

IBCIENCIAS IBCIENCIAS IBCIENCIAS



IBCIENCIAS



www.biociencias.unach.mx/ibciencias



Volumen 7 · Número 1 · Junio · 2024

Revista científica electrónica
Instituto de Biociencias de la Universidad Autónoma de Chiapas, México



Volumen 7 · Número 1 · Junio · 2024

www.biociencias.unach.mx/ibciencias

IBCIENCIAS, volumen 7, número 1, Enero-Junio 2024, es una revista científica digital de publicación semestral editada por la Universidad Autónoma de Chiapas, a través del Instituto de Biociencias, Boulevard Príncipe Akishino sin número, Col. Solidaridad 2000, Tapachula, C.P. 30798, Chiapas, México. Tel. (962) 64 2 7972, www.biociencias.unach.mx/ibciencias, ibciencias.revista@gmail.com. Editor responsable: Dr. Alfredo Vázquez Ovando. Reserva de Derechos al Uso Exclusivo No. 04-2022-070614284600-102, ISSN en trámite, ambos otorgados por el Instituto Nacional del Derecho de Autor. Responsable de la última actualización de este número Dr. Alfredo Vázquez Ovando; Boulevard Príncipe Akishino sin número, Col. Solidaridad 2000, Tapachula, C.P. 30798, Chiapas, México.

CONTENIDO

Junio de 2024 / Vol 7 / Num 1

- 1-9** **Influencia del tiempo de fermentación sobre las características sensoriales del cacao cultivado en Soconusco, Chiapas, México.** Francisco Escobar-Cruz, Alfredo Vázquez-Ovando.
- 10-17** **Optimización del proceso de desinfección in vitro y aclimatación de la caña de azúcar (*Sacharum spp. híbrido*) var. MEX 69-290.** Perla Cristal León-Alfonzo, Leobardo Iracheta-Donjuan, Jorge Luis Méndez-Sántiz, José Luis Solís-Bonilla.
- 18-24** **Evaluación en campo de bioactivadores de resistencia vegetal para el control de la roya del café.** Diego Rosales-Hernández, Lourdes Adriano-Anaya, Miguel Salvador-Figueroa, Gamaliel Velázquez-Ovalle, Benjamín Moreno-Castillo.
- 25-30** **Sistema inmune innato vegetal.** Wendy Ivette Aragón-Gómez, Beatriz Adriana García-Velázquez, Citlali Sarahi Delgado-Guizar.
- 31-36** **Cuantificación de fenoles y flavonoides en callos de *Psychotria erythrocarpa* Schl.** Leonardo Santiago-Segura, Miguel Ángel Ramírez-López, Jazmín Axél De la Cruz-López, Joseph Rodrigo Hernández-Hernández, Juan Antonio Maza-Ruiz, Erick Javier Sarmiento-Gómez, Federico Antonio Gutiérrez-Miceli, José Alfredo Santiz-Gómez.



Volumen 7 · Número 1 · Junio · 2024

www.biociencias.unach.mx/ibciencias



ARTÍCULO CORTO

Influencia del tiempo de fermentación sobre las características sensoriales del cacao cultivado en Soconusco, Chiapas, México

Francisco Escobar-Cruz, Alfredo Vázquez-Ovando*

Instituto de Biociencias, Universidad Autónoma de Chiapas. Tapachula, Chiapas, México.

Resumen

La fermentación es una etapa crucial en el procesamiento de las almendras de cacao (*Theobroma cacao* L.), pues durante ésta, se producen moléculas que otorgan características sensoriales agradables a los granos y a su vez se reducen otras moléculas que son menos deseables. Previamente se han reportado descriptores sensoriales para cacaos cultivados en la región Soconusco del estado de Chiapas México; sin embargo, esos cacaos fueron fermentados durante seis días, sin considerar la variedad. Con el objetivo de monitorear las condiciones de fermentación y establecer los tiempos apropiados para las almendras de las variedades Criollo, Trinitario y Forastero cultivados en esta región, se determinaron durante la fermentación controlada los contenidos de sólidos solubles totales (SST), azúcares reductores (AR), acidez titulable (AT) y pH. Con la intervención de un grupo de panelistas entrenados se establecieron primeramente los descriptores de olor durante nueve días de fermentación y posteriormente en los tiempos más apropiados en función de la variedad; después de fermentar, secar y tostar las almendras. Con los resultados de las características físicoquímicas y sensoriales, se pudo establecer que para la variedad Criollo se requieren 3 días de fermentación mientras que, para las variedades Forastero y Trinitario, 5 días de fermentación es apropiado. Este estudio demuestra que las notas *off-odor* y a moho reportados en otro estudio no son propias de los cacaos y se atribuyen a la sobrefermentación.

Palabras clave:

Chocolate
Criollo
Forastero
Sobrefermentación
Trinitario

Keywords:

Chocolate
Criollo
Forastero
Overfermentation
Trinitario

Influence of fermentation time on the sensory characteristics of cocoa grown in Soconusco, Chiapas, Mexico

Abstract

Fermentation is a crucial stage in the processing of cocoa beans (*Theobroma cacao* L.), since during this, molecules are produced that give pleasant sensory characteristics to the beans and at the same time other molecules that are less desirable are reduced. Sensory descriptors have previously been reported for cocoas grown in the Soconusco region of the state of Chiapas, Mexico. However, those cocoas were fermented for six days, without considering the variety. With the objective of monitoring the fermentation conditions and establishing the appropriate times for the almonds of the Criollo, Trinitario, and Forastero varieties grown in this region, the contents of total soluble solids (TSS), reducing sugars (RS) were determined during controlled fermentation, titratable acidity (TA) and pH. By mean a group of trained panelists, the odor descriptors were first established during nine days of fermentation (overfermentation) and subsequently at the most appropriate times according to the variety; after fermenting, drying and roasting the almonds. With the results of the physicochemical and sensory characteristics, it was established that for the Criollo variety 3 days of fermentation are required while for the Forastero and Trinitario varieties, 5 days of fermentation is appropriate. This study demonstrates that the off-odor and musty notes reported in another study are not typical of cocoas and are attributed to overfermentation.

* Autor para correspondencia:

Instituto de Biociencias,
Universidad Autónoma de
Chiapas.
Boulevard Príncipe Akishino
sin número, Colonia
Solidaridad 2000, C.P.
30798.
Tapachula, Chiapas, México.
Teléfono: + 52 9626427972.
Correo-electrónico:
jose.vazquez@unach.mx

1. Introducción

El cacao (*Theobroma cacao* L.) es una de las 22 especies del género *Theobroma* y es la de mayor importancia comercial y cultural. Esta planta alógama fue domesticada en Mesoamérica, donde existe vasta evidencia irrefutable de su uso en la alimentación desde hace más de 4000 años (Cornejo et al., 2018). En la región Soconusco, al sur del estado de Chiapas, México, actualmente existen plantaciones de cacao de las cuales se obtienen granos de cacao que poseen características sensoriales (sabor, aroma, textura) de interés en el mercado nacional e incluso internacional (Vázquez-Ovando et al., 2015b). Estas características sensoriales que tienen impacto directo en la calidad del chocolate que se elabora de las semillas, se deben entre otros a, factores genéticos, ambientales y de procesamiento (Jaimez et al., 2022).

El genotipo es el factor de mayor influencia en la calidad e intensidad del sabor a chocolate. Se ha demostrado que la variedad de cacao determina en gran medida el tipo y la cantidad de precursores así como la actividad enzimática que contribuyen a la formación del sabor (Santander-Muñoz et al., 2020). Además del genotipo, la calidad del cacao depende del procesamiento postcosecha al cual los granos son sometidos. Procesos como la fermentación, secado y tostado son de fundamental importancia para la obtención de un chocolate de calidad (Akoa et al., 2023).

La fermentación es, sin duda, un procedimiento indispensable para el desarrollo apropiado de los precursores del aroma de chocolate ya que, durante esta etapa, la pulpa que envuelve las semillas es metabolizada por microorganismos que producen compuestos como etanol, ácido acético y ácido láctico formados en primera instancia, los cuales posteriormente son absorbidos por los cotiledones, promoviendo varios cambios fisicoquímicos, que tendrán notable influencia en el sabor final (Streule et al., 2022). Se ha reportado que cada genotipo requiere de tiempos de fermentación diferentes para expresar mejor la calidad del sabor y aroma. De lo anterior, se sabe que los frutos de la variedad Forastero requieren un período de fermentación de cinco a ocho días para el desarrollo de sabor, mientras que el cacao Criollo requiere de dos a tres días (Motamayor et al., 2013).

Vázquez-Ovando et al. (2015a) realizaron la caracterización sensorial de las semillas de cacao obtenidas de plantas sembradas en la región Soconusco, Chiapas, México. Los autores reportan la presencia de notas particulares de olor (especias, nueces, avellanas), pero además se reporta la presencia de aromas no deseables (*off-odor*, mohoso). Sin embargo, en aquel estudio se empleó el mismo tiempo de fermentación (6 días) sin distinguir el origen varietal de las semillas. Se ha reportado además que la composición genética de los cacaos de esta región del mundo está diferenciada (Vázquez-Ovando et al., 2014), por lo que los resultados del citado trabajo no dan evidencia concluyente acerca de si los aromas reportados son respuesta del genotipo (variedad) o solamente son el resultado de la fermentación no

diferenciada. Por lo anterior, el objetivo de este estudio fue establecer los tiempos de fermentación apropiados, así como los perfiles sensoriales de las variedades Trinitario, Forastero y Criollo de *Theobroma cacao* L. cultivados en el sur de México.

2. Materiales y Métodos

2.1. Frutos de cacao

Se muestrearon a partir de parcelas productoras, frutos de cacao de las variedades Criollo, Forastero y Trinitario. Se consideraron las características morfológicas visuales de los frutos descritas por Engels (Vázquez-Ovando et al., 2014), así como la calidad sensorial declarada por los productores para diferenciar las variedades. Las parcelas de donde se obtuvieron los frutos se localizan en los municipios de Tapachula, Cacahoatán y Frontera Hidalgo del estado de Chiapas, al sureste de México.

2.2. Procesamiento del fruto

Después de cosechadas, las mazorcas de cacao se trasladaron inmediatamente al laboratorio y se lavaron con agua potable y etanol al 70%. Después de ser secadas, cada mazorca se diseccionó por la mitad con ayuda de una navaja estéril, se extrajeron las semillas y se separaron de la placenta para posteriormente introducir las semillas con pulpa en bolsas de polipropileno con cierre hermético para su uso inmediato (Vázquez-Ovando et al., 2015b).

2.3. Establecimiento del tiempo de fermentación de las semillas

Esta etapa tuvo como propósito establecer los tiempos óptimos para la fermentación espontánea de cada variedad de semillas de cacao. Para esto, se prepararon bolsas con cierre hermético conteniendo 45-60 g de semillas de una de las tres variedades, las cuales se colocaron en una estufa a 35 °C y se dejaron fermentar espontáneamente hasta la sobrefermentación (Seguine et al., 2014). Por cada uno de los tres tratamientos (variedad de cacao) se establecieron 10 bolsas (repeticiones), mismas que fueron codificadas y, a partir del día del establecimiento (día 0), de manera completamente aleatorizada cada 24 h se muestreó una bolsa por tratamiento para realizar las mediciones durante 9 días.

2.4. Monitoreo de la fermentación

Por triplicado se midieron el pH, contenido de azúcares reductores (AR), la acidez titulable (AT) y el contenido de sólidos solubles totales (SST) del mucílago de la masa de fermentación. El pH se determinó siguiendo el método potenciométrico 970.21 de la AOAC (2010). Se colocó 1 g de mucílago en un tubo de centrifuga y se centrifugó a 7000 g por 5 min. Se tomó el sobrenadante y se registró el pH con ayuda de potenciómetro Hanna modelo HI98130. Para el contenido de AR, 1 g de mucílago fue suspendido en 50 mL de agua destilada, posteriormente 1 mL de la suspensión fue centrifugado a 7000 g por 5 min. Del sobrenadante se tomaron 100 µL para determinar el contenido de AR por la

técnica del DNS (Miller, 1959). La AT se determinó siguiendo el método 942.15 de la AOAC (2010) y el contenido se expresó como ácido acético usando el factor 0.06. Para esto, 1 g del mucílago fue diluido a 25 mL con agua destilada y titulado con NaOH 0.1 M hasta el cambio de coloración usando 0.3 mL de fenolftaleína como indicador. El contenido de SST se determinó colocando unas gotas del mucílago sobre el prisma de un refractómetro digital PAL-1 Atago 3810.

De manera paralela se realizaron pruebas olfativas a las masas de fermentación recurriendo a 5 panelistas entrenados. El entrenamiento de los panelistas estuvo basado en el método de análisis descriptivo cuantitativo (QDA) mediante pruebas de asociación y pruebas triangulares (Vázquez-Ovando et al., 2015a). Previo a la evaluación sensorial, los panelistas se reunieron durante 6 sesiones de una hora para familiarizarse con la materia a evaluar y generar los descriptores de cacao. Durante la evaluación sensorial, los panelistas abrieron las bolsas conteniendo las masas de fermentación, percibieron los aromas y anotaron por consenso los descriptores presentes en cada una de las muestras. Se consideró que un descriptor estaba presente si 4 de los 5 panelistas lo percibió.

Considerando las variables fisicoquímicas y los aromas presentes en las muestras de cacao se estableció el tiempo cuando la fermentación estaba completada.

2.5. Fermentación diferenciada

La segunda etapa de fermentación consistió en fermentar un mayor volumen de semillas de cacao (300 g) deteniendo la fermentación en el tiempo apropiado para cada variedad, de acuerdo con los resultados de la primera etapa del experimento. Para esto, se obtuvieron nuevamente frutos del mismo sitio de recolección, se extrajeron las semillas de los frutos y se colocaron por cada variedad 300 g de semillas en 3 bolsas de polipropileno con cierre hermético (100 g por cada bolsa) para ser fermentadas bajo las mismas condiciones de la primera etapa (sección 2.3).

Una vez completado el tiempo de fermentación para cada variedad, las semillas fueron extraídas de las bolsas y se colocaron directamente al sol, de acuerdo con el método tradicional de secado, volteando los granos una vez al día para garantizar un secado homogéneo. Las semillas se secaron durante 3 días. Posteriormente se guardaron en bolsa de polipropileno con cierre hermético hasta su posterior tostado. El tostado de las semillas se realizó a 140 °C durante 15 min en recipiente de aluminio moviendo constantemente los granos de acuerdo con lo sugerido por Vázquez-Ovando et al. (2015a), posteriormente fueron descascarilladas y colocadas en recipientes de polipropileno.

Las semillas recién tostadas fueron analizadas sensorialmente por el panel de jueces entrenados mediante una prueba de detección de aromas. Se exploró la presencia de los descriptores generados para estos cacaos en el estudio de Vázquez-Ovando et al. (2015a), así como aquellos derivados de la primera etapa del presente estudio (Cuadro 1).

2.6. Análisis de datos

Todas las determinaciones analíticas se realizaron por triplicado, los datos obtenidos se sometieron a análisis de varianza y posterior comparación de medias por el método de Duncan ($P < 0.05$) usando el software Statgraphics v. Centurion.

3. Resultados y Discusión

En la Figura 1 se muestran los resultados del comportamiento del pH del mucílago durante nueve días de fermentación de las tres variedades de cacao analizadas. Al inicio de la fermentación, el pH de las variedades Forastero y Trinitario fue de 2.67 y 2.97, respectivamente y al finalizar aumentó a 3.31 y 3.35 mientras que la variedad Criollo tuvo un pH inicial superior (3.81) al de las otras dos variedades y éste disminuyó ligeramente a 3.66 al finalizar la fermentación.

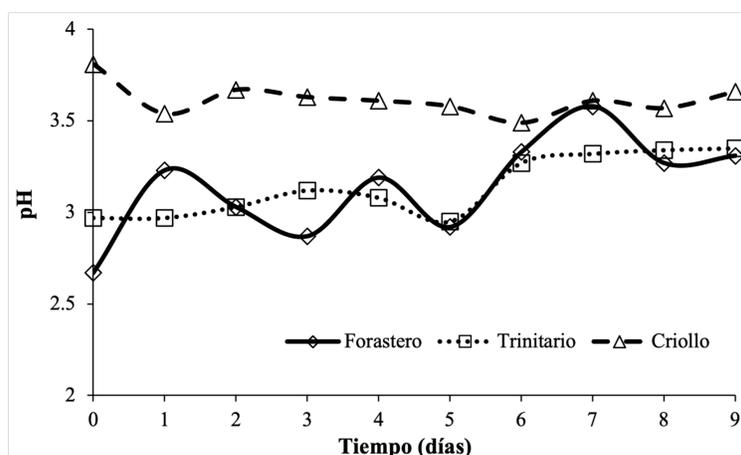


Figura 1. Comportamiento del pH de la pulpa de tres variedades de cacao durante la fermentación espontánea.

Los valores iniciales de las pulpas de fermentación de los cacao aquí analizados son inferiores a cacao de otras regiones del mundo, donde se reportan valores iniciales de alrededor de 4 para híbridos de cacao de Ghana (Afoakwa et al., 2013). Se ha reportado que el pH inicial de la pulpa + testa es importante durante la fermentación, porque favorece inicialmente el desarrollo de las levaduras (pH 3.5-4.0), y posteriormente la sucesión y el desarrollo de las bacterias lácticas y acéticas al aumentar de 4.0 a 4.5 (Rodríguez-Campos et al., 2011). Del mismo modo, se ha establecido que los granos de cacao con pH elevado (5.5-5.8) se consideran fermentados incompletamente y los de menor pH (4.75-5.19), se consideran bien fermentados (Afoakwa et al., 2008). La AT de la pulpa expresada como contenido (%) de ácido acético de las tres variedades de cacao se muestra en la Figura 2. Como ya antes se ha reportado (Velásquez-Reyes et al., 2013), el contenido inicial de AT de la pulpa de la variedad Criollo es menor que el de las otras dos variedades. Para las variedades Forastero y Trinitario, el contenido se incrementó

sustancialmente a medida que avanzó la fermentación, para la variedad Forastero, la AT inició en 0.451% y finalizó en 0.902%, mientras que, para la variedad Trinitario, pasó de 0.508% a 0.846%, al final de la fermentación. Sin embargo, para la variedad Criollo, la AT presentó un comportamiento contrario al de las otras dos variedades, ya que, al inicio de la fermentación, la AT fue de 0.283% y al finalizar la fermentación la acidez descendió a 0.17%. Este comportamiento se puede atribuir a que posiblemente los ácidos orgánicos generados durante la fermentación fueron absorbidos rápidamente por los cotiledones, disminuyendo la concentración de estos en la pulpa o, posiblemente la generación de estos ácidos fue escasa y por ello, tampoco el pH descendió (Figura 1) como sí ocurrió con las otras dos variedades. Estos resultados son ligeramente más bajos en comparación a otros estudios donde se reportan valores de 1 y 2 % en promedio (De Souza et al., 2018), lo cual puede deberse a las condiciones edafoclimáticas de la región.

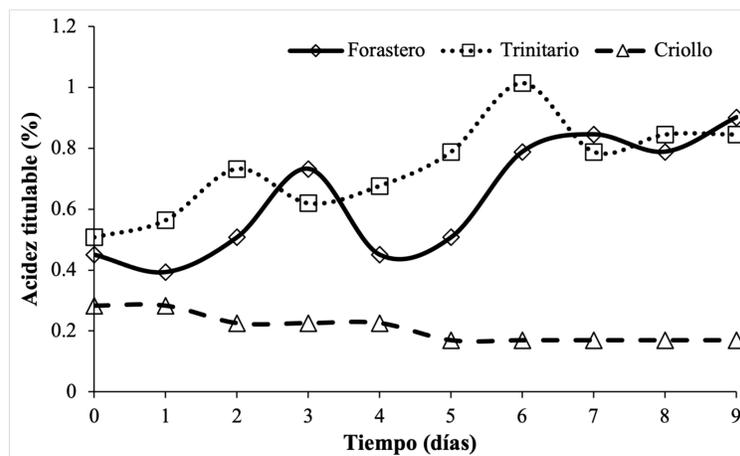


Figura 2. Comportamiento de la acidez titulable de la pulpa de tres variedades de cacao durante la fermentación espontánea.

Los valores iniciales fueron de SST fueron de 14.1, 13.2 y 14.1 °Brix para la variedad Forastero, Trinitario y Criollo, respectivamente (Figura 3). A pesar de la similitud en el

contenido de SST, durante los primeros tres días de fermentación se puede observar mayor disminución para la variedad Criollo.

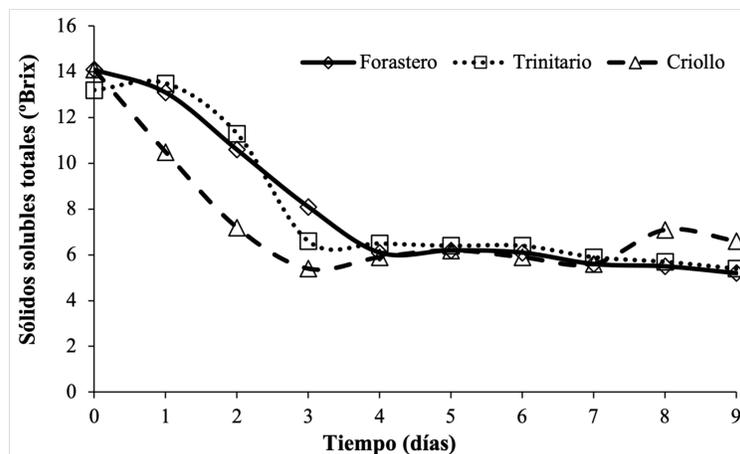


Figura 3. Contenido de sólidos solubles totales de la pulpa de tres variedades de cacao durante la fermentación espontánea.

Este comportamiento puede estar relacionado con la actividad metabólica de los microorganismos presentes en el proceso y posiblemente, con la naturaleza de los azúcares disponibles en la pulpa, debido a que las levaduras metabolizan de manera diferente los distintos azúcares para producir etanol y agua en el proceso. Como consecuencia de este proceso, la pulpa comienza a degradarse y algunos SST son absorbidos por los cotiledones (Streule et al., 2022). Es sabido que la composición química de las semillas de las distintas variedades es también diferente (Pérez et al., 2021), lo que puede repercutir en la estructura de los cotiledones y modificar la absorción de los SST de manera diferenciada, afectando de manera indirecta el contenido de SST en la pulpa. El comportamiento del contenido de los SST para las variedades Forastero y Trinitario fue similar durante los 9 días.

En la Figura 4 se observa la disminución del contenido de AR, siendo más pronunciado en la variedad Criollo, en la cual existe un notable descenso en los primeros dos días de fermentación en congruencia con lo observado en el contenido de SST (Figura 3). Portillo et al. (2007) sugieren

que este descenso es atribuido a la emisión de exudado y a la fermentación alcohólica. Los microorganismos con mayor abundancia en la primera etapa de la fermentación son las levaduras, las cuales metabolizan los azúcares presentes en el medio, produciendo alcohol el cual es principalmente absorbido por los cotiledones. Este comportamiento es totalmente atribuible al genotipo, y coincide parcialmente con los reportes previos donde se establece que los tiempos de fermentación son de 2 a 3 días para Criollo, de 5 a 7 días para Forastero y de 6 a 8 días para Trinitario (Castro-Alayo et al., 2019).

Este resultado y los valores encontrados para la acidez y pH estarían comprobando la fuerte actividad de las levaduras, así como una menor aportación de las bacterias implicadas en la biosíntesis de ácidos orgánicos (principalmente las del grupo del ácido acético y en menor medida del ácido láctico). Este comportamiento ya antes ha sido reportado (De Vuyst y Leroy, 2020; Zhao y Fleet, 2014). Los valores de AT también dan indicio de este comportamiento y, aunque los panelistas sensoriales pudieron detectar olores a ácido acético (Cuadro 1), ellos no determinaron la magnitud del olor.

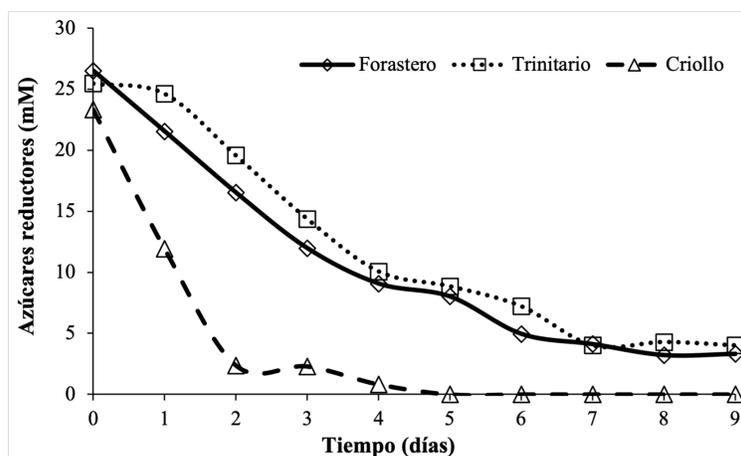


Figura 4. Comportamiento de los azúcares reductores en la pulpa durante la fermentación espontánea de tres variedades de cacao.

En el Cuadro 1 se presentan las notas de olor que se detectaron durante las pruebas sensoriales y a través del proceso, hasta la sobrefermentación (9 días). Estas notas han sido asociadas por varios autores (Aculey et al., 2010; Frauendorfer y Schieberle 2008; Rodríguez-Campos et al., 2011) como las responsables de producir tanto aromas deseados como no deseados en las semillas de cacao fermentadas.

En el día cero de fermentación las notas percibidas por los panelistas entrenados tenían la característica de producir olores frutales y dulces. Para los olores frutales, los panelistas mencionaron gran diversidad de frutos tropicales (guanábana, banano, chicozapote, etc.), los cuales podrían ser consensuados como olor a frutas tropicales según se reporta en otros estudios. En el día 1 de fermentación se percibieron notas de aromas a “productos alcohólicos” en los cacaos de las variedades Criollo y Trinitario; lo anterior puede ser el

resultado de los procesos metabólicos de los microorganismos presentes; algo que no ocurrió para el cacao Forastero.

La diversidad de notas frutales fue disminuyendo gradualmente en los días siguientes, pero su presencia no desapareció por completo. A partir del día dos de fermentación, las notas ácidas comenzaron a percibirse en los tratamientos de la variedad Criollo; mientras que para las variedades Trinitario y Forastero, estas notas se presentaron en los días 4 y 5, respectivamente. Durante los días restantes de la fermentación, la percepción de estas notas fue constante. Algo muy notorio de los olores descritos fue la cantidad de descriptores, ya que para la variedad Criollo se obtuvieron siempre la mayor cantidad de notas, lo cual está relacionado de manera directa con mayor número de compuestos volátiles responsables de estos aromas y que han sido descritos previamente (Rodríguez-Campos et al., 2011).

Cuadro 1. Olores detectados por panelistas entrenados durante la fermentación controlada de tres variedades de cacao.

Tiempo de fermentación (días)	Variedad de cacao		
	Criollo	Trinitario	Forastero
0	Azúcar Guanábana Banano Chicozapote Miel	Azúcar Guanábana Kiwi Flores	Azúcar Banano Papausa
1	Alcohol Levadura Flores Miel Curtido de nance Guanábana Chicozapote Piña	Azúcar Alcohol Fermentado Miel Chicozapote Aguamiel	Banano Piña Miel Dulce Flores
2	Ácido acético Miel Fermentado Azúcar fermentada Taberna	Alcohol Azúcar Fermentado Flores Aguamiel	Alcohol Yogurt Fruta seca Flores
3	Alcohol Tepache Ácido acético Taberna Levadura	Taberna Fermentado	Alcohol Fermentado Levadura Vino
4	Alcohol Tepache Ácido acético Fermentado Flores	Alcohol Tepache Taberna Azúcar fermentada Ácido acético	Tepache Taberna Fermentado
5	Ácido acético Alcohol Fermentado	Cacao tostado Tepache Ácido acético Ciruela Miel	Ácido acético Alcohol Tepache Fermentado Café tostado
6	Azúcar fermentada Miel Levadura Fermentado Tepache	Maíz tostado Ácido acético Chocolate	Ácido acético Alcohol Tepache Café tostado Chocolate
7	Tepache Ácido acético Fermentado	Ácido acético Chocolate	Ácido acético Alcohol Cacao tostado
8	Ácido acético Flores Alcohol Tepache	Ácido acético Alcohol	Rancio Ácido acético
9	Ácido acético Cerveza rancia	Humedad Ácido acético Áspero	Moho Humedad

La presencia de las notas de ácido acético es un indicativo de la presencia y actividad de bacterias aerobias, principalmente bacterias ácido acéticas (BAA), mismas que metabolizan el alcohol y otros sustratos presentes en la masa de fermentación para producir ácido acético que ingresa a los cotiledones y disminuye el amargor y la astringencia (Soumahoro et al., 2020). La mayor abundancia de las BAA

es también un indicio del final del proceso de fermentación (De Vuyst y Leroy, 2020) y se ha reportado que esto puede ocurrir desde las 48 y hasta las 96 h de fermentación espontánea (Pacheco-Montealegre et al., 2020). A pesar de que en el cacao Criollo se detectó desde el día 2, la percepción de éstas en alta intensidad fue descrita por los panelistas para los días 6 para cacao Criollo y el día 7 para

las variedades Trinitario y Forastero. Este resultado en conjunto con notas percibidas como desagradables (humedad, rancidez, moho) están asociadas a la sobre-fermentación de las semillas (Vázquez-Ovando et al., 2015a). Después del día 7 de fermentación las notas desagradables se hicieron presentes. Lo anterior, aunado a los demás parámetros evaluados, permiten establecer los tiempos óptimos de fermentación de cada una de las variedades aquí evaluadas.

En cacao Criollo se observa que los descensos en el contenido de SST, AR y AT suceden en el transcurso del día 2 y 3, días en los cuales se percibieron las notas ácidas para esta variedad, manteniéndose estable a partir del día 4. Por lo anterior y tomando en cuenta también los olores descritos, se puede establecer que el día 3 se completa la fermentación para los cacaos de la variedad Criollo que posean las condiciones iniciales aquí descritas y bajo el procedimiento aquí sugerido.

Para los cacaos Forastero y Trinitario, los valores en el contenido de AR tienden a ser estacionarios en los días 6 y 7 respectivamente, los valores de SST presentan esta tendencia a partir del día 4 y los valores de acidez presentan un comportamiento más estable en los días 6 para cacao Forastero y en el día 7 para cacao Trinitario, no obstante, las notas ácidas fueron percibidas por los panelistas a partir del día 4 para cacao Trinitario y a partir del día 5 para cacao Forastero. Analizando los datos obtenidos para estas variedades y considerando los juicios emitidos por los panelistas se puede inferir que la presencia de notas ácidas en estos días no está asociada con sobre-fermentación de las semillas, debido a que los panelistas describieron las notas ácidas percibidas durante estos días como de baja intensidad. Siguiendo el mismo criterio que para la variedad Criollo, se propone que los tiempos de fermentación apropiados para las variedades Forastero y Trinitario son de 5 días.

En el Cuadro 2 se muestran las notas sensoriales obtenidas de las semillas fermentadas y tostadas de las tres variedades fermentadas a distintos tiempos de fermentación (3 días para Criollo y 5 días para Trinitario y Forastero). Lo anterior se realizó para investigar todos los descriptores posibles relacionados con las muestras del sur de México y dado que los tiempos de fermentación son los apropiados para cada variedad, los aquí descritos representan la descripción completa de los cacaos de Soconusco México. Previamente se ha reportado descriptores genéricos para todos los cacaos del mundo (olor ácido y a chocolate, etc.) pero también algunas muy poco frecuentes como especias, avellanas con muestras similares a las empleadas en el presente estudio (Vázquez-Ovando et al., 2015a).

Los resultados revelaron un total de 10 notas de olor agradables y 3 desagradables, la presencia de las notas “desagradables” está dada por moléculas cuya presencia no es posible eliminar sino solamente controlar. Durante el tostado aparecen moléculas relacionadas con olor a humo dado por fenoles (Rodríguez-Campos et al., 2012) o furfural (Escobar et al., 2021) que explican la presencia del olor a

quemado. Los olores ácido y alcohol son hasta cierto punto importantes en las semillas de cacao, pues denotan que las semillas fueron fermentadas. Las notas percibidas por los panelistas como agradables, pueden ser el resultado de un adecuado procesamiento de las semillas, las cuales se desarrollan en la primera etapa del procesamiento y otras que se generan durante las siguientes etapas (secado y tostado). Marseglia et al. (2020) mencionan que la temperatura adecuada para tostar los granos de cacao es a 140 °C debido a que, al interpretar el comportamiento de los diferentes perfiles sensoriales, destacan una predominancia elevada del sabor/aroma a chocolate, en conjunto con los atributos aromáticos floral y frutal a esa temperatura de tostado, sin embargo, en ese estudio realizado, el tiempo de tostado fue mayor al que se empleó en el presente estudio, lo cual estaría revelando que los cacaos analizados requieren menor tiempo de tostado o que los recipientes empleados para ese propósito tienen un efecto marcado.

Cuadro 2. Descriptores sensoriales encontrados en semillas fermentadas y tostadas de cacao de las variedades Criollo, Trinitario y Forastero.

Percepción	Olor	Sabor
Agradable	Flores	Frutos secos
	Miel	Chocolate
	Canela	Café
	Frutos secos	Maíz tostado
	Leche	Miel
	Café	
	Chocolate	
	Pan dulce	
	Maíz tostado	
	Chocolate	
Desagradable	Ácido	Amargo
	Quemado	Quemado
	Alcohol	Especias
		Verde
		Astringente

De igual manera, se detectó en total, 10 sabores, de los cuales, 5 fueron percibidos como agradables y 5 como desagradables. La presencia de sabor amargo, verde y astringente está relacionada con la presencia de alcaloides y polifenoles, los cuales se sabe se encuentran en alta concentración en las semillas de cacao (Guzmán-Penella et al., 2023). El sabor a especias percibido se ha relacionado con la presencia de 2-fenil-etanol en almendras de cacao y antes ya se reportó en las mismas muestras (Vázquez-Ovando et al., 2015a). Otras moléculas pungentes como el pentanol pueden también estar relacionados con este descriptor (Escobar et al., 2021).

Contrario con los reportes de Vázquez-Ovando et al. (2015a) no se encontraron los descriptores a moho y “*off-odor*” lo cual revela que tal como se planteó en la hipótesis de este estudio, que esos descriptores en aquel estudio fueron el resultado del proceso prolongado de fermentación dentro de la mazorca (6 días), lo cual afectó el proceso sobre todo para

los cacos más Criollos los cuales demostramos en este estudio que requieren de solamente 3 días de fermentación.

4. Conclusión

Con base en las pruebas sensoriales y los parámetros analizados, se establecieron los tiempos de fermentación para los cacaos del sur de México de las tres variedades morfogeográficas. Para la variedad Criollo se estableció 3 días de fermentación y está asociado con valores en la pulpa de pH= 3.7, AT= 0.226%, AR= 2.3 mM y 5.4 °Brix. Para la variedad Forastero después de 5 días de fermentación se tienen valores de pH= 3, AT= 0.508%, AR= 8.02 mM y 6 °Brix. Para la variedad Trinitario, también se establecieron 5 días de fermentación con valores de pH= 3, AT= 0.789%, AR= 8.86 y 6.4 °Brix.

Estos tiempos de fermentación se comprueban con la presencia de notas características y asociadas con aromas y sabores agradables de las semillas de cacao tostadas; así como con la ausencia de notas relacionadas con procesos de sobrefermentación.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses

Referencias

AOAC. 2010. Official methods of analysis of AOAC International. Horwitz W, Latimer G. (eds). 18th edition, Rev. 3. AOAC International, Gaithersburg, MD, USA.

Aculey PC, Snitkjaer P, Owusu M, Bassompierre M, Takrama J, Nørgaard L, Petersen MA, Nielsen DS. 2010. Ghanaian cocoa bean fermentation characterized by spectroscopic and chromatographic methods and chemometrics. *Journal of Food Science* 75(6): S300-S307.

Afoakwa EO, Kongor JE, Takrama JF, Budu AS. 2013. Changes in acidification, sugars and mineral composition of cocoa pulp during fermentation of pulp pre-conditioned cocoa (*Theobroma cacao*) beans. *International Food Research Journal* 20(3): 1215-1222.

Afoakwa EO, Paterson A, Fowler M, Ryan A. 2008. Flavor formation and character in cocoa and chocolate: A critical review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 48(9): 840-857.

Akoa SP, Boulanger R, Onomo PE, Lebrun M, Ondobo ML, Lahon MC, Ntyam-Mendo SA, Niemenak N, Djocgoue PF. 2023. Sugar profile and volatile aroma composition in fermented dried beans and roasted nibs from six controlled pollinated Cameroonian fine-flavor cocoa (*Theobroma cacao* L.) hybrids. *Food Bioscience* 53: 102603.

Castro-Alayo EM, Idrogo-Vásquez G, Siche R, Cardenas-Toro FP. 2019. Formation of aromatic compounds precursors during fermentation of Criollo and Forastero cocoa. *Heliyon* 5(1): e01157.

Cornejo OE, Yee MC, Dominguez V, Andrews M, Sockell A, Strandberg E, Livingstone III D, Stack C, Romero A, Umaharan P, Royaert S, Tawari NR, Ng P, Gutierrez O, Phillips W, Mockaitis K, Bustamante CD, Motamayor, J. C. (2018). Population genomic analyses of the chocolate tree,

Theobroma cacao L., provide insights into its domestication process. *Communications Biology* 1(1): 167.

De Souza PA, Moreira LF, Sarmiento DH, da Costa FB. 2018. Cacao—*Theobroma cacao*. En: Rodrigues S, de Oliveira-Silva E, Sousa de Brito E (eds). *Exotic fruits*. Academic Press. Pp. 69-76.

De Vuyst L, Leroy F. 2020. Functional role of yeasts, lactic acid bacteria and acetic acid bacteria in cocoa fermentation processes. *FEMS Microbiology Reviews* 44(4): 432-453.

Escobar S, Santander M, Zuluaga M, Chacón I, Rodríguez J, Vaillant F. 2021. Fine cocoa beans production: Tracking aroma precursors through a comprehensive analysis of flavor attributes formation. *Food Chemistry* 365: 130627.

Fraudendorfer F, Schieberle P. 2008. Changes in key aroma compounds of Criollo cocoa beans during roasting. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56(21): 10244-10251.

Guzmán-Penella S, Boulanger R, Maraval I, Kopp G, Corno M, Fontez B, Fontana A. 2023. Link between flavor perception and volatile compound composition of dark chocolates derived from Trinitario cocoa beans from Dominican Republic. *Molecules* 28(9): 3805.

Jaimez RE, Barragan L, Fernández-Niño M, Wessjohann LA, Cedeño-García G, Sotomayor Cantos I, Arteaga F. 2022. *Theobroma cacao* L. cultivar CCN 51: a comprehensive review on origin, genetics, sensory properties, production dynamics, and physiological aspects. *PeerJ* 10: e12676.

Marseglia A, Musci M, Rinaldi M, Palla G, Caligiani A. 2020. Volatile fingerprint of unroasted and roasted cocoa beans (*Theobroma cacao* L.) from different geographical origins. *Food Research International* 132: 109101.

Miller GL. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry* 31: 426-428.

Motamayor JC, Mockaitis K, Schmutz J, Haiminen N, Livingstone III D, Cornejo O, Findley SD, Zheng P, Utró F, Royaert S, Sasaki C, Jenkins J, Podicheti R, Zhao M, Scheffler BE, Stack JC, Feltus FA, Mustiga GM, Amores F, Phillips W, Marelli JP, May GD, Shapiro H, Ma J, Bustamante CD, Schnell RJ, Main D, Gilbert D, Parida L, Kuhn DN. 2013. The genome sequence of the most widely cultivated cacao type and its use to identify candidate genes regulating pod color. *Genome Biology* 14(6): r53.

Pacheco-Montealegre ME, Dávila-Mora LL, Botero-Rute LM, Reyes A, Caro-Quintero A. 2020. Fine resolution analysis of microbial communities provides insights into the variability of cocoa bean fermentation. *Frontiers in Microbiology* 11: 650.

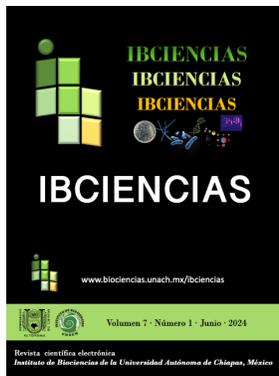
Perez M, Lopez-Yerena A, Vallverdú-Queralt A. 2021. Traceability, authenticity and sustainability of cocoa and chocolate products: A challenge for the chocolate industry. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 62(2): 475-489.

Portillo E, Graziani De Farinas L, Betancourt E. 2007. Análisis químico del cacao criollo porcelana (*Theobroma cacao* L.) en el sur del lago de Maracaibo. *Revista de la Facultad de Agronomía* 24: 522-546.

Rodríguez-Campos J, Escalona-Buendía HB, Contreras-Ramos SM, Orozco-Avila I, Jaramillo-Flores E, Lugo-Cervantes E. 2012. Effect of fermentation time and drying temperature on volatile compounds in cocoa. *Food Chemistry* 132(1): 277-288.

Rodríguez-Campos J, Escalona-Buendía HB, Orozco-Avila I,

- Lugo-Cervantes E, Jaramillo-Flores ME. 2011. Dynamics of volatile and non-volatile compounds in cocoa (*Theobroma cacao* L.) during fermentation and drying processes using principal components analysis. *Food Research International* 44(1): 250-258.
- Santander-Muñoz M, Rodríguez-Cortina J, Vaillant FE, Escobar-Parra S. 2020. An overview of the physical and biochemical transformation of cocoa seeds to beans and to chocolate: Flavor formation. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 60(10): 1593-1613.
- Sequine E, Mills D, Marelli JP, Motamayor-Arias JC, Coelho IDS. 2014. U.S. Patent Application No. 14/238,373.
- Soumahoro S, Ouattara HG, Droux M, Nasser W, Niamke SL, Reverchon S. 2020. Acetic acid bacteria (AAB) involved in cocoa fermentation from Ivory Coast: species diversity and performance in acetic acid production. *Journal of Food Science and Technology* 57: 1904-1916.
- Streule S, Leischfeld SF, Galler M, Schwenninger SM. 2022. Monitoring of cocoa post-harvest process practices on a small-farm level at five locations in Ecuador. *Heliyon* 8(6): e09628.
- Vázquez-Ovando A, Chacón-Martínez L, Betancur-Ancona D, Escalona-Buendía H, Salvador-Figueroa M. 2015a. Sensory descriptors of cocoa beans from cultivated trees of Soconusco, Chiapas, Mexico. *Food Science and Technology* 35(2): 285-290.
- Vázquez-Ovando A, Molina-Freaner F, Nuñez-Farfán J, Betancur-Ancona D, Salvador-Figueroa M. 2015b. Classification of cacao beans (*Theobroma cacao* L.) of southern Mexico based on chemometric analysis with multivariate approach. *European Food Research and Technology* 240: 1117-1128.
- Vázquez-Ovando JA, Molina-Freaner F, Nuñez-Farfán J, Ovando-Medina I, Salvador-Figueroa M. 2014. Genetic identification of *Theobroma cacao* L. trees with high Criollo ancestry in Soconusco, Chiapas, Mexico. *Genetics and Molecular Research* 13(4): 10404-10414.
- Velásquez-Reyes D, Rodríguez-Campos J, Avendaño-Arrazate C, Gschaedler A, Alcázar-Valle M, Lugo-Cervantes E. 2023. Forastero and Criollo cocoa beans, differences on the profile of volatile and non-volatile compounds in the process from fermentation to liquor. *Heliyon* 9(4): e15129.
- Zhao J, Fleet G. 2014. Yeasts are essential for cocoa bean fermentation. *International Journal of Food Microbiology* 174: 72-87.



Optimización del proceso de desinfección *in vitro* y aclimatación de la caña de azúcar (*Sacharum* spp. híbrido) var. MEX 69-290

Perla Cristal León-Alfonzo^{1,2}, Leobardo Iracheta-Donjuan^{1*}, Jorge Luis Méndez-Sántiz³, José Luis Solís-Bonilla¹

¹Campo Experimental Rosario Izapa del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Tuxtla Chico, Chiapas, México.

²Universidad Tecnológica de la Selva. Ocosingo, Chiapas, México.

³Laboratorio de Cultivo de Tejidos del Centro de Investigación y Desarrollo de la Caña de Azúcar, A. C. (CIDCA, A.C.). Tuxtla Chico, Chiapas, México.

Resumen

Las etapas de desinfección de ápices de caña de azúcar y de aclimatación, no son siempre efectivas. El éxito de la desinfección depende de la variedad, la carga de microorganismos endófitos y la sensibilidad a los desinfectantes, que podrían causar oxidación de tejidos. Plántulas enraizadas *in vitro* se usan regularmente para la aclimatación, en donde se generan hojas y raíces poco funcionales. Por tal motivo, el objetivo de este trabajo fue optimizar la desinfección de ápices de caña de azúcar durante su establecimiento *in vitro* y lograr la aclimatación de brotes sin raíz, directamente de la fase de multiplicación. En la etapa de desinfección se utilizaron ápices de brotes de la variedad MEX 69-290, donde se probaron 12 tratamientos producto de la combinación de tres métodos de desinfección (con NaClO, NPsAg, gentamicina), la presencia o ausencia de agua de coco y dos concentraciones de fitoreguladores. Mientras que en la etapa de aclimatación se utilizaron brotes sin raíz generados directamente de la etapa de multiplicación, los cuales fueron sometidos a la interacción de la aplicación o no de ácido indolbutírico en la base de los brotes, la presencia o ausencia de micorriza en el sustrato y la aplicación o no de 24-epibrasinólida. En la desinfección de ápices de caña de azúcar, la adición de gentamicina al medio mejoró la desinfección solo durante los primeros 14 días. Sin embargo, el único tratamiento con los mayores niveles de asepsia, supervivencia y respuesta morfogénica, a los 14 y 63 días, fue el NaClO al 3% por 15 min + NaClO al 0.06% por 5 min y con BAP (1.68 mg L⁻¹) + AIA (0.175 mg L⁻¹) en el medio de cultivo. Fue posible la aclimatación del 75% de los brotes, provenientes directamente de la etapa de multiplicación, mediante la adición a la base de los brotes la auxina AIB, 1.5 g de micorriza al hoyo de siembra y dos aplicaciones en hojas de 1 mL de 0.0096 mg L⁻¹ de 24-epibrasinólida.

Palabras clave:

Aclimatación
Epibrasinólida
Gentamicina

Rhizophagus irregularis

Keywords:

Acclimatization
Epibrassinolide
Gentamicin

Rhizophagus irregularis

Optimization of *in vitro* disinfection process and acclimatization of sugarcane (*Saccharum* spp. hybrid) var. MEX 69-290

Abstract

The phase of disinfection of sugar cane apices and the acclimatization phase are not always effective. The success of disinfection depends on the variety, the load of endophyte microorganisms, and the sensitivity to disinfectants, which cause tissue oxidation. While, *in vitro* rooted seedlings are using for acclimatization, where functional leaves and roots are poorly developed. Therefore, the aim of this work was to optimize the disinfection of sugar cane apices during their *in vitro* establishment and achieve acclimatization of rootless shoots directly from the multiplication phase. In the disinfection phase, shoot apices of variety MEX 69-290 were used, testing 12 treatments resulting from the combination of three disinfection methods (with NaClO, NPsAg, gentamicin), the presence or absence of coconut water, and two concentrations of plant growth regulators. In the acclimatization phase, rootless shoots generated directly from the multiplication phase were used, subjected to the interaction of applying or not applying indolebutyric acid at the base of shoots, presence or absence of mycorrhiza in the substrate, and application or non-application of 24-epibrassinolide. In the disinfection of sugar cane apices, adding gentamicin to the medium improved disinfection only for the first 14 days. However, the treatment with the highest levels of asepsis, survival, and morphogenic response at 14 and 63 days was NaClO at 3% for 15 min + NaClO at 0.06% for 5 min with BAP (1.68 mg L⁻¹) + IAA (0.175 mg L⁻¹) in the culture medium. It was possible to acclimatize 75% of the shoots directly from the multiplication stage by adding AIB auxin at the base of shoots, 1.5 g of mycorrhiza per planting hole, and two leaf applications of 1 mL of 0.0096 mg L⁻¹ 24-epibrassinolide.

* Autor para correspondencia:

Campo Experimental
Rosario Izapa del Instituto
Nacional de Investigaciones
Forestales, Agrícolas y
Pecuarias.
Carretera Tapachula-
Cacahoatán Km 18. C.P.
30870.
Tuxtla Chico, Chiapas,
México.
Teléfono: + 52 9621059535.
Correo-electrónico:
iracheta.leobardo@inifap.gob.mx

1. Introducción

El cultivo de caña de azúcar (*Saccharum* spp.), es uno de los cultivos agrícolas más importantes del planeta. México es considerado como el 7° productor a nivel mundial y uno de los de mayor importancia en la producción de azúcar (García y Serrano, 2020). Tan solo a finales del año 2023 la superficie cultivada fue 854,301.43 ha, las cuales generaron una producción con valor de casi 53 mil millones de pesos (SIAP, 2024).

El establecimiento y renovación de plantaciones de caña de azúcar en campo involucra convencionalmente el uso de yemas; lo que acarrea problemas de agotamiento de las variedades, así como acarreo y diseminación de algunas plagas y enfermedades por el tránsito sin control fitosanitario de las semillas o yemas (Caamal y Bello, 2014). Por lo anterior, el uso de las técnicas biotecnológicas, como la propagación de vitroplantas por cultivo de tejidos vegetales, ha sido desde hace algunos años una opción para contrarrestar los problemas de producción masiva de plantas certificadas. La técnica tiene su soporte en la totipotencia celular o la capacidad de la célula vegetal para regenerar una planta completa; mediante el cultivo de cualquier tejido vivo de la planta, en un medio nutritivo artificial bajo condiciones asépticas y en un ambiente controlado (Díaz et al., 2020). El cultivo de tejidos vegetales en caña de azúcar consta de cinco etapas: E0) preparación de las plantas madre, E1) establecimiento aséptico e inducción de la organogénesis, E2) multiplicación, E3) crecimiento y enraizamiento, y E4) aclimatación.

El establecimiento aséptico y la inducción de la organogénesis es una etapa de las más complicadas, debido a que consiste en la implantación de meristemas o ápices meristemáticos desinfectados exitosamente, en medio de cultivo para el desarrollo del brote, donde cada meristemo que induzca la caulogénesis, o formación de nuevos brotes, es identificado como una “línea” con fines de trazabilidad de cada vitroplanta producida (Díaz et al., 2020). Sin embargo, el porcentaje de éxito en la desinfección de los tejidos iniciales y el explante final, varía dependiendo de las condiciones de la planta madre, si proviene de campo o de invernadero, del genotipo y sobre todo de la microbiota asociada al suelo y a la misma planta, la cual varía dependiendo de las condiciones ambientales de cada región. Por tal motivo, las aplicaciones de protocolos de desinfección no siempre son eficientes para la descontaminación de algunas variedades, de tal forma que se pueden presentar no solo problemas de elevada contaminación, si no también elevada oxidación de los tejidos por sensibilidad a los desinfectantes. Al respecto, algunos trabajos han reportado porcentajes de contaminación del 30% de explantes establecidos *in vitro* en ciertas variedades, mientras que en otras se presenta hasta el 50% de contaminación en los primeros 21 días después del establecimiento, con presencia de oscurecimiento de los explantes en desinfectantes como el hipoclorito de sodio (NaClO) (Rangel-Estrada et al., 2016); porcentaje que en ocasiones puede elevarse en el transcurso

de los días. Sin embargo, dentro de los agentes contaminantes que se pueden presentar, los más comunes corresponde a la contaminación bacteriana de origen sistémico, que no puede ser eliminada por la desinfección superficial con NaClO; por lo que la incidencia de bacterias es uno de los problemas frecuentes no solo en la etapa de inducción, sino también durante la multiplicación y enraizamiento (Alvarado-Capó et al., 2003; Rangel-Estrada et al., 2016). Se ha planteado, incluso, que el uso de antibióticos como la gentamicina en el medio de cultivo, podría asegurar el 92 % de ápices asépticos en algunas variedades; de igual forma, el empleo de nanopartículas de plata, combinado con diferentes concentraciones de reguladores del crecimiento podría mejorar la asepsia y al mismo tiempo promover el crecimiento (Chávez-García et al., 2020; Niubó et al., 2004). Por otra parte, una vez superados los problemas de contaminación, los brotes inducidos son multiplicados en medios semisólidos o en sistemas de inmersión temporal para incrementar la productividad y disminuir el costo de producción. Sin embargo, para obtener plantas completamente aclimatadas, los brotes multiplicados deberán pasar por la etapa de crecimiento y enraizamiento, la cual implica la individualización de los brotes y su cultivo en medio semisólido por un tiempo de 15 a 30 días; lo anterior deberá asegurar porcentajes de aclimatación del 85 a 98% (Caamal y Bello, 2014; Pineda et al., 2018; Rangel-Estrada et al., 2016). Tal aclimatación permitirá que la planta alcance un crecimiento autotrófico en ambientes de menor humedad relativa, con más luz y sustratos sépticos (Preece y Sutter, 1991); etapa fundamental en la producción de plantas, toda vez que de ella depende la calidad final de las plantas propagadas *in vitro* (Agramonte et al., 1998); por lo que es necesario la aplicación de técnicas de adaptación al pasar de las condiciones *in vitro* a *ex vitro*. De allí que la elección del sustrato, la proporción adecuada de los componentes de la mezcla, la fertilización, así como la regulación de la temperatura y humedad, sean los principales factores que afectarán la aclimatación (Abad, 1989; Díaz et al., 2004). Si bien, la aclimatación involucra la formación de nuevas hojas y raíces completamente adaptada a las nuevas condiciones en invernadero, también es cierto que las hojas y raíces generadas durante la etapa de crecimiento y enraizamiento *in vitro* no son completamente funcionales, lo cual en muchas ocasiones en lugar de significar una ventaja para la aclimatación se convierten en obstáculos para alcanzar una adaptación más rápida y eficiente. Además, dicha fase de enraizamiento *in vitro* requiere de tiempo, recurso humano y financiero; es una etapa que en otros cultivos *in vitro* se ha suprimido, de tal forma que al evitar el enraizamiento *in vitro* ha implicado un ahorro de tiempo y recursos (Cruz et al., 2012), lo que economiza el proceso de producción masiva de caña de azúcar. En algunos cultivos, como el banano y el café, se ha logrado eliminar la etapa de enraizamiento en brotes y de germinación de embriones con la paliación de 24-epibrasinólida, o bien con la combinación de

brasinoesteroides con el uso de micorrizas (Cruz et al., 2012; Del Castillo et al., 2010).

Es por ello que, el objetivo de esta investigación fue optimizar la desinfección de ápices de caña de azúcar durante el establecimiento *in vitro* con el uso de gentamicina, nanopartículas de plata y fitorreguladores, así como la aclimatación de brotes sin raíz, directamente de la fase de multiplicación, mediante el uso auxinas, micorrizas y epibrasinólida.

2. Materiales y Métodos

2.1. Material biológico

El estudio se llevó a cabo en el Laboratorio de Biotecnología del Campo Experimental Rosario Izapa del INIFAP. El material biológico para el experimento de desinfección correspondió a 120 puntas de caña de azúcar de la variedad MEX 69-290, cortadas con una longitud de 0.6 m, proporcionados por Grupo Porres, recolectadas en el Campo Experimental del Ingenio de Huixtla, ubicado en el km. 7 carretera Obregón-Mazatán, Chiapas, México. Para el experimento de aclimatación, se utilizaron 64 brotes multiplicados *in vitro* durante siete meses, provenientes de los ápices del experimento de desinfección, individualizados, sin raíz, con diámetro basal de 6 mm, altura de 20 cm de la base a la punta de la hoja más grande y con tres a cuatro hojas.

2.2. Optimización de la desinfección de ápices

En el laboratorio se realizó un despeje de hojas envolventes a las puntas de caña, hasta obtener puntas de 30 cm. Estas fueron lavadas con agua y jabón, para después sumergir en una solución de hipoclorito de sodio (NaClO) al 0.5%, luego se enjuagaron para su empaque en papel estraza y su refrigeración a 5 °C durante 24 h (únicamente 80 puntas). En las 40 puntas restantes se aplicó un segundo despaje de hojas y un corte para obtener segmentos de 15 cm.

2.2.1. Métodos de desinfección

Una vez obtenidas las 40 puntas de 15 cm, estas se colocaron en una solución de nanopartículas de plata AgROVIT-CP (NPsAg) a razón de 0.005 mL L⁻¹, de tal forma que solo un centímetro basal de las puntas estuvo sumergido en dicha solución. En estas condiciones, las 40 puntas fueron almacenadas en refrigeración, junto a las 80 puntas restantes, a 5 °C durante 24 h.

Transcurridas 24 h, se aplicaron tres métodos de desinfección de las puntas. Para el primer método, se tomaron 40 puntas (sin NPsAg). A estas se les cortó la parte basal del ápice con oxidación, hasta dejar ápices de 15 cm. En condiciones asépticas estos fueron sometidos a una solución de NaClO al 3% durante 15 min. Después de tres enjuagues con agua destilada esterilizada, se retiraron aproximadamente seis capas de hojas envolventes, hasta obtener ápices de 1.5 cm de base a punta (0.5 base y 1 cm de hojas). Éstos se colocaron en una solución de antioxidante esterilizada (100 mg L⁻¹ de ácido ascórbico, 150 mg L⁻¹ de ácido cítrico y 30 g L⁻¹ de sacarosa) durante 10 min, y se enjuagaron con agua destilada esterilizada. Finalmente, los ápices se sumergieron a una

solución de NaClO al 0.06% durante 15 min, y luego se enjuagaron por tres ocasiones. Los ápices desinfectados por este método fueron establecidos en los diferentes medios de cultivo.

Para el segundo método de desinfección, se utilizaron las 40 (puntas refrigeradas con la solución de NPsAg; las cuales, bajo condiciones asépticas se retiraron aproximadamente seis capas de hojas envolventes, hasta obtener ápices de 1.5 cm de base a punta (0.5 base y 1 cm de hojas). En este caso, los ápices se colocaron en una solución de 5 mL L⁻¹ de antioxidante PPM (Plant Preservative Mixture: 5-cloro-2-metil-3(2H)-isotiazolona 0.13%; 2-metil-3(2H)-isotiazolona 0.04%) durante 10 min, y posteriormente se aplicó un enjuague con agua destilada esterilizada. Posteriormente, las puntas se sumergieron en la solución de NaClO al 0.06% durante 15 min y finalmente se enjuagaron tres ocasiones; antes del establecimiento de los ápices en los diferentes medios de cultivo.

El tercer método de desinfección consistió en el uso de 40 ápices (sin NPsAg). Los cuales se procesaron igual que el primer método de desinfección con NaClO al 3% durante 15 min, hasta la obtención de ápices 1.5 cm de base a punta (0.5 base y 1 cm de hojas). La diferencia consistió en que en este método se utilizó el PPM como desinfectante, tal y como se señala en el segundo método de desinfección. Adicionalmente, los ápices obtenidos con este método fueron establecidos en los diferentes medios de cultivo adicionados con gentamicina a 35 mg L⁻¹ por 14 días.

2.2.2. Medios de cultivo

Los ápices desinfectados fueron establecidos en cuatro medios de cultivo. En todos los casos el medio base consistió en el medio líquido MS (Murashige y Skoog, 1962), sin glicina y adicionado con las diferentes concentraciones de promotores orgánicos o fitorreguladores. El pH fue ajustado a 5.6. Los medios se dispensaron en tubos de ensayo con 15 mL de medio de cultivo y posteriormente se esterizaron a 121 °C y 1.1 kg cm² durante 20 min. Los cuatro medios de cultivo consistieron en evaluar la adición de agua de coco, como promotor del crecimiento, en las concentraciones de 0 y 150 mL L⁻¹; así como dos condiciones de fitorreguladores, que consistieron en la adición al medio de 6-bencilaminopurina (BAP a 0.5 mg L⁻¹) de acuerdo con Caamal y Bello (2014) y por otro lado la combinación de BAP (1.68 mg L⁻¹) + ácido indolacético (AIA 0.175 mg L⁻¹) según Rangel-Estrada et al. (2016).

2.2.3. Tratamientos y variables respuesta

La combinación de los tres métodos de desinfección, las dos concentraciones de agua de coco en el medio de cultivo y las dos condiciones de fitorreguladores arrojaron un total de 12 tratamientos (Cuadro 1). Cada uno contó con 10 repeticiones, donde una repetición y unidad experimental consistió en un brote en un tubo de ensayo con 15 mL de medio de cultivo líquido. Las repeticiones fueron incubadas en durante 14 días a 26±1 °C y fotoperiodo de 12 h, con una intensidad de 11.68 μmoles m⁻² s⁻¹. Transcurridos los 14 días, los brotes fueron subcultivados en su totalidad al medio MS solo con BAP a

0.5 mg L⁻¹ y sin gentamicina. El diseño experimental consistió en un completamente al azar; las variables respuesta fueron: porcentajes de contaminación, oxidación,

supervivencia y explantes con brotes (EB), así como el número de brotes por explante (NBE), la altura (cm) y el grosor (mm) a los 14 y 63 días después de la siembra.

Cuadro 1. Relación de tratamientos en función de la combinación del método de desinfección, agua de coco como promotor de crecimiento y fitoreguladores.

Tratamiento	Desinfectante	Agua de coco	Combinación de reguladores (mg L ⁻¹)
1	NaClO (3%) + NaClO (0.06%) testigo	Sin agua de coco	BAP (0.5)
2	NaClO (3%) + NaClO (0.06%)	Sin agua de coco	BAP (1.68) + AIA (0.175)
3	NaClO (3%) + NaClO (0.06%)	Agua de coco 15%	BAP (0.5)
4	NaClO (3%) + NaClO (0.06%)	Agua de coco 15%	BAP (1.68) + AIA (0.175)
5	NPsAg (0.005 ml L ⁻¹) + NaClO (0.6%)	Sin agua de coco	BAP (0.5)
6	NPsAg (0.005 ml L ⁻¹) + NaClO (0.6%)	Sin agua de coco	BAP (1.68) + AIA (0.175)
7	NPsAg (0.005 ml L ⁻¹) + NaClO (0.6%)	Agua de coco 15%	BAP (0.5)
8	NPsAg (0.005 ml L ⁻¹) + NaClO (0.6%)	Agua de coco 15%	BAP (1.68) + AIA (0.175)
9	NaClO (3%) + Gen (35 mg L ⁻¹)	Sin agua de coco	BAP (0.5)
10	NaClO (3%) + Gen (35 mg L ⁻¹)	Sin agua de coco	BAP (1.68) + AIA (0.175)
11	NaClO (3%) + Gen (35 mg L ⁻¹)	Agua de coco 15%	BAP (0.5)
12	NaClO (3%) + Gen (35 mg L ⁻¹)	Agua de coco 15%	BAP (1.68) + AIA (0.175)

Gen= Gentamicina.

2.3. Optimización de la aclimatación

2.3.1. Tratamientos de enraizamiento, micorriza y epibrasinólida

Los 64 brotes individualizados de caña de azúcar *in vitro* de la variedad MEX 69-290, fueron separados en dos grupos de 32. En el primer grupo, la parte basal fue sumergida en agua destilada y el segundo en una solución de ácido indolbutírico (AIB) a 10 mg L⁻¹, durante 1 h. Posteriormente los brotes de cada grupo se retiraron de las soluciones, y sin enjuagar, se sembraron en el sustrato. Como sustrato se utilizó una mezcla de turba (Cosmo peat®), fibra de coco y agrolita; en una proporción 1:1:1. Se emplearon charolas de plástico negras de 52 cm de largo y 26 cm de ancho, con 200 orificios para siembra, los cuales fueron llenados con 6.8 g del sustrato a capacidad de campo. En el caso de los tratamientos donde se aplicó la micorriza, ésta se dispensó directamente en el hoyo de siembra a razón de 1.5 g. La micorriza utilizada fue *Glomus intraradices*, ahora reclasificada como *Rhizophagus irregularis* (micorriza INIFAP). Una vez establecidos los brotes en el sustrato, a los tratamientos de epibrasinólida se les aplicó por dos ocasiones 1 mL de una solución de 0.0096 mg L⁻¹ de 24-epibrasinólida (Epi), la primera al momento del trasplante y la segunda a los 7 d. Se evaluó un total de ocho tratamientos, resultado de combinar dos condiciones de AIB, micorriza y epibrasinólida. Cada tratamiento contó con ocho repeticiones. Estos fueron colocados en invernadero en charolas de siembra, cubiertos por 10 d con un domo de plástico transparente, el cual fue perforado para el intercambio gaseoso a los 15 d. Las charolas estuvieron bajo 50% de sombra y una densidad de flujo de fotones fotosintéticos de 48 μmol s⁻¹ m⁻² durante los primeros 10 d y 500 μmol s⁻¹ m⁻² durante el resto del tiempo. El diseño experimental fue un completamente al azar con arreglo factorial. A los 23 d, las variables respuesta fueron el porcentaje de supervivencia, número de hojas nuevas (NHN), porcentaje de plantas con raíz (PR), número de raíces (NR),

número de raíces secundarias (NRS), longitud de raíz principal (LRP) y número de hijuelos (NHij).

2.4. Análisis de datos

En ambos experimentos los datos se analizaron mediante ANOVA, prueba de comparación de medias por Tukey (P<0.05) y correlación de Spearman, mediante el paquete estadístico SAS v. 9.3.

3. Resultados y Discusión

3.1. Optimización de la desinfección de ápices

El factor tipo de desinfección no tuvo efecto contundente en la contaminación a los 14 días en los diferentes tratamientos, ni a los 63 días, cuando los ápices ya se encontraban creciendo en el medio MS con solo 0.5 mg L⁻¹ de BAP (Cuadro 2 y 3). El tipo de desinfección solo tuvo un ligero efecto sobre la altura y grosor del brote durante los primeros 14 dds y sobre el grosor a los 63 dds. En tales casos, el método 3 de desinfección con gentamicina fue mejor. Aunque se esperaba mayor efecto sobre la contaminación que en la altura y grosor.

Como se aprecia en el Cuadro 2, los ápices a los 14 días, en los tratamientos T2, T10 y T12, presentaron el menor porcentaje de contaminación (50%), lo que repercutió en menor grado de oxidación, mayor supervivencia y mayores alturas, sobre todo en los tratamientos con gentamicina. La respuesta variable para la contaminación, propiciada casi en 100% por la presencia de bacterias, y la falta de un efecto claro del método de desinfección, indican la posibilidad que dichas bacterias sean endofíticas; por lo que al estar en el sistema vascular poco son afectadas por la desinfección superficial. Lo anterior explicaría que los tratamientos T10 y T12 con gentamicina, la cual puede ingresar al sistema vascular, hayan controlado mejor la contaminación.

Resultados similares fueron reportados por Rangel-Estrada et al. (2016); quienes consignaron porcentajes de contaminación bacteriana de 50 y 40% para las variedades

Laica 82-2220 y Q28-2, respectivamente, pero con menor concentración de NaClO (1.2%) a la utilizada en el presente trabajo (3%). Sin embargo, al aumentar la concentración de NaClO a 1.8 reportaron nula contaminación, aunque la supervivencia descendió de 70 a 50% y la oxidación se incrementó de 30 a 50%. Tales resultados difieren a lo

encontrado a los 14 días en el presente trabajo, para los tratamientos T2, T10 y T12, donde los porcentajes de oxidación fueron de 22 a 33% y los de supervivencia de 90 a 100% durante los primeros 14 días. Lo anterior podría significar que la variedad MEX 69-290 utilizada para este estudio es más tolerante al NaClO.

Cuadro 2. Variables respuesta de explantes de ápice de caña de azúcar Var. MEX 69-290 en diferentes tratamientos en medio líquido. Datos a los 14 dds en cada tratamiento.

Tratamiento	Contaminación (%)	Oxidación (%)	Supervivencia (%)	EB (%)	NBE	Altura (cm)	Grosor (mm)
1. D1/SAC/BAP	70 bc	41.0 ab	90 a	0	0	3.02 bcd	2.8 ab
2. D1/SAC/BAP+AIA	50 c	22.5 b	90 a	0	0	2.72 bcd	2.5 ab
3. D1/CAC/BAP	90 ab	52.5 ab	70 a	0	0	2.66 bcd	2.3 b
4. D1/CAC/BAP+AIA	80 bc	62.5 ab	70 a	0	0	2.22 cd	2.2 b
5. D2/SAC/BAP	100 a	33.5 ab	80 a	0	0	2.34 cd	2.5 ab
6. D2/SAC/BAP+AIA	80 bc	42.7 ab	70 a	0	0	3.09 abc	2.8 ab
7. D2/CAC/BAP	70 bc	32.0 ab	80 a	0	0	2.08 cd	2.3 b
8. D2/CAC/BAP+AIA	100 a	83.0 a	60 a	0	0	2.05 d	1.9 b
9. D3/SAC/BAP	90 ab	36.5 ab	80 a	0	0	2.79 bcd	2.8 ab
10. D3/SAC/BAP+AIA	50 c	33.2 ab	100 a	0	0	4.08 a	3.5 a
11. D3/CAC/BAP	90 ab	68.0 ab	60 a	0	0	3.57 ab	2.9 ab
12. D3/CAC/BAP+AIA	50 c	31.5 ab	90 a	0	0	3.44 ab	2.7 ab
C.V.	12.69	19.69	12.97	NA	NA	24.39	27.69

C.V.= Coeficiente de variación. Medias con letras iguales por columna indican que no hay diferencias significativas (Tukey, P<0.05). D1. Método de desinfección 1=NaClO (3% 15 min) + (0.06% NaClO 5 min) o testigo. D2= NPsAg (0.005 mL L⁻¹) + NaClO (0.6% 3 min). D3= NaClO (3% 15 min) + Gentamicina (35 mg L⁻¹). SAC= Sin agua de coco y CAC= Con 15% de agua de coco.

En el caso del segundo método de desinfección con NPsAg (0.005 mL L⁻¹) y baja concentración de NaClO (0.6%, 3 min), no fue efectivo para el control de la contaminación. Estos resultados difieren con lo reportado por Chávez-García et al. (2020), donde concentraciones de 50 mg L⁻¹ de NPsAg controló en más de 90% la contaminación en ápices de gladiolo establecidos *in vitro*.

Sin embargo, una vez que transcurrieron los 14 días en los diferentes tratamientos, los ápices de cada uno fueron subcultivados al medio MS con 0.5 mg L⁻¹ de BAP; esto, con el fin de comprobar si los porcentajes de contaminación se mantenían al transcurrir 49 días más (63 días dds) sin la gentamicina de los tratamientos T9, T10, T11 y T12. Esta segunda evaluación arrojó que la contaminación de los ápices en la mayoría de los tratamientos se incrementó a un 90 a 100%, a excepción de los tratamientos T2, T10 y T12, en los cuales la contaminación fue de 50 a 70%. Es decir, se registró un aumento de 10 y 20% solo en los ápices en T10 y T12, con respecto a lo observado a los 14 días (Cuadro 3). Lo anterior significa que la gentamicina no ingresa en su totalidad en los ápices, o bien, ésta elimina algunas bacterias y disminuye la actividad de otras, las cuales se expresan al transcurrir el tiempo sin gentamicina.

A los 63 días, al incrementarse la contaminación, aumentó el porcentaje de oxidación y con ello disminuyó la supervivencia en la mayoría de los tratamientos. No obstante, se apreció que los ápices en los tratamientos T10 y T12 se manifestó 88 a 97% de oxidación, respectivamente; lo cual estuvo por encima de los porcentajes de contaminación de 60 y 70%, respectivamente. Lo anterior necesariamente afectó

la supervivencia, la cual se redujo a 30% en ambos tratamientos. Además, una proporción elevada de los ápices en estos tratamientos sufrió oxidación y mortalidad no asociada a la contaminación. Posiblemente la exposición a la gentamicina pudo causar algún tipo de toxicidad durante los primeros 14 días. Resultados diferentes fueron consignados por Niubó et al. (2004), quienes observaron que una concentración de 30 mg L⁻¹ de gentamicina aplicada por 14 días en vitroplantas de caña de azúcar, logró 92% de descontaminación de endófitos, el cual fue un tiempo de exposición mínimo que no ocasionó daños al tejido.

Por su parte el tratamiento T2 indujo el mayor porcentaje de ápices con brotes, así como el mayor promedio de brotes por explante; mientras que estuvo entre los tratamientos que propiciaron mayor grosor de tallo.

Por su parte, el agua de coco tuvo efecto significativo (P<0.05) en diversas variables desde los primeros 14 días (Cuadro 2); toda vez que su adición al medio de cultivo aumentó la oxidación, disminuyó la supervivencia y hasta incrementó la fenolización desde la primera evaluación (datos no mostrados).

El tipo de regulador en el medio de cultivo tuvo efecto significativo sobre la contaminación (P<0.05), durante los primeros 14 días en los tratamientos. Sin embargo, a los 63 días, cuando todos los tratamientos ya llevaban más de 40 días en el medio MS testigo, con 0.5 mg L⁻¹ de BAP, los efectos residuales de los reguladores continuaron afectando de forma significativa (P<0.05) a la contaminación, supervivencia, EB, NBE y altura. Es decir, que los explantes de caña establecidos en el medio MS con BAP y AIA por los

primeros 14 días, mejoró la respuesta al cambiar los ápices al medio con solo BAP 0.5 (Cuadros 2 y 3). Al respecto, Rangel-Estrada et al. (2016), al utilizar las mismas concentraciones de reguladores propiciaron la mayor respuesta morfológica, aunque en su caso esto ocurrió en la etapa de multiplicación.

En todo caso, la desinfección con NaClO (3% 15 min) + (0.06% NaClO 5 min) y después cultivar en un medio sin agua de coco, pero con BAP+AIA por los primeros 14 y 63 d en medio líquido fue el mejor tratamiento.

Cuadro 3. Variables respuesta de explantes de ápice de caña de azúcar Var. MEX 69-290, después de su subcultivo a medio semisólido testigo MS+BAP0.2. Datos a los 63 dds o 49 dd del subcultivo a medio testigo sin gentamicina.

Tratamiento	Contaminación (%)	Oxidación (%)	Supervivencia (%)	EB (%)	NBE	Altura (cm)	Grosor (mm)
1. D1/SAC/BAP	90 ab	90.2 a	10 bc	10 bc	0.3 b	2.0 a	3.3 ab
2. D1/SAC/BAP+AIA	50 c	60.0 b	50 a	50 a	1.5 a	1.8 ab	3.7 a
3. D1/CAC/BAP	100 a	100.0 a	0 c	0 c	0.0 b	1.9 ab	2.4 bcd
4. D1/CAC/BAP+AIA	90 ab	91.0 a	10 bc	10 bc	0.4 b	1.9 ab	2.3 cd
5. D2/SAC/BAP	90 ab	81.5 a	10 bc	10 bc	0.2 b	2.0 a	2.6 bcd
6. D2/SAC/BAP+AIA	90 ab	89.0 a	20 bc	20 bc	0.5 b	1.7 b	3.1 abc
7. D2/CAC/BAP	100 a	100.0 a	0 c	0 c	0.0 b	1.9 ab	2.4 bcd
8. D2/CAC/BAP+AIA	100 a	100.0 a	0 c	0 c	0.0 b	1.8 ab	1.9 d
9. D3/SAC/BAP	100 a	100.0 a	0 c	0 c	0.0 b	2.0 a	3.0 abc
10. D3/SAC/BAP+AIA	60 c	88.0 a	30 ab	20 bc	0.5 b	1.7 ab	3.9 a
11. D3/CAC/BAP	90 ab	99.0 a	10 bc	10 bc	0.2 b	1.9 ab	3.1 abc
12. D3/CAC/BAP+AIA	70 bc	97.0 a	30 ab	30 ab	0.5 b	1.6 b	3.3 ab
C.V.	9.97	9.73	12.98	NA	NA	16.5	37.89

C.V.= Coeficiente de variación. Medias con letras iguales por columna indican que no hay diferencias significativas (Tukey P<0.05).

D1. Método de desinfección 1=NaClO (3% 15 min) + (0.06% NaClO 5 min) o testigo. D2=NPsAg (0.005 mL L⁻¹) +NaClO (0.6% 3 min). D3= NaClO (3% 15 min) + Gentamicina (35 mg L⁻¹). SAC= Sin agua de coco y CAC= Con 15 % de agua de coco.

3.2. Optimización de la aclimatación

A los 23 d, todas las variables de estudio presentaron diferencias significativas (Tukey P<0.05) entre tratamientos (Cuadro 4). Las principales diferencias fueron entre los tratamientos T7 y T8, con respecto al resto de los tratamientos. Ambos indujeron el mayor porcentaje de supervivencia, número de hojas nuevas y promovieron la formación de raíces y su desarrollo, aunque también indujeron mayor cantidad de plántulas con hijuelos. Lo anterior implica que al tratar los brotes con AIB y micorriza

(T7) y la combinación de AIB, micorriza y epibrasinólida (T8), se mejora el enraizamiento y la aclimatación de plántulas de caña de azúcar. Sin embargo, el T8 propició hasta 75% de supervivencia; la cual estuvo positiva y significativamente correlacionada con el porcentaje de plantas con raíz (PR), número de raíces (NR), número de raíces secundarias (NRS), la longitud de la raíz principal (LRP) y la formación de hijuelos (NHij), con coeficientes de correlación de Spearman de r=0.71 a 0.90 (datos no mostrados).

Cuadro 4. Supervivencia y respuesta morfológica de brotes individuales de caña de azúcar (*Saccharum* spp.) provenientes de la fase de multiplicación *in vitro* y sometidos a tratamientos para su enraizamiento y aclimatación simultánea *ex vitro*. Promedio de ocho repeticiones a los 23 dds.

Tratamiento	Supervivencia (%)	NHN	PR (%)	NR	NRS	LRP (cm)	NHij
1. Testigo	12.5 b	0.00 b	12.5 b	0.25 b	0.62 ab	0.25 b	0.00 b
2. Epi.	12.5 b	0.00 b	12.5 b	0.12 b	0.00 b	0.08 b	0.00 b
3. Micor.	12.5 b	0.12 b	12.5 b	0.12 b	0.37 b	0.87 b	0.12 b
4. Micor/Epi	12.5 b	0.12 b	12.5 b	0.25 b	0.87 ab	0.83 b	0.00 b
5. AIB	0.0 b	0.00 b	12.5 b	0.25 b	0.00 b	0.08 b	0.00 b
6. AIB/Epi	12.5 b	0.12 b	12.5 b	0.62 b	0.00 b	0.43 b	0.12 b
7. AIB/Micor.	37.5 a	1.00 a	37.5 ab	2.25 ab	2.62 ab	2.47 ab	0.25 ab
8. AIB/Micor/Epi	75.0 a	1.75 a	75.5 a	4.87 a	3.75 a	4.06 a	1.0 a
C.V.	14.1	21.3	15.4	13.9	15.3	21.3	17.6

C.V.= Coeficiente de variación. Medias con letras distintas por columna, son estadísticamente diferentes (Tukey P<0.05). El grupo estadístico corresponde a datos previamente transformados con $\sqrt{x + 1}$.

NHN= Número de hojas nuevas, PR= Porcentaje de plantas con raíz, NR= Número de raíces, NRS= Número de raíces secundarias, LRP= Longitud de raíz principal, NHij= Número de hijuelos por planta.

El análisis factorial demostró que, someter los brotes a la solución de 10 mg L⁻¹ de AIB favoreció significativamente la supervivencia (P<0.05), emisión de hojas y sobre todo la

formación de nuevas raíces y el crecimiento de éstas; así como la emisión de pequeños hijuelos (Cuadro 5). De igual forma, cuando se incorporó la micorriza al hoyo de siembra,

ésta favoreció la respuesta en la mayoría de las variables; dicha diferencia fue significativa ($P < 0.05$) con respecto a la ausencia de la micorriza. Por su parte, la aplicación de la epibrasinólida no indujo diferencias significativas ($P > 0.05$), aunque los valores para todas las variables fueron siempre mayores cuando ésta fue aplicada (Cuadro 5). Los resultados anteriores demuestran que el AIB es una auxina que mejora la inducción de raíces en brotes de caña y que la rizogénesis es potenciada, cuando la auxina interactúa con la micorriza

R. irregularis. Si bien la aplicación de la epibrasinólida, en la mayor parte de los tratamientos y en el análisis factorial, no tuvo efectos significativos ($P > 0.05$), este fitorregulador fue determinante para la supervivencia y desarrollo de plantas completas al interactuar el AIB y la micorriza. Los resultados en esta investigación coinciden con lo reportado para banano por Cruz et al. (2012), quienes obtuvieron más del 90% de plantas aclimatadas con la aplicación de auxina y micorriza.

Cuadro 5. Supervivencia y respuesta morfológica de brotes individuales de caña (*Saccharum* spp.) provenientes de la fase de multiplicación *in vitro* en función de los efectos de los diferentes factores de estudio para el enraizamiento y aclimatación *ex vitro*. Promedio de 32 repeticiones a los 23 dds.

Factor y niveles	Supervivencia (%)	NHN	PR (%)	NR	NRS	LRP (cm)	NHij
AIB							
Sin	12.5 b	0.06 b	12.5 b	0.18 b	0.46 b	0.53 b	0.03 b
10 mg L ⁻¹ .	31.2 a	0.71 a	40.6 a	2.00 a	1.59 a	1.76 a	0.34 a
Micorriza							
Sin	9.37 b	0.03 b	18.75 a	0.31 b	0.15 b	0.21 b	0.03 b
1.5 g	34.37 a	0.75 a	34.38 a	1.87 a	1.90 a	2.08 a	0.34 a
Epibrasinólida							
Sin	15.62 a	0.28 a	18.75 a	0.71 a	0.90 a	0.92 a	0.09 a
0.0096 mg L ⁻¹	28.12 a	0.50 a	34.38 a	1.46 a	1.15 a	1.38 a	0.28 a
C.V.	14.1	21.3	15.4	13.9	15.3	21.3	17.6

C.V.= Coeficiente de variación. Medias con letras distintas por columna y factor, son estadísticamente diferentes (Tukey $P < 0.05$). El grupo estadístico corresponde a datos previamente transformados con $\sqrt{x + 1}$.
 NHN= Número de hojas nuevas, PR= Porcentaje de plantas con raíz, NR= Número de raíces, NRS= Número de raíces secundarias, LRP= Longitud de raíz principal, NHij= Número de hijuelos por planta.

4. Conclusión

En la etapa de desinfección de ápices de caña de azúcar, la adición de gentamicina al medio de cultivo mejoró los porcentajes de desinfección solo durante los primeros 14 días. La variabilidad de respuesta en la contaminación asociada al método de desinfección estuvo relacionada con la presencia de bacterias endófitas. No obstante, el único tratamiento con los mayores niveles de asepsia, supervivencia y respuesta morfológica por 14 y 63 días correspondió al tratamiento con NaClO al 3% por 15 min+ NaClO al 0.06% por 5 min y con BAP+AIA en el medio de cultivo. De igual forma fue posible la aclimatación del 75% de los brotes de caña de azúcar sin raíces, provenientes directamente de la etapa de multiplicación, mediante la adición a la base de los brotes la auxina AIB, 1.5 g de micorriza al hoyo de siembra y dos aplicaciones en hojas de 1 mL de 0.0096 mg L⁻¹ de la epibrasinólida.

Agradecimiento

Los autores expresan su agradecimiento al Ing. Jorge Aurelio Chávez Zaragoza, del Grupo Porres, por otorgar los permisos y proporcionar el apoyo técnico para la donación y recolecta del material genético en el Campo Experimental del Ingenio de Huixtla.

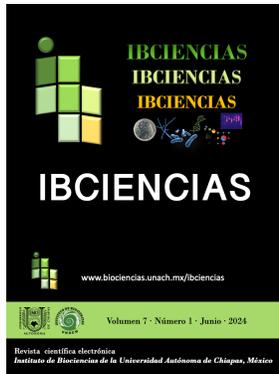
Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses

Referencias

- Abad M. 1989. Los sustratos en horticultura ornamental. Revista Agrícola Vergel 3: 146-152.
- Agramonte PD, Jiménez TF, Rodríguez MAD. 1998. Aclimatación. En: Pérez Ponce JN (ed.). Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología. Instituto de Biotecnología de las Plantas, Santa Clara, Villa Clara, Cuba. Pp. 193-206.
- Alvarado-Capó Y, Portal-González N, García-Aguila L, Ramírez D, Gutiérrez Y. 2003. Incidencia de contaminantes microbianos en la micropropagación de la caña de azúcar. Biotecnología Vegetal 3(1): 31-36.
- Caamal VJH, Bello BJJ. 2014. Manual de micropropagación de caña de azúcar (*Saccharum* spp.). Colegio de Postgraduados-Fundación Produce Campeche, México. 23 p.
- Chávez-García JA, Andrade-Rodríguez M, Bello-Bello JJ, Rueda-Barrientos MC, Guillén-Sánchez D, Sainz-Aispuro MJ. 2020. Nanopartículas de plata en el establecimiento *in vitro* de ápices de gladiolo. Revista Fitotecnia Mexicana 43: 557-564.
- Cruz CCI, Iracheta DL, Sandoval CG, Méndez LI, López GP, Castellanos JM. 2012. Respuesta de vitroplantas de banano al tratamiento con brasinoesteroide y biofertilizantes durante la aclimatación. XXIV Congreso Nacional y IV Internacional de Fitogenética. Pp. 226.
- Del Castillo YV, Iracheta DL, Aguirre MJF, Ovando MI, Castellanos JM, López GP, Méndez LI. 2010. Transformación de embriones somáticos de *Coffea canephora* P. a plantas por aplicación de brasinoesteroides,

- adenina y sustratos de siembra. Memorias del XXXIII Congreso Nacional y III Internacional de Fitogenética. Pp. 1.
- Díaz E, Perera M, Paz N, Rocco P, Ovejero N, Serviño A, Castagnaro A, Noguera A. 2020. Proceso de producción de vitroplantas de caña de azúcar de pureza genética y sanidad garantizadas en etapa de laboratorio en la EEAOC. Revista Industrial y Agrícola de Tucumán. 97(2): 39-44.
- Díaz, LP, Medina LF, Latife J, Dignonzelli PA, Sosa SB. 2004. Aclimatación de plantas micropropagadas de caña de azúcar utilizando el humus de lombriz RIA. Revista de Investigaciones Agropecuarias 33: 115-128.
- García D, Serrano H. 2020. La caña *Saccharum officinarum* ¡azúcar! Revista Tecno Agro 144.
- Murashige T, Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum 15: 473-497.
- Niubó E, Díaz P, Oliva O, Portieles R, Díaz A, Ancheta O, Rodríguez S, Soto A, Sánchez C. 2004. Metodología para la obtención *in vitro* de plantas y tejidos de la caña de azúcar libres de contaminantes exófitos y endófitos. Revista CENIC Ciencias Biológicas 35: 155-161.
- Pineda RE, Acosta HF, Fernández DI, Núñez JD, Hernández FAR, Aday DOC, Occeguera ÁZ, Machado AP, Jiménez VM, Toledo RE, Más MR. 2018. Nuevo sustrato para la aclimatización de vitroplantas de caña de azúcar. Centro Agrícola 45: 32-36.
- Preece JE, Sutter EG. 1991. Acclimatization of micropropagated plants to greenhouse and field. En: Debergh PC, Zimmerman RH. (eds). Micropropagation: Technology and Application. Kluwer Academic. Dordrecht, Pp. 71-93.
- Rangel-Estrada SE, Hernández-Meneses E, Hernández-Arenas M. 2016. Micropropagación de variedades de caña de azúcar cultivadas en México. Revista Fitotecnia Mexicana 39: 225-231.
- SIAP. 2024. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. Anuario Estadístico de la Producción Agrícola 2023. Recuperado de <https://nube.siap.gob.mx/cierreagricola/> Fecha de consulta: 27 de junio 2024.



Evaluación en campo de bioactivadores de resistencia vegetal para el control de la roya del café

Diego Rosales-Hernández¹, Lourdes Adriano-Anaya², Miguel Salvador-Figueroa², Gamaliel Velázquez-Ovalle², Benjamín Moreno-Castillo^{2*}

¹Facultad de Ciencias Agrícolas, Universidad Autónoma de Chiapas. Huehuetán, Chiapas, México.

²Instituto de Biociencias, Universidad Autónoma de Chiapas, Tapachula, Chiapas, México.

Resumen

El objetivo del presente trabajo fue evaluar en campo el efecto de las aspersiones de tres bioactivadores de la defensa vegetal o IRVs [inductores de resistencia vegetal] (PF14-50, PF5 y PSD; no disponibles comercialmente y sujetos a registros de patente), oxiclورو de cobre al 85% y agua (testigo) sobre la severidad de roya de café (*Hemileia vastratix*) en plantas de café (*Coffea arabica* L. var Bourbon), expresada como índices de infección (II), área bajo la curva del progreso de la enfermedad (abcpe) y retraso en el desarrollo de la enfermedad (factor Δt). Las aspersiones de las plantas se realizaron cada 15 días del 27/jul al 9/dic de 2018. Los resultados mostraron que las plantas asperjadas con el bioactivador PF5 acumularon en promedio menor cantidad de enfermedad (8559.0) en comparación con el testigo (11937.5) aunque fue similar a las plantas asperjadas con oxiclورو de cobre (9298.1), PF14-50 (9924.0) y PSD (11247.5). No obstante, al final del experimento el oxiclورو de cobre retrasó el progreso de la roya por 42 días, mientras que el PF5, PF14-50 y PSD causaron un retraso de 27, 22 y 15 días, respectivamente y en comparación con el testigo. Se concluye que el PF5 y el oxiclورو de cobre fueron los tratamientos más efectivos, además de hacer evidente el potencial de estos IRVs para reducir los niveles de severidad de la roya del café.

Palabras clave:

Bourbon
Escala
Epidemia
IRVs
Severidad

Keywords:

Bourbon
Scale
Epidemics
PRIs
Severity

Field evaluation of plant resistance bioactivators on the control of the coffee leaf rust

Abstract

This work aimed to evaluate in the field the spraying effects of three plant defense bioactivators or PRIs [plant resistance inducers] (labeled as PF14-50, PF5, and PSD; non-commercially available and subjected to patent registration), 85% copper oxychloride (chemical fungicide) and water (control) on severity of coffee leaf rust (*Hemileia vastatrix*) in coffee plants (*Coffea arabica* L. var Bourbon), expressed as Infection Index (II), area under disease progress curve (audpc) and delay on the disease progress (factor Δt). The coffee plants were sprayed every 15 days from July 25th to December 9th, 2018. Our results showed that PF5-treated plants registered the lowest value of audpc (8559.0) in comparison to control plants (11937.5) but was similar to audpc of copper oxychloride (9298.1), PF14-50 (9924.0) and PSD (11247.5). Nevertheless, at the end of the experiment the chemical fungicide delayed the disease progress by 42 days, while PF5, PF14-50, and PSD caused a delay of 27, 22 and 15 days, respectively, and in comparison to the control. It is concluded that PF5 and copper oxychloride were the most effective treatments, in addition to making evident the potential of the three PRIs tested, to reduce the severity levels of the coffee leaf rust.

* Autor para correspondencia:

Instituto de Biociencias,
Universidad Autónoma de
Chiapas.
Boulevard Príncipe Akishino
sin número, Colonia
Solidaridad 2000, C.P.
30798.
Tapachula, Chiapas, México.
Teléfono: + 52 9626427972.
Correo-electrónico:
benjamin.moreno@unach.mx

1. Introducción

Una de las principales limitantes que tiene el cultivo de variedades árabes del café (*Coffea arabica* L.) (Rubiaceae), es la susceptibilidad al patógeno *Hemileia vastatrix* (Basidiomycota) agente causal de la roya del café (Hernández et al., 2021), el cual puede causar pérdidas de hasta un 35% del grano si no se implementa el manejo adecuado de la enfermedad (Talhinhas et al., 2017). México se ubica dentro de los diez principales países productores de café, cultivo que representa una de las mayores fuentes de divisas para el país por su exportación (Canet-Brenes et al., 2016). El aromático grano es uno de los sistemas socioecológicos más importantes en Chiapas, pues contribuye con el 37% de la producción total nacional (SIAP, 2023).

Durante los 30 años posteriores a su llegada a México en 1981, teniendo como punto de entrada la región del Soconusco en Chiapas, los niveles de incidencia y severidad de la roya del café fueron relativamente bajos y no representaron una amenaza para el sector cafetalero de la región (Barrera-Gaytán y Gómez-Ruiz, 2019). Sin embargo, a partir del 2012 y a la fecha se han atestiguado incrementos atípicos en la severidad de la enfermedad (Barrera et al. 2013; Libert-Amico y Paz-Pellat, 2018) y pérdidas en los rendimientos de 20% o más, situación que se ha atribuido a los efectos del cambio climático (Barrera et al. 2013; Canet-Brenes et al., 2016; Henderson, 2019; Libert-Amico y Paz-Pellat, 2018). Esto ha provocado una conversión hacia la producción de café “Robusta” y/o ciertas variedades arabigas resistentes, las cuales han mostrado cierta tolerancia a la infección por el hongo (Libert-Amico y Paz-Pellat, 2018, Hernández et al., 2021, Talhinhas et al., 2017).

El ciclo del patógeno se cumple favorablemente con temperaturas entre los 22 °C y 26 °C y, como resultado de su invasión, el tejido se necrosa o causa defoliación y por tanto, pérdidas en la cosecha (Barrera-Gaytán et al., 2