establecidos (Cuadro 6), estos resultados fueron consistentes durante las dos ocasiones en que se repitió el experimento. Mientras que con los tres tratamientos restantes se observó una mayor incidencia de contaminación y oxidación.

Flores *et al.* (2009), Mencionan que la etapa de desinfestación en el cultivo *in vitro* es la etapa más complicada en la higuera, ya que se presenta contaminación de hongos como por bacterias, estos autores utilizaron una serie de tratamientos para la desinfestación de mini estacas de 3 cm de longitud, 6 g L⁻¹ de benomilo[®], 6 g L⁻¹ de sulfato de gentamicina y de clorhidrato de oxitetraciclina y 3.5 g L⁻¹ de dimetil tiocarbamato por un período de 90 minutos. Posteriormente se llevó a cabo una segunda desinfección con hipoclorito de sodio al 4 % durante 10 min dentro de la campana de flujo laminar y en seguida tres enjuagues con agua destilada estéril, con este método de desinfestación lograron un porcentaje de explantes limpios libres de agentes patógenos del 32 %. Mientras que Flores y Jiménez (2007), llevaron a cabo la desinfestación de estacas provenientes de invernadero de 8 cm de longitud de *Ficus carica* L. con un lavado de agua y jabón comercial y posteriormente el uso de fungicidas y bactericidas en cantidades que van de 6 g L⁻¹ Benlate, 6 g L⁻¹ Agri-

mycim y 3.5 gL^{-1} de Ferbán por un periodo de 75 min, consecutivamente se realizaron 3 enjuagues con agua destilada estéril, en seguida se colocaron en una solución de hipoclorito de sodio al 3.5 % durante 10 minutos dentro de la campana de flujo laminar y nuevamente se les realizo 3 enjuagues más. Los resultados obtenidos por estos autores no concuerdan con los nuestros ya que tuvieron un 20 % de contaminación fungosa y 100 % de contaminación bacteriana.



Figura 1. Explante de higuera en desarrollo y libre de agentes contaminantes.

Cuadro 6. Porcentaje de ápices libres de agentes fúngicos y bacterianos con 4 distintos tiempos de etanol al 70 % y cloro comercial al 20 %.

Tratamiento	Porcentaje de establecimiento.	Medias
OH 30 seg, Cl 20 min	90 ± 3.15	a ^z
OH 1min, Cl 20 min	81 ± 21.03	b
OH 1 min, Cl 30 min	75 ± 28.31	b
OH 30 seg, Cl 30 min	60 ± 35.41	c

Las variables expresadas en porcentajes, para su análisis fueron previamente transformados con la función $\arcsen X^{1/2}$. Porcentajes de 50 explantes por tratamiento durante dos repeticiones. ^z Medias con letras distintas entre columnas son significativamente diferentes (Tukey, $p \leq 0.05$).

6.2 Capacidad de brotación de los explantes durante los primeros subcultivos.

En el primer subcultivo no existieron diferencias significativas ($p \leq 0.05$) en relación al número de brotes entre tratamientos, sin embargo, se observó en promedio 2 brotes por explante, pero si se presentó una diferencia significativa ($p \leq 0.05$) (Cuadro 7) en el número de hojas teniendo hasta 3 hojas por explante con BA 0.5 mg L^{-1} + ANA 0.05 mg L^{-1} , en cuanto al tamaño alcanzado también existió diferencia significativa ($p \leq 0.05$) entre tratamientos logrando una elongación promedio de 2 cm con BA 0.2 mg L^{-1} + ANA 0.02 mg L^{-1} . Flores *et al.* (2009), al reducir sus estacas a 3 cm de tamaño de *Ficus carica* L. y haberles eliminado el tejido dañado durante el proceso de desinfestación, obtuvieron un 25 % de brotación con 3 brotes por tejido vegetal en la etapa de establecimiento al haber utilizado un medio MS a la mitad de sales minerales con 30 g L^{-1} , 1 mg L de BA adicionándole 300 mg L^{-1} de ácido ascórbico, 175 mg L^{-1} de ciprofloxacina y 3.5 g L^{-1} phytigel con 5.7 de pH.

Cuadro 7. Número total de brotes, hojas y tamaño alcanzado durante el primer subcultivo de ápices de higuera cultivar Netzahualcóyotl, establecidos en un medio ms modificado con dos relaciones de BA y ANA.

Tratamiento	Brotes	Hojas	Tamaño
BA 0.2 mg L^{-1} + ANA 0.02 mg L^{-1}	1.75 ± 0.96 a	1.33 ± 0.88 b	1.29 ± 0.62 a
BA 0.5 mg L^{-1} + ANA 0.05 mg L^{-1}	1.75 ± 1.05 a	3.16 ± 2.85 a	0.75 ± 0.39 b

Medias de 24 unidades de explantes de higuera en relación a brotes hojas y tamaño. Medias con letras distintas entre columnas son significativamente diferentes (Tukey, $p \leq 0.05$).

6.3 Periodo de estabilización de los cultivos.

Al principio de todo cultivo los tejidos suelen exhibir respuestas de crecimiento impredecible en las especies perennes tanto herbáceas como leñosas. La estabilidad en la etapa de multiplicación y desarrollo del tejido vegetal suele ocurrir después de múltiples subcultivos (Trigiano y Gray, 2000). Durante el periodo de los primeros subcultivos independientemente del tratamiento, se observó una fluctuación en el índice de multiplicación que presentó el cultivar de higuera entre un subcultivo y otro, sobre todo entre el 4 y 5. En la Figura 2 se observa que se logró conseguir la estabilización del cultivo hasta el séptimo subcultivo, donde a partir de este se mantuvo el número de brotes entre 30-50 según el tratamiento. Ese tiempo lo han descrito algunos autores como Hartmann *et al.*, (1990), donde mencionan que por lo general lleva de 5 a 6 meses en que se logre la estabilidad y esto depende de la especie. Comportamiento que también depende del estado juvenil del cultivo. La etapa de estabilidad de los cultivos se define como el periodo en el cual los tejidos estandarizan la emisión de brotes después de un cierto número de subcultivos sucesivos y en general los tejidos juveniles se estabilizan en un tiempo mucho más corto que los tejidos de origen adulto, en donde es necesario un régimen de subcultivos sucesivos durante un periodo de tiempo variable. Corredoira *et al.*, (2011), observaron que el periodo de estabilidad de los cultivos de *Alnus glutinosa* L. establecidos a partir de estaquillas de 2 a 4 cm de longitud de 20 y 25 años de edad, fue mayor (12 meses) en el material de partida que era ontogénicamente más viejo, mientras que este disminuyo a 5 meses con el clon G1 que fue el material más juvenil.

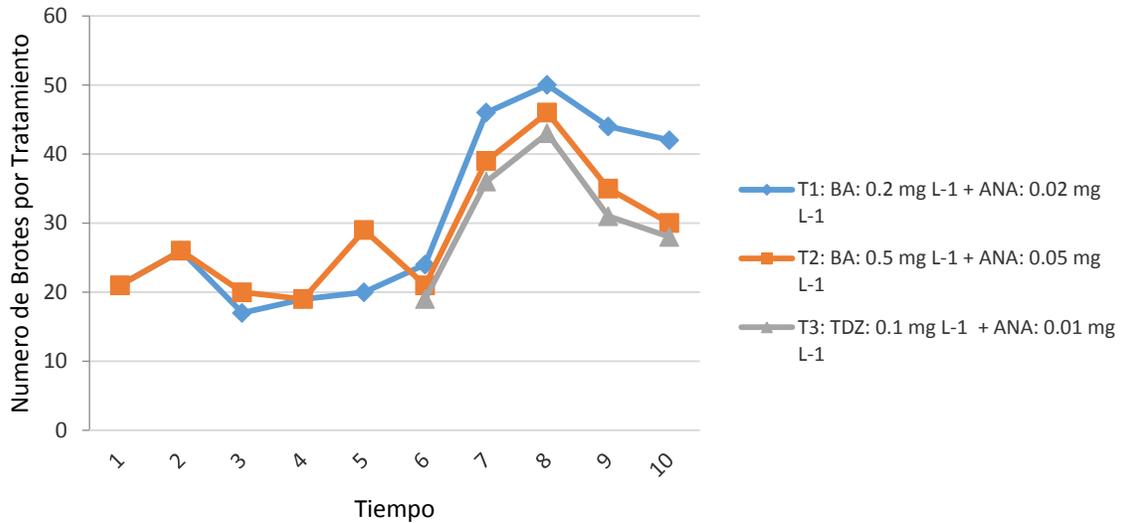


Figura 2. Etapa de estabilización de *Ficus carica* L. cultivar Netzahualcóyotl bajo tres distintos tratamientos de ANA, BA y TDZ en el sistema tradicional de cultivo in vitro.

6.3.1 Efecto de los reguladores de crecimiento ANA, BA y TDZ

Durante la evaluación realizada en el sistema tradicional semisólido, se pudo observar que la brotación obtenida con cada uno de los tratamientos formulados arrojó resultados exitosos (Figura 3 a), debido al método de cultivo que se utilizó entre cada subcultivo al colocar los explantes de manera horizontal y seccionar los ápices de cada una de las plantas, pues esto contribuye a eliminar la dominancia apical, evitando de esta manera que la mayoría de los nutrientes se dirija hacia esta parte pues es la más demandante, con este método los nutrientes pueden distribuirse por toda la planta y las yemas laterales aprovechan los reguladores de crecimiento para su brotación y desarrollo, teniendo asimismo una mayor cantidad de brotes laterales, El tratamiento que presentó la mayor tasa de multiplicación en el periodo estable del cultivo fue el de 0.2 mg L⁻¹ de BA + 0.02 mg L⁻¹ de ANA generando 2.17 brotes por explante (Figura 3 c), caso contrario de Flores *et al.*

(2009), mencionan que al usar microestacas de 3 cm de longitud consiguió hasta 6 brotes por explante con 1 mg L^{-1} de BA mientras que con 0.5 mg L^{-1} se redujo la generación de brotes, observando que entre más cantidad de BA se disminuye la cantidad de brotes, tal y como se observó en nuestra investigación. En cuanto a la producción de hojas el mejor tratamiento fue también el de 0.2 mg L^{-1} de BA + 0.02 mg L^{-1} de ANA presentando 2.13 hojas por vitroplanta (Figura 3 c), y para el mayor tamaño donde se obtuvo una diferencia significativa ($p \leq 0.05$) con el tratamiento de 0.5 mg L^{-1} de BA + 0.05 mg L^{-1} de ANA, se alcanzó un tamaño promedio de 1.91 (Figura 3 d) al igual que Borges *et al.* (2004); Con el uso de BA en concentraciones de 0.5 mg L^{-1} en el sistema semisólido la especie de *Ficus carica* L. cultivar roxo de valinhos, tiende a presentar un desarrollo de 2.62 cm por vitroplantula, mientras que al aumentar la dosis de BA a 2.0 mg L^{-1} tuvieron disminución tanto en brotación como en el tamaño de brote, estos tuvieron un desarrollo tan solo de 1.5 cm. El resultado obtenido para la variable longitud de brotes (2.62 cm) también estuvo en línea con la respuesta de *Ficus carica* c.v kalamon adicionándole 0.5 mg L^{-1} de BA (Pontikis y Melas, 1986). Mientras que el tratamiento con TDZ obtuvo la menor tasa de multiplicación al igual que la menor producción de hojas por tejido vegetal (Cuadro 8).

La polaridad de regeneración del tejido vegetal puede tener una variación con el genotipo y puede ser revertida por los tratamientos de reguladores de crecimiento que se le suministren (George, 1993). Un aspecto importante para lograr un mayor número de brotes es la ubicación de los tejidos vegetales en el medio de cultivo, al colocarlos de forma horizontal estos asimilan de mejor manera los nutrientes ya que están en contacto total con el medio de cultivo, factor importante para su desarrollo. Victoriano *et al.* (2010); prueba que la posición en que se coloca el explante y este en contacto con el medio de cultivo tiende a ser

un factor de gran importancia para su asimilación de nutrientes, emisión de brotes y la formación de hojas en *Vaccinium corymbosum* L. obteniendo 5 brotes y 20 hojas expandidas por vitroplantula, al colocarlos de manera vertical, caso contrario al momento de ser orientados horizontalmente, pues de esta manera alcanzaron hasta 27 brotes y 55 hojas expandidas por tejido vegetal, los tejidos presentaron una marcada polaridad morfogenética al ser colocados en esta posición, esta respuesta seguramente podría deberse a que el explante tiene una mayor superficie de contacto con el medio de cultivo (Debnath y McRae, 2002; Debnath 2005), demostrando que la orientación de estos en el medio de cultivo es un importante factor para el aumento de brotes como de hojas, método que se pudo comprobar con la especie *Ficus carica* L.(Figura 3 b).

Cuadro 8. Efecto de ANA, BA y TDZ en tres distintos tratamientos en relación a número de brotes, hojas y tamaño del explante de higuera en el sistema tradicional (ST).

Tratamientos	Número de Brotes	Número de Hojas	Tamaño (cm)
BA 0.2 mg L ⁻¹ + ANA 0.02 mg L ⁻¹	2.17 ± 1.45 a	2.13 ± 2.09 a	1.43 ± 0.55 b
BA 0.5 mg L ⁻¹ + ANA 0.05 mg L ⁻¹	1.88 ± 0.91 ab	1.73 ± 2.17 ab	1.91 ± 0.69 a
TDZ 0.1 mg L ⁻¹ + ANA 0.01 mg L ⁻¹	1.72 ± 0.92 b	1.32 ± 2.08 b	1.73 ± 0.89 a

Medias de 24 unidades en el tiempo. Letras diferentes entre columnas existe diferencia significativas con $p \leq 0.05$ de acuerdo con la prueba de Tukey.

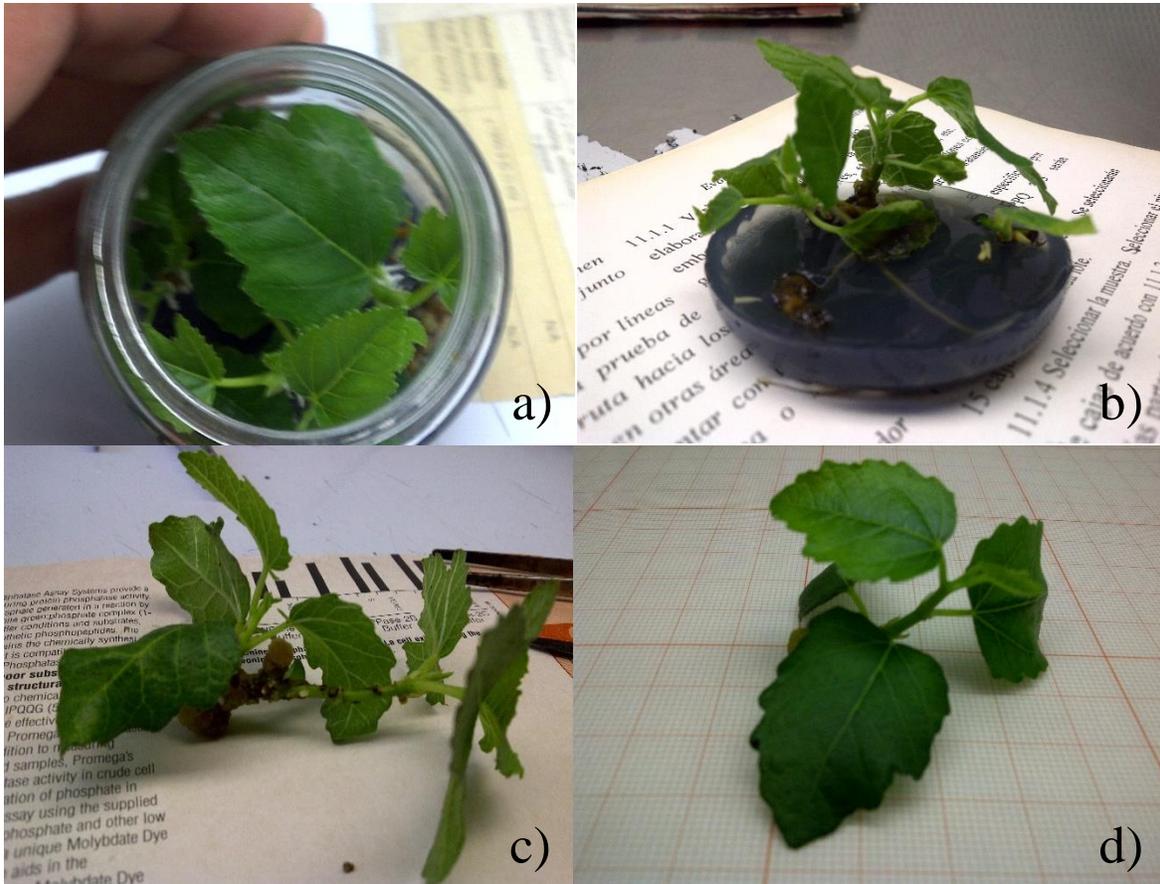


Figura 3. Aspecto de brotes de higuera cultivar Netzahualcóyotl en el sistema tradicional (ST). a) Condiciones de cultivo en los tres diferentes tratamientos de hormonas de crecimiento convencionales. b) Modo de localización de los explantes dentro de su frasco. c) Número de brotes y número de hojas con BA 0.2 mg L⁻¹ + ANA 0.02 mg L⁻¹. c) Tamaño promedio obtenido por explante en relación al tratamiento de BA 0.5 mg L⁻¹ + ANA 0.05 mg L⁻¹.

6.4. Multiplicación del cultivar con 1-TRIACONTANOL.

6.4.1 Efecto de 1-TRIACONTANOL en el sistema tradicional *in vitro* de higuera cultivar Netzahualcóyotl.

Una vez que se logró la estabilidad del cultivo, se procedió a evaluar el efecto de un regulador de crecimiento de nueva generación, que ha sido utilizado para favorecer la multiplicación en diferentes especies como *Arabica* L. cv. Caturra y Catuaí al inducir embriogénesis somática (Malabadi, 2005) o mejorar el crecimiento de la planta y sus actividades fisiológicas en diversas especies y condiciones de cultivos (Naeem *et al.*, 2011), con el uso de 1-triacontanol durante esta investigación las plantas que fueron evaluadas con los distintos tratamientos de este regulador de crecimiento estuvieron expuestas a condiciones de 25 ± 2 °C, con 16 horas luz y una intensidad luminosa de $47.3 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ durante un periodo de 30 días y seis subcultivos consecutivos. Fueron establecidas tres diferentes concentraciones de 1-triacontanol que van de 2, 5 y $10 \mu\text{g L}^{-1}$ en combinación de 0.1 mg L^{-1} de BA + 0.01 mg L^{-1} de ANA respectivamente, con un cuarto tratamiento como testigo con reguladores de crecimiento convencionales. En la evaluación se observó una diferencia significativa ($p \leq 0.05$) con el uso de esta nueva hormona de crecimiento ya que se mantuvo superior en cuanto a los resultados que brindó el tratamiento (0.5 mg L^{-1} de BA + 0.05 mg L^{-1}), de las hormonas convencionales (testigo). El tratamiento que tuvo mejor resultado para generar brotes fue el de $5 \mu\text{g L}^{-1}$ generando 2.41 brotes (Figura 4 a) por tejido, siendo este también el mejor tratamiento tanto para hojas como para el tamaño, emitiendo 5 hojas (Figura 4 b) con un tamaño promedio de 3.55 cm de longitud (Figura 4 c), de esta manera se comprobó que el uso de TRIA en la especie *Ficus carica* L. cultivar

Netzahualcóyotl es más eficaz que el uso común de las hormonas de crecimiento convencionales (Cuadro 9).

Gatica *et al.* (2008), en concentraciones de 1.1 BA, 2.85 AIA, 4.55 μ M de TRIA respectivamente, lograron generar callos discontinuos en la superficie, y al paso de diez semanas estos callos produjeron embriones somáticos tanto globulares como de torpedo aumentando significativamente la media de embriones por explante y el porcentaje de explantes productores de embriones. Mientras que al utilizar concentraciones mayores de TRIA observaron que se revierte el efecto pues obtuvieron un resultado negativo al no generar embriones somáticos siquiera a las 25 semanas de ser sembrados los explantes. Santos *et al.* (2001), al utilizar TRIA en especies leñosas (*Malus domestica* cv. JTE-E4) y cereza agria (*Fruticosa cerasus* cv. Probocskai), observan la eficacia de este regulador de crecimiento al obtener buenos resultados en concentraciones muy similares a las nuestras 2, 5 y 20 μ g L⁻¹ aumentando el número de brotes y el peso fresco de los explantes, sin embargo también observaron que la actividad de este fitoregulador aumenta considerablemente cuando es combinada con la citoquinina denominada AIB en concentraciones de 0.5 mg L⁻¹ desarrollando de manera considerable tanto la brotación como el tamaño de la raíz del tejido vegetal en las especies leñosas. También en especies herbáceas como *Bupleurum fruticosum* L. el uso del 1-triacontanol ha generado estupendos resultados (Fraternale *et al.*, 2002) ya que al evaluar cuatro distintas concentraciones de TRIA (2, 5, 10 y 20 μ g L⁻¹) y al compararlo con el uso de AIA y BA observaron que el 1-triacontanol es más eficaz en la etapa de multiplicación al evaluar el número de nodos, brotes y peso fresco, donde el mejor tratamiento de 1-triacontanol fue la concentración de 2 μ g L⁻¹, mientras que para el desarrollo en cuanto a tamaño el mejor tratamiento fue 10 μ g

L⁻¹, mientras que en *Thymus mastichina* el uso de 20 µg L⁻¹ fue el mejor tratamiento para lograr el mayor tamaño de los explantes (Fraternale *et al.*, 2003), el aumento de tamaño originado por TRIA no es solamente causada por la absorción del agua y de la ampliación de la célula sino que también se debe por el aumento en el número de célula. La eficacia de este regulador de crecimiento también fue demostrado durante la evaluación de higuera donde también se puede observar el desarrollo de sus raíces (Figura 4 d).

Cuadro 9. Respuesta al uso de 1-TRIACONTANOL en el sistema tradicional semisólido (ST).

Tratamientos ^z	Número de Brotes	Número de Hojas	Tamaño (cm)
Triacontanol 2 µg L ⁻¹	2.41 ± 1.04 a	4.77 ± 3.12 a	3.25 ± 0.12 a
Triacontanol 5 µg L ⁻¹	2.37 ± 1.16 a	5.39 ± 3.86 a	3.55 ± 0.05 a
Triacontanol 10 µg L ⁻¹	2.37 ± 1.21 a	4.91 ± 3.74 a	3.43 ± 0.33 a
BA 0.5 mg L ⁻¹ y ANA 0.05 mg L ⁻¹	1.58 ± 0.96 b	4.37 ± 4.55 a	3.13 ± 0.11 a

Medias de 8 unidades experimentales con cuatro explantes por unidad en cada tratamiento en relación a número de brotes, hojas y tamaño del explante. ^z Tratamientos de 1-triacontanol combinados con 0.1 mg L⁻¹ de BA + 0.01mg L⁻¹ de ANA respectivamente. Medias con letras distintas entre columnas son significativamente diferentes (Tukey, p ≤ 0.05).

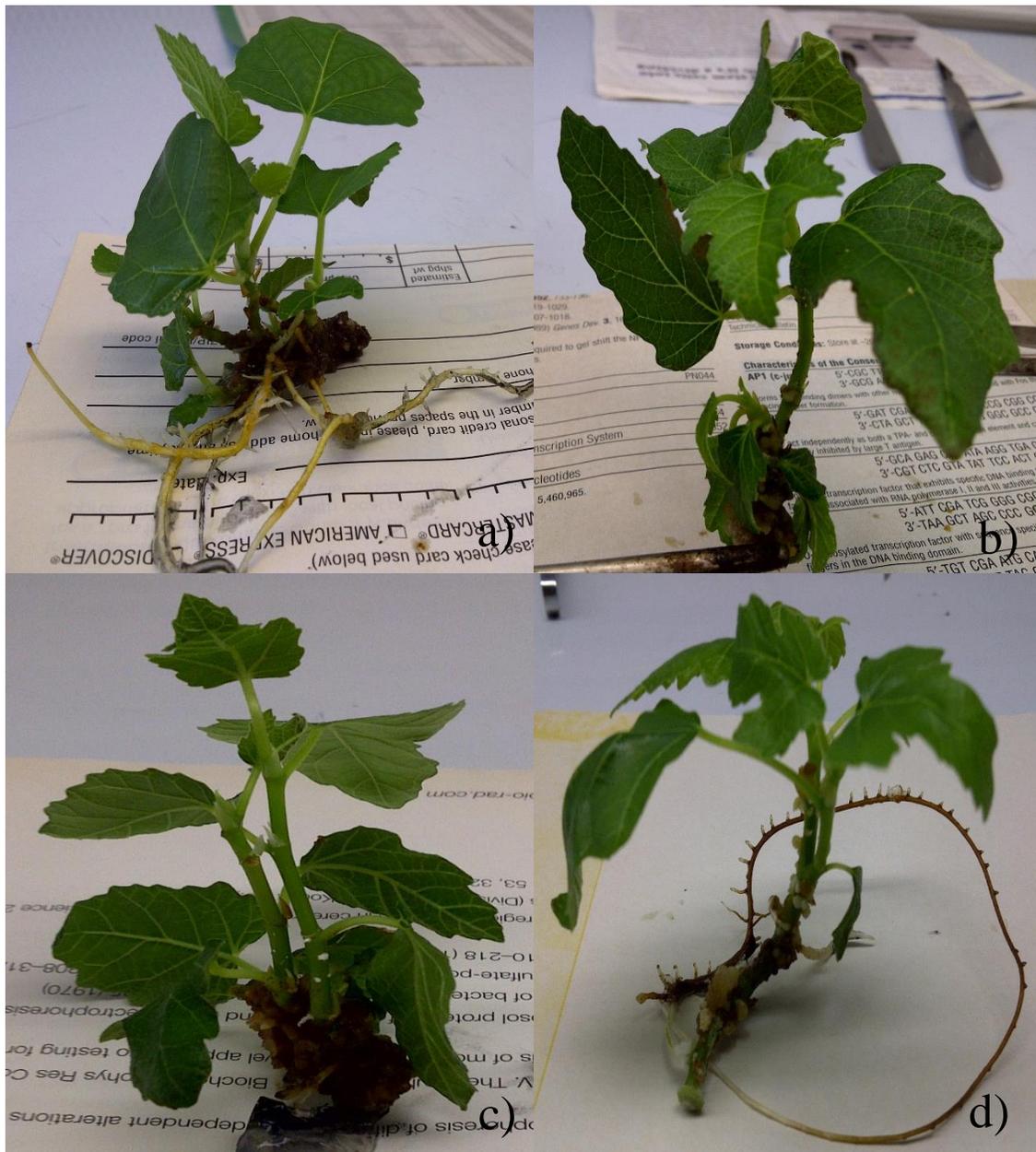


Figura 4. Efecto de 1-Triacontanol sobre el cultivo de higuera en el sistema semisólido. a) Número de brotes por efecto de TRIA $5 \mu\text{g L}^{-1}$. b) Aspecto y número de hojas obtenidas con la hormona de crecimiento TRIA. c) Tamaño alcanzado por los explantes desarrollados con $5 \mu\text{g L}^{-1}$ de TRIA. d) Desarrollo de la raíz por motivo del 1-Triacontanol en el (ST).

6.5 Multiplicación en el sistema de inmersión temporal SIT.

6.5.1 Comparación entre la micropropagación generada en el sistema tradicional en semisólidos (ST) y el sistema de inmersión temporal (SIT) con el uso de hormonas convencionales y de nueva generación.

Una vez definido el protocolo de multiplicación en agar se procedió implementar su uso en el sistema de inmersión temporal (SIT) (Etienne y Berthouly, 2002) (Figura 5 a), ya que con este tipo de sistema la producción de plantas aumenta significativamente y se reduce el tiempo al obtenerlas, pues los efectos morfogenicos de los explantes pueden depender de las relaciones hídricas, el intercambio gaseoso y el incremento de la asimilación de nutrientes que se logra con los tiempos de inmersión (Salazar y Hoyos, 2007). Aspectos que de alguna forma favorecen el desarrollo y crecimiento del material vegetal (Figura 5 b). Con base a este sistema previamente se realizaron 2 ensayos con 3 distintos tiempos de inmersión, los cuales consistieron en 1 cada 4, 6 y 12 horas, de los cuales los explantes obtenidos por las inmersiones de 1 min cada 4 horas presentaban sobre hidratación en todo el tejido mientras que los obtenidos por la inmersión de 1 min cada 12 horas no alcanzaban a desarrollarse durante el periodo de evaluación que consta de 30 días después de ser sembrados, por dichos motivos se decido trabajar con el tiempo de inmersión que fue más satisfactorio para el desarrollo de las vitroplantulas, el cual fue el de 1 min cada 6 horas. Se observó una diferencia significativa ($p \leq 0.05$) entre las dos técnicas probadas, el SIT fue superior que el sistema en semisólido (ST), tanto en el número de brotes, hojas como el tamaño del explante. La inmersión temporal en el cultivo de higuera cultivar Netzahualcóyotl originó un incremento significativo ($p \leq 0.05$) en la emisión de brotes generando 2.90 por tejido (Figura 5 c) ha comparación al ST donde solo generaron de 1.90

brotos en el tratamiento de BA 0.5 mg L⁻¹ + ANA 0.05 mg L⁻¹ (Cuadro 10), mientras que con el tratamiento de TRIA 10 µg L⁻¹ BA 0.1 mg L⁻¹ + ANA 0.01 mg L⁻¹ no se observaron diferencias significativas para número de brotes, sin embargo aunque no se encontraron diferencias significativas se pudo visualizar que el sistema de inmersión temporal con RITAS[®] originó un mayor número de brotes por vitroplanta. De igual manera se observó que la implementación del SIT favoreció significativamente ambos tratamientos ($p \leq 0.05$) en el desarrollo de hojas (Figura 5 d), alcanzando 9.12 hojas con TRIA 10 µg L⁻¹ BA 0.1 mg L⁻¹ + ANA 0.01 mg L⁻¹ y 10.92 hojas por explante con BA 0.5 mg L⁻¹ + ANA 0.5 mg L⁻¹, mientras que en el ST se obtuvieron 4.20 y 1.27 hojas por explante respectivamente. En el tamaño de los tejidos se encontraron diferencias significativas ($p \leq 0.05$) entre los sistemas evaluados al igual que entre tratamientos, en el SIT el tamaño de los tejidos osciló entre los 2.75 cm (Figura 5 d) con TRIA 10 µg L⁻¹ + BA 0.1 mg L⁻¹ + ANA 0.01 mg L⁻¹ y 2.53 cm con BA 0.5 mg L⁻¹ ANA 0.05 mg L⁻¹, mientras que en el ST osciló entre 2.32 con TRIA 10 µg L⁻¹ + BA 0.1 mg L⁻¹ + ANA 0.01 mg L⁻¹ y 1.83 cm con BA 0.5 mg L⁻¹ ANA 0.05 mg L⁻¹. También se pudo observar que el desarrollo del tejido vegetal es más rápido pues al paso de 3 semanas es posible llevar a cabo el subcultivo de estos a comparación del ST donde es necesario que transcurran 4 semanas para lograr los resultados ya mencionados. En investigaciones realizadas por otros autores (Salazar y Hoyos, 2007), el medio de cultivo líquido también ha presentado un favorecimiento en el cultivo de ñame tanto en el tamaño y vigorosidad donde se observó que la mejor emisión de brotes fue en un tiempo de inmersión de 10 min en el SIT con 0.5 mg L⁻¹ de kinetina teniendo resultados a los 6 días de haber sido sembrados con una emisión de 2 brotes para ambos tratamientos y 8 hojas con un tamaño de 3.38 cm por explante. Quiala *et al.* (2012), mostraron que la multiplicación de brotes de *Tectona grandis* L. en sistemas de inmersión temporal fue

mayor en comparación al sistema tradicional en semisólidos, utilizando 2.22 μM de BA, mostrando una morfología normal de estos con una medida de 4.1 de brotes normales. Vilchez *et al.*, (2007), obtuvieron resultados similares en cuanto al tiempo de la emisión de brotes con *Aloe vera* (L.) *Burm. f.* desarrollando brotes a los 10 días de ser sembrados en los RITAS[®], mientras que en el sistema semisólido obtuvieron brotes 15 días después de ser sembrados. Estos resultados concuerdan con el rápido desarrollo de nuestro material utilizado. Por otro lado, los autores deducen que la alta generación de brotes (2.75) y el tamaño fue debido al efecto que producen las fitohormonas que usaron, además pudo deberse al contacto intermitente de los brotes con el medio de cultivo, el cual está reducido a una delgada capa adherida por cohesión a ellos y que cada vez que existe una inmersión es renovada, al igual que la atmósfera gaseosa en el recipiente permitiendo de esta manera un mayor aprovechamiento de los nutrientes y un intercambio gaseoso más eficiente.

Cuadro 10. Uso del sistema de inmersión temporal (ST) con RITAS[®] en comparación al sistema tradicional (ST) bajo las mismas condiciones de incubación y con dos diferentes tratamientos.

Tratamiento	Número de Brotes		Número de Hojas		Tamaño (cm)	
	(ST)	(SIT)	(ST)	(SIT)	(ST)	(SIT)
Trial 10 μ L ⁻¹ + BA 0.1 mg L ⁻¹ + ANA 0.01 mg L ⁻¹	2.35 \pm 1.27 a ²	2.80 \pm 1.85 a	4.20 \pm 3.60 b	9.12 \pm 6.42 a	2.32 \pm 1.26 a	2.75 \pm 1.27 a
BA 0.5 mg L ⁻¹ + ANA 0.05 mg L ⁻¹	1.92 \pm 1.92 b	2.90 \pm 2.90 a	1.27 \pm 1.58 b	10.92 \pm 9.50 a	1.83 \pm 0.66 b	2.53 \pm 1.12 a

Medias de 40 explantes durante 5 repeticiones en el tiempo en condiciones de incubación 25 \pm 2 °C, con 16 horas luz. ²Medias con letras distintas entre hileras son significativamente diferentes (Tukey, p \leq 0.05).



Figura 5. Explantes generados con base al sistema de inmersión temporal RITA[®]. a) Modo de empleo y condiciones de incubación para el (SIT). b) Desarrollo de los explantes de higuera dentro de los recipientes de inmersión temporal RITA[®]. c) Número de brotes por efecto del TRIA en condiciones de inmersión temporal. d) Tamaño obtenido y número de hojas generadas a partir de la inmersión temporal.

6.6 Enraizamiento de microestacas de higuera cultivar Netzahualcóyotl en condiciones *in vitro* con el uso de peat moss y arena de rio como sustrato.

El uso de microestacas en el cultivo *in vitro* ha presentado altos beneficios al generar un porcentaje esencial de raíces logrando de esta manera una planta funcional para la fase de aclimatación, tal es el caso con *Nothofagus glauca* donde Uribe (2012), al utilizar microtallos de esta especie en cultivo *in vitro* para enraizarlos con dos hormonas de crecimiento como son ANA y AIB en concentraciones de 1, 3 y 5 mg L⁻¹ respectivamente, además de un control libre de hormonas, a los cuales se les evaluaron el porcentaje de enraizamiento, longitud de raíz y número de raíces por explante, teniendo como resultado diferencias significativas entre el tratamiento de control de los microtallos sometidos a las diferentes concentraciones de las hormonas de crecimiento utilizadas, obteniendo un 87.5 % de enraizamiento adventicio con 1 mg L⁻¹ de AIB y un 75 % con 3 mg L⁻¹ de ANA. Torres (1994), al utilizar distintas concentraciones de ANA en condiciones *in vitro* pudo establecer que la mejor concentración de esta hormona para promover el enraizamiento en estacas de nim fue 0.05 mg L⁻¹, logrando un enraizamiento a los 28 días de haber expuesto los tejidos vegetales a esta hormona de crecimiento, menciona también que el enraizamiento de estacas de nim en condiciones de invernadero podrían depender de la época del año en que son cultivadas como también la temperatura a las que se encuentren expuestas, las temperaturas excesivamente altas promueven el desarrollo de las yemas antes que el desarrollo radicular, la temperatura puede afectar directamente la respiración de la estaca provocando que las reservas sean reducidas en un tiempo más rápido de lo que son las respuestas, observo que en el mes de agosto genero un mayor porcentaje de brotación y el mayor porcentaje de enraizamiento de un 27 % a diferencia del mes de junio y febrero donde obtuvo un porcentaje de enraizamiento por debajo del obtenido en el mes de agosto. Llegando a la conclusión que la

presencia de auxinas en el medio de cultivo es indispensable para la formación de raíces en condiciones *in vitro*. Mientras que otro factor importante para lograr el enraizamiento de microestacas depende de la época en que sean cultivadas así como la temperatura a la que sean expuestas.

El uso de las charolas para la micropropagación de estaquillas de higuera no fue viable en la sobrevivencia de las microestacas, ya que el espacio que presentan estas charolas comerciales es muy reducido evitando una oxigenación adecuada y un desarrollo no favorable, otro punto importante fue el exceso de humedad (Figura 6 a) que se presentaba en las charolas promoviendo así la presencia de hongos y con ello la propagación de estos en todos los explantes dentro de la charola afectando nuestro experimento, en base de estos inconvenientes se logró una sobrevivencia de un 26.66 %.

Las microestacas tratadas con el promotor de enraizamiento comercial AIB líquido no presentaron diferencias significativas entre tratamientos, sin embargo la emisión más alta de raíces lo provocó el tratamiento de 0.3 mg L^{-1} emitiendo en promedio 11 raíces (Cuadro 11), mientras que el mejor tratamiento para provocar la mayor longitud de las raíces emitidas fue el tratamiento de 0.1 mg L^{-1} alcanzando un tamaño de entre 1 a 2 cm por raíz generada (Figura 6 b) en base a este tratamiento, sin embargo las raíces que se formaron tanto en estos dos tratamientos mencionados como en los demás tratamientos implementados presentaban un aspecto raquítrico, fibroso y un tanto separadas una de otra, aspectos que al momento de ser evaluadas complicaban su conteo como tomar la medida de cada una de ellas ya que se dañaban al sacarlas del sustrato, se rompían al tratar de medirlas, cabe mencionar que en ninguno de los tratamientos hubo presencia de raíces secundarias

Cuadro 11. Número y tamaño de raíces generadas en base al promotor de enraizamiento AIB líquido en 5 distintas concentraciones con un testigo sin enraizador.

Tratamientos	Número de raíces	Raíz mayor	Raíz menor
AIB 0.1 mg L ⁻¹	5.00 ± 1.41 a	1.01 ± 1.58 a	0.13 ± 0.25 a
AIB 0.2 mg L ⁻¹	7.00 ± 7.07 a	0.32 ± 1.07 a	0.11 ± 0.39 a
AIB 0.3 mg L ⁻¹	11.00 ± 1.41 a	0.54 ± 1.71 a	0.06 ± 0.23 a
AIB 0.4 mg L ⁻¹	3.50 ± 2.12 a	0.67 ± 1.79 a	0.15 ± 0.40 a
AIB 0.5 mg L ⁻¹	0.00 ± 0.00 a	0.00 ± 0.00 a	0.00 ± 0.00 a
Testigo	0.00 ± 0.00 a	0.00 ± 0.00 a	0.00 ± 0.00 a

Medias de 20 explantes en charolas con peat-mos como sustrato en condiciones 25 ± 2 °C, con una intensidad luminosa de 20 μmol cm⁻² y evaluadas al paso de 30 días. Medias con letras distintas entre columnas son significativamente diferentes (Tukey, p ≤ 0.05).



Figura 6. Primer ensayo de microestacas en charolas SIGMA™ con AIB líquido como enraizador. a) Exceso de humedad en las microestacas enraizadas con AIB dentro de la charola. b) Enraizamiento generado a partir de 0.1 mg L⁻¹ de AIB líquido.

6.6.1 Efecto de cuatro concentraciones de enraizador formulado a partir del producto comercial Radix 10000®.

En promedio de las tres épocas del año en que fueron realizados los experimentos de enraizamiento, el tratamiento de 1000 ppm fue el que proporcionó el mejor porcentaje de enraizamiento (30 %) (Cuadro 12) con un tamaño de raíces de 3 cm además se observó que este tratamiento generó raíces en las tres épocas del año evaluadas (Figura 7).

Cuadro 12. Porcentaje de enraizamiento en promedio de las tres épocas del año causado por las 4 distintas formulaciones de Radix 10000®.

Tratamientos	Porcentaje de Enraizamiento
250 ppm	12.00 ± 0.00 ab
500 ppm	10.00 ± 0.00 ab
750 ppm	10.00 ± 5.00 ab
1000 ppm	30.00 ± 22.91 a
Testigo	0.00 ± 0.00 b

Medias de 20 explantes en tubetes con arena de río y agrolita como sustrato en condiciones 25 ± 2 °C, con una intensidad luminosa de $20 \mu\text{mol cm}^{-2}$ y evaluadas al paso de 30 días durante tres repeticiones. Medias con letras distintas entre columnas son significativamente diferentes (Tukey, $p \leq 0.05$).

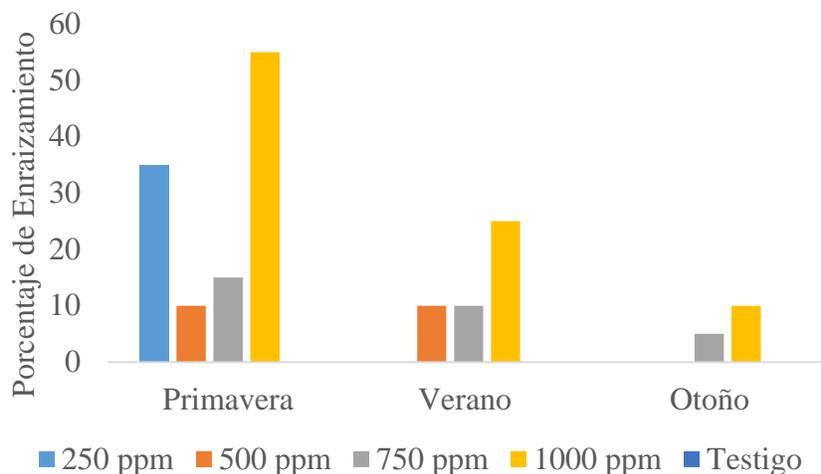


Figura 7. Porcentaje de enraizamiento resultado tanto de las 4 formulaciones a partir del enraizador comercial Radix 10000[®] como también por el efecto de la época del año.

Con el uso de tubetes (Figura 8 a) como contenedores para el enraizamiento de las microestacas, y un sustrato diferente como lo es la arena de río se logra evitar una alta humedad alcanzando de esta manera una mayor sobrevivencia de microestacas (Figura 8 b). Con esta metodología se evitó el contagio total de los explantes en caso de presentar hongos o pudrición ya que se colocaba una microestaca por tubete. Las estacas sobrevivientes (Cuadro 13) fueron colocadas en condiciones de invernadero.

Cuadro 13. Porcentaje de sobrevivencia de microestacas evaluadas durante las tres diferentes épocas del año (primavera verano y otoño).

Tratamientos	Porcentaje de Sobrevivencia
250 ppm	25.00 ± 35.00 a
500 ppm	18.33 ± 10.40 a
750 ppm	18.33 ± 20.20 a
1000 ppm	38.33 ± 15.27 a
Testigo	10.00 ± 17.32 a

Medias de 20 explantes en tubetes con arena de río y agrolita como sustrato en condiciones 25 ± 2 °C, con una intensidad luminosa de $20 \mu\text{mol cm}^{-2}$ y evaluadas al paso de 30 días durante tres repeticiones. Medias con letras distintas entre columnas son significativamente diferentes (Tukey, $p \leq 0.05$).

6.6.2 Emisión de raíces durante las tres épocas del año evaluadas bajo 4 tratamientos formulados a partir del enraizador comercial Radix 10000® y un testigo sin enraizador.

El crecimiento de las raíces puede depender tanto de la cantidad de estimulante que se les suministre a las microestacas como también influye la época del año en que se realice la siembra de estas, pues si se siembra en una etapa donde el cultivar se encuentre en proceso de letargo el desarrollo de las raicillas se verá afectado tal y como se muestra en el (Cuadro 14), otro punto importante para la emisión de raíces es la temperatura a las que estas se encuentren expuestas durante el proceso de enraizamiento, la especie *Ficus carica* L. cultivar Netzahualcóyotl tuvo como resultado favorable la época de primavera al poderse observar una mayor presencia de raicillas en cada tratamiento (Figura 8 c) proporcionando el mejor tratamiento hasta 13.50 raíces en esta época, como también en el tamaño más pronunciado fue en esta época, variables que son de gran importancia para un mejor desarrollo de la microestaca (Figura 8 d). y poder lograr así una planta como tal en el área de invernaderos.

Cuadro 14. Emisión de raíces por época de año y tratamientos de 0, 250, 500, 750, 1000 ppm en condiciones *in vitro* evaluadas al paso de 30 días después de ser sembradas.

Tratamientos	Épocas del Año		
	Primavera	Verano	Otoño
250 ppm	9.95 ± 0.41 a	0.00 ± 0.00 b	0.00 ± 0.00 b
500 ppm	13.50 ± 2.12 a	2.00 ± 1.41 b	0.00 ± 0.00 b
750 ppm	5.50 ± 2.12 ab	1.50 ± 0.70 b	2.00 ± 0.00 a
1000 ppm	8.66 ± 3.29 a	5.58 ± 0.11 a	1.50 ± 0.70 a
Testigo	0.00 ± 0.00 b	0.00 ± 0.00 b	0.00 ± 0.00 b

Medias de 20 explantes en tubetes con arena de río y agrolita como sustrato en condiciones 25 ± 2 °C, con una intensidad luminosa de $20 \mu\text{mol cm}^{-2}$ y evaluadas al paso de 30 días durante tres repeticiones. Medias con letras distintas entre columnas son significativamente diferentes (Tukey, $p \leq 0.05$).

Se pudo observar que las raíces con mayor tamaño las presentó el tratamiento de 500 ppm que en promedio fue de 5.25 cm y teniendo un promedio de raíces del 10 % durante la época de primavera (Figura 8 e), mientras que en las siguiente época verano se presentó una diferencia significativa ($p \leq 0.05$) con el tratamiento de 1000 ppm teniendo un promedio de 1.76 cm y en el otoño la diferencia significativa la presentó el tratamiento de 750 ppm al generar raíces de 0.50 cm de tamaño. Las raíces que emitieron las microestacas tratadas con los tratamientos formulados a partir del enraizador comercial en polvo Radix 10000[®] independientemente de la época del año en que fueron evaluadas y ya sea de menor o de mayor tamaño (Cuadro 15) mostraron un aspecto vigoroso, y bien arraigadas al explante y poder lograr así una planta como tal en el área de invernaderos (Figura 8 f y 9).

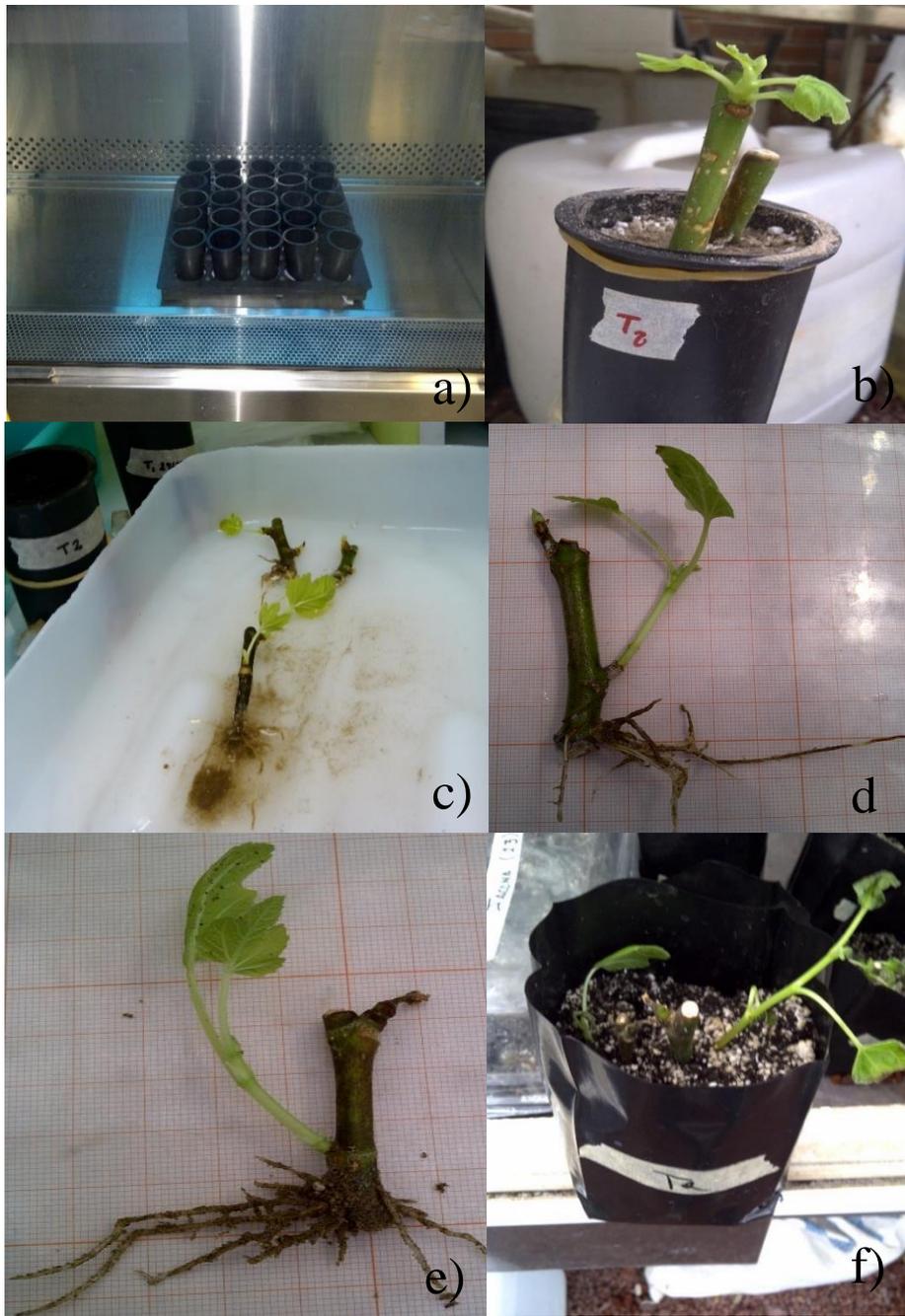


Figura 8. Producción de microestacas de higuera bajo la combinación del sistema tradicional y el sistema del cultivo in vitro. a) Modo de esterilización de los tubetes contenedores del sustrato y la microestaca. b) Método de siembra de las microestacas dentro de los tubetes. c) Proceso de limpieza de las raíces generadas por los tratamientos formulados a partir del enraizador comercial Radix 10000[®]. d) Raíces generadas en la mejor época de enraizamiento (primavera). e) Número y tamaño generado a partir de 500 ppm de Radix 10000[®] en la época de primavera. f) Microestacas llevadas a condiciones de invernadero.

Cuadro 15. Efecto de cada tratamiento formulada a partir del enraizador comercial Radix 10000® en cuanto el tamaño obtenido de raíces generadas en las microestacas durante tres épocas distintas en el año.

Tratamiento	Épocas del Año					
	Primavera		Verano		Otoño	
	Raíz Mayor	Raíz Menor	Raíz Mayor	Raíz Menor	Raíz Mayor	Raíz Menor
250 ppm	4.61 ± 0.87 a	0.70 ± 0.44 a	0.00 ± 0.00 b	0.00 ± 0.00 c	0.00 ± 0.00 c	0.00 ± 0.00 c
500 ppm	5.25 ± 2.47 a	0.67 ± 0.49 a	0.70 ± 0.28 ab	0.30 ± 0.00 ab	0.00 ± 0.00 c	0.00 ± 0.00 c
750 ppm	5.12 ± 2.65 a	1.15 ± 0.53 a	0.65 ± 0.49ab	0.40 ± 0.00 a	0.50 ± 0.00 a	0.20 ± 0.00 a
1000 ppm	2.47 ± 1.11 a	0.56 ± 0.44 a	1.76 ± 0.32 a	0.16 ± 0.90 bc	0.20 ± 0.70 b	0.12 ± 0.00 b
Testigo	0.00 ± 0.00 a	0.00 ± 0.00 a	0.00 ± 0.00 b	0.00 ± 0.00 c	0.00 ± 0.00 c	0.00 ± 0.00 c

Medias de 20 explantes en tubetes con arena de río y agrolita como sustrato en condiciones de 25 ± 2 °C, con una intensidad luminosa de $20 \mu\text{mol cm}^{-2}$ y evaluadas al paso de 30 días durante tres repeticiones. Medias con letras distintas entre columnas son significativamente diferentes (Tukey, $p \leq 0.05$).



Figura 9. Plantas de higuera cultivar Netzahualcóyotl obtenidas a través del cultivo de microestacas *in vitro* en condiciones de invernadero.

7. Conclusiones

En base a los objetivos generales y específicos que se plantearon, y en los resultados recabados bajo las condiciones en las cuales se desarrolló ésta investigación, como también en la discusión de los mismos se derivan las siguientes conclusiones:

La mejor manera de desinfectar los explantes de higuera (ápices) es usando etanol (OH) al 70 % durante 30 seg. + cloro comercial cloralex (Cl) al 20 % durante 20 min.

El tratamiento que presentó la mayor tasa de brotación dentro de los tratamientos de hormonas convencionales fue el de 0.2 mg L⁻¹ de BA + 0.02 mg L⁻¹ de ANA dando un promedio de 2 brotes por explante con un aspecto vigoroso y de buena calidad. De esta manera se pudo observar que la estabilidad de este cultivo se logra en el séptimo mes.

Con el uso del 1-Triacontanol en el sistema semisólido en concentración de 2 µg L⁻¹ y junto con 0.1 mg L⁻¹ de BA + 0.01 mg L⁻¹ de ANA se aumentó la tasa de multiplicación, en comparación a los reguladores convencionales.

El sistema de inmersión temporal con el uso de biorreactores tipo RITA[®] con una inmersión de 1 minuto cada 6 horas en la micropropagación de *Ficus carica* L. mostro ser una técnica de propagación masiva eficaz en el desarrollo de los explantes ya que incremento significativamente la tasa de multiplicación, el tamaño y la calidad de los brotes en tres semanas, con 0.5 mg L⁻¹ de BA + 0.05 mg L⁻¹ de ANA.

Es posible propagar la higuera con el uso de microestacas en la época de primavera (mayo) siendo esta lamejor al obtener mayor porcentaje de enraizamiento (55 %) con el uso de 1000 ppm de Radix 10000[®], además de ser el mejor tratamiento durante las tres épocas del año evaluadas.

8. Literatura Citada.

Agusti M. 2010. Fruticultura Ediciones Mundi-Prensa Pp: 364.

Albarracin P., Jadan M. y Peña C. 2012. Evaluación de un Sistema de Inmersión Temporal Frente al Método de Propagación Convencional en la Multiplicación *in vitro* de Cilantro Cimarrón (*Eryngium foetidum*) a Partir de Hojas, Yemas y Segmentos Nodales. Tesis Escuela Politécnica del Ejercito Sangolquí. 228pp.

Aljane F., Toumi I. y A. Ferchichi. 2007. HPLC Determination of Sugars and Atomic Absorption Analysis of Mineral Salts in Fresh Figs of Tunisian Cultivars. African Journal of Biotechnology 6 (5): 599-602.

Berthouly M., Dufour M., Alvard D., Carasco C., Alemanno L., Teisson C. 1995. Coffe Micropropagation in Liquid Médium Using Temporary Immersion Technique, ASIC, Kyoto, VolII: 514-519C

Bonga J. M. 1982. Vegetative Propagation in Relation to Juvenility, Maturity and Reguvenation. En Bonga J. M. y Durzan, S. N. (eds). Tissue Culture in Forestry. Martinus Nijhoff, Holanda. Pp 387- 412.

Borges F. C., Pasqual M., Ferreira D. L. y Cazetta J. O. 2004. Micropropagation of Fig (*Ficus carica* L.) Roxo de Valinhos Plants. In Vitro Cell. Dev. Biol.—Plant 40:471–474.

Borowski E., Blamowski Z. K. y Michalek W. 2000. Effects of Tomatex/Triacontanol on Chlorophyll Fluorescence and Tomato (*Lycopersicon esculentum Mill*), Yields. Acta Physiol. Plant. 22: 271-274.

Bradley M. V. y Crane J. C. 1969. Auxins and Gibberellin-like Substances in Parthenocarpic and Non-Parthenocarpic Syconia of *Ficus carica L.*, Cv. King Plant Physiology, 1969, Vol.44(4), Pp 555-561.

Castro R. D. y Gonzales O. J. 2002. Eucalyptus (*Eucalyptus grandis Hill ex Maiden*) Micropropagation in a Temporary Immersion System. Agric. Téc. v.62 n.1.

Chu I. 1995. Economic analysis of automated micropropagation. In: Aitken Christie J, Kozai T, Smith MAL (eds) Automation and Environmental Control in Plant Tissue Culture Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands. (Pp 19–27).

Corredoira E., Janeiro L. V. y San José M. C. 2011. Aplicación de Técnicas de Cultivo *in vitro* en la Propagación del Aliso con Vistas a su Conservación. IBADER- Universidad de Santiago de Compostela Recursos Rurais no 7: 49-57

Cousins M.M., Adelberg J.W. 2008. Short-term and Long-term Time Course Studies of Turmeric (*Curcuma longa L.*) Microrhizome Development *in vitro*. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 93: 283-293.

Cura A. A. - Rey H. Y. y Mroginski L. A. 2004. Cultivo *in vitro* de Tejidos Para la Regeneración de Plantas de Aloe vera L. (Liliaceae). Facultad de Cs. Agrarias - IBONE - UNNE.

Debnath S. C. 2009. Zeatin and TDZ-induced Shoot Proliferation and Use of Biorreactor in Clonal Propagation of Medicinal Herb, Roseroot (*Rhodiola rosea* L.). J. Plant Biochemistry y Biotechnology Vol. 18(2), 245-248.

Debnath S. C y McRae K. B. 2002. An Efficient Shoot Regeneration System on Excised Leaves of Micropropagate Dlingonberry (*Vacciniumvitis-idaea* L.). JHortic Sci Biotechnol 77: 744-752.

Debnath S. C. 2005. Micropropagation of Lingonberry: Influence of Genotype, Explant, Orientation, and Overcoming TDZ-induced Inhibition of Shoot Elongation Using Zeatina. Hortscience 40:189-192.

Engelmann F. 1991. *In vitro* Conservation of Tropical Plant Germplasm - a Review. Euphytica 57: 227-43.

Espinosa. P. 1996. Técnicas de Propagación Vegetativa. Instituto Agropecuario Nacional. Argentina. Pp 57-61.

Etienne H. y Berthouly M. 2002. Temporary Immersion Systems in Plant Micropropagation. Plan Cell, Tissue and Organ Culture 69: 215-231.

Flores D. A. 1990. La Higuera. Ediciones Mundi-Prensa Castello, 37 2800, Madrid. Pp. 286.

Flores M.D. y Jiménez B.V. 2007. Desarrollo del Cultivo del Higo (*Ficus carica*) Para Consumo Fresco y Procesado, Como una Alternativa de Diversificación Para el Sector Agrícola. Rev. Escuela de Biología Centro de Investigaciones en Biotecnología.

Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) (2007- 2012).

Fraternal D; Giamperi L; Ricci D. y Rocchi M.B.L. 2002. Micropropagation of *Bupleurum Fruticosum*: The effect of triacontanol. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, Volume 69, Issue 2, Pp 135-140.

Fraternal D; Giamperi L; Ricci D; Rocchi M.B.L; Guidi L; Epifano F. y Marcotullio M.C. 2003. The Effect of Triacontanol on Micropropagation and on Secretory System of *Thymus Mastichina*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 74: 87–97.

Gatica A. M., Arrieta G. y Espinoza A. M. 2008. Direct Somatic Embryogenesis In *Coffea Arabica* L. cvs. Caturra and Catuaí: Effect of Triacontanol, Light Condition, and Medium Consistency. Agronomía Costarricense 32(1): 139-147. ISSN: 0377-9424.

Gamborg O. L., Miller R. A. y Ojima O. 1968. Nutrient Requirements of Suspension Cultures of Soybean Root Cell. EXP. CELL RES. 50: 151-158.

George E. 1993. Plant Propagation by Tissue Culture. Part 1: In Practice. Exegetics, Edington.

Goncalves C. A. A., Lima L. C. de O., Lopes P. S. N. y Souza. M. T. 2006. Pruning and Conduction System in the Yield of Green Fig. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira* 41(6): 955-961.

Harrison J.N. 1990. Propagation Techniques. *Earth Production*, Florida, 15(8): 53-54.

Hartmann H. T., Kester D. E. y Davies R. F. T. 1990. *Plant Propagation. Principles and Practices* Quinta Edición. Editorial Regents/ Prentice Hall. Estados Unidos de América. Pp 482

Hartmann T. y Kester V. 1995. *Propagación de Plantas*. CECSA. México.

Hepaksoy S. y Aksoy U. 1991. Propagation of *Ficus carica* L. Clones by *in vitro* Culture. *Biología Plantarum* 50 (3): 433-436.

Houtz R. L., Ries S. K., y Tolbert N. E. 1985. Effect of Triacntanol on *Chlamydomonas* I. Stimulation of Growth and Photosynthetic CO₂ Assimilation. *Plant Physiol.*79, 357-364.

Huetteman C.A. y Preece J. E. 1993. Thidiazuron: A Potent Cytokinin for Wody Plant Tissue Culture. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 33: 105-119.

Hurtado D. y Merino M. 1988. *Cultivo de Tejidos Vegetales*. Editorial Trillas, México. Pp 15-34.

Keller E. R. J, Senula, Leunufna S. y Grübe M. 2006. Slow growth storage and cryopreservation — tools to facilitate germplasm maintenance of vegetative propagated crops in living plant collections. *International Journal of Refrigeration* 29:411-417.

Khadari, B., Grout C., S. Santoni y F. Kjellberg. 2005. Contrasted Genetic Diversity and Differentiation among Mediterranean Populations of *Ficus carica* L.: A Study Using mtDNA RFLP. *Genetic Resources and Crop Evolution* 52 (1): 97-109.

Kumar V., Radha A. y Kumar Chitta S. 1998. In vitro Plant Regeneration of Fig (*Ficus carica* L. cv. Gular) Using Apical Buds from Mature Trees. *Plant Cell Reports* 17: 717–720.

Kumaravelu G., Livingstone V.D. y Ramanujam M.P. 2000. Triacantanol-induced Changes in the Growth, Photosynthetic Pigments, Cell Metabolites, Flowering and Yield of Green Gram. *Biol. Plant.* 43: 287-290.

Kyung-Moon K., Min Y. K., Pil Y. Y., Thummala C., Hyo-Yeon L. y Pill-Soon S. 2007. Production of Multiple Shoots and Plant Regeneration from Leaf Segments of Fig Tree (*Ficus carica* L.) *Journal of Plant Biology*, August 2007, 50(4): 440-446.

Lesniak A.P., Haug A. y Ries S. K. 1986. Stimulation of ATPase Activity in Barley (*Hordeum Bulgare*) Root Plasma Membranes After Treatment of Intact Tissues and Cell Free Extracts With Triacantanol. *Physiol Plant.* 75: 75-80.

Mendoza C.V.M. 2009. Producción Intensiva de Higo (*Ficus carica* L.) Bajo Invernadero. Tesis Colegio de Postgraduados 2009. Pp. 66

Mok M. C., Mok D.W.S., Armstrong D.J., Shudo K., Isogai Y, y Okamoto T. 1982. Cytokinin Activity of N-phenyl-n¹-1,2,3-thiadi-azol-5-yl Urea (thidiazuron). Photochemistry 21:1509-1511.

Mroginsky L.A y Roca W.M. 1991. Establecimiento de Tejidos Vegetales *in vitro*. Facultad de Ciencias Agrarias. Instituto de Botánica del Noreste. Corrientes, Argentina Pp 20-27

Murthy B. N. S; Murch S. J. y Saxena P. K. 1998. Thidiazuron: A Potent Regulator of *in vitro* Plant Regeneration. *In vitro* Cell Development Biology Plant, 34: 167-272.

Naeem M., Masroor M., Khan A. y Moinuddin. 2011. Triacantanol: A Potent Plant Growth Regulator in Agriculture. Journal of Plant Interactions, 7:2, 129-142.

Ocampo F. y Núñez V.M. 2007. Propagación *In vitro* de *Psidium Guajaba* Mediante Organogénesis Directa a Partir de Segmentos Nodales. Revista Corpoica – Ciencia y Tecnología Agropecuaria 8(1), 22-27

Pierik R.L.M. 1990. Rejuvenation and Micropropagation in Progressin Plant Cellular and Molecular Biology. Proc. VIIthInt. Congresson Plant Tissue and Organ Culture. Eds. H.J.J. Nijkamp, L.H.W.Van Der Plas and J. Van Aartrijk. Kluwer Academic Publisher, Amsterdam, Pp 91–101.

Pontikis C. y Melas P. 1986. Micropropagation of *Ficus carica* L. HortScience 21:153–154.

Quijala E., Canal M.J., Meijon M., Rodríguez R., Chávez M., Valledor L., De Feria M. y Barbón R. 2012. Morphological and Physiological Responses of Proliferating Shoots of Teak to Temporary Immersion and BA Treatments. Plant Cell Tiss Organ Cult 109:223–234.

Ravindra B., Malabadi S., Mulgund Gangadhar K. y Nataraja. 2005. Plant Regeneration via Somatic Embryogenesis in *Pinus kesiyana* (*Rolye ex. Gord.*) Influenced by Triacantanol. Acta Physiologiae Plantarum Volume 27, Issue 4, Pp 531-537.

Reyes G. M. 2011. <http://eleconomista.com.mx/columnas/agro-negocios/2010/07/21/higo-alternativas-negocio>

Roca W. y Mroginski L. 1993. Cultivo de Tejidos en la Agricultura Fundamentos y Aplicaciones. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Colombia. Pp 128-140.

Rojas G. S., García L. J. y Alarcón R. M. 2004. Propagación Asexual de Plantas. Editorial Produmedios. Pag.31.

Rost T. L. y Weier T. E. 1979. Botánica: Breve Introducción a la Biología Vegetal. New York: Wiley. Pages 155-170.

Sanchez C. N. y Jiménez M. V. 2010. Técnicas de Conservación *in vitro* Para el Establecimiento de Bancos de Germoplasmas en Cultivos Tropicales. *Agronomía Mesoamericana* 21(1):193-205.

Srivastava L. M. 2002. Plant Growth and Development: Hormones and Environment. Hormones and Environment. Animprint Elsevier Science (USA) Pp. 141-142.

Sabed M. A. y Sabir A. W. 2005. Trace Elements in the Fruit of *Ficus carica* L. and Their Nutritional Importance. *Hamdard Medicus* 48 (4): 113-117.

Salazar D. R. y Hoyos S. R. A. 2007. Multiplicación y Tuberización *in vitro* de Ñame (*Dioscorea alata* L.) En Sistema de Inmersión Temporal. *Rev. Fac. Nal. Agr. Medellín*. Vol.60, No.2.p.3907-3921.

Salazar E., González P. y Hernández C. 2009. Multiplicación *in vitro* de *Agave cocui* Trelease a través de yemas axilares. *Agronomía Trop.* 59(2): 129-135.

Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP) (2007-2013).
<http://www.siap.gob.mx>

Scout Tk. 1984. Hormonal Regulation of Development, 2: The Function of Hormones from the Level of the All to the Whole Plant. *Encyclopedia of Plant Physiology, New Series.* Springer-Verlag, Nueva Cork. V. 10.

Sintes P. 1996. Virtudes Curativas de la Almendra y Otros Frutos Secos: Avellana, Cacahuete, Castaña, Coco, Chufa, Nuez, Oliva, Piñón, Higo y Ciruela. 2 ed. Editorial Española. Barcelona, España. Pp 79-81.

Solomon A., Golubowicz S., Yablowicz Z., Grossman S., Bergman M., Gottlieb H. E., Altman A. y Kerem Z. 2006. Antioxidant Activities and Anthocyanin Content of Fresh Fruits of Common Fig (*Ficus carica* L.). Journal of Agricultural and Food Chemistry 54 (20): 7717-7723.

Tantos Á., Mészáros A., Farkas T., Szalai J. y Horváth G. 2001. Triacontanol Supported Micropropagation of Woody Plants. Plant Cell Reports Volume 20, Issue 1, Pp 16-21.

Torres L. J. 1994. Propagación *in vitro* y Por Estacas de Tallo de Nim (*Azadirachia indica* A. JUSS). Tesis. Universidad Autónoma de Nuevo León. Pp. 65.

Trigiano R. N. y Gray D. J; 2000. Plant Tissue Culture Concepts and Laboratory Exercises. Second Edition Library Of Congress Cataloging -in- Publication Data. Printed in the United States of America. Pp. 81.

Uribe E. M., Ulloa J., Delaveau C., Sáez K., Muñoz F. y Cartes P. 2012. Influencia de las Auxinas Sobre el Enraizamiento *in vitro* de Microtallos de *Nothofagus glauca* (Phil.) Krasser. Gayana Bot. 69(1): 105-112.

Victoriano M. H., Venegas G. J. y Pedraza S. M. E. 2010. Organogénesis *in vitro* de Arándano *Vaccinium corymbosum* L. Tesis. Centro Interdisciplinario de Investigación Para el Desarrollo Integral Regional CIIDIR- Michoacán. Pp. 27-28.

Vilchez J., Ferrer O. y Albany N. 2007. Multiplicación *in vitro* de Zabala en Sistema de Inmersión Temporal. Departamento de Botánica, Facultad de Agronomía. Universidad del Zulia (LUZ). Apartado 15205. Maracaibo ZU. 4005, Venezuela. 24 Supl. 1: 78-82.

Villalobos A. V. M y Thorpe T. A. 1984. Micropropagación: Conceptos, Metodología y Resultados. Unidad de Recursos Fitogenéticos, Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE), Turrialba, Costa Rica Pp 129.

Visser C., Qureshi J. A., Gill R. y Saxena, P. K. 1992 Morphoregulatory Role of Thidiazuron: Substitution of Auxin and Cytokinin Requirement for the Induction of Somatic Embryogenesis in *Ipomoea* Hypocotyls Culture Plant Physiology, 99:1704-1707.

Yakushiji H., Mase N. y Sato Y. 2003. Adventitious Bud Formation and Plant Tree Generation from Leaves of Fig (*Ficus carica* L.): J. Hort. Sci Biotechnol. 78, 874-878.

Zolla C. y Argueta A. 2011. Medicina Tradicional Mexicana UNAM.
(www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx)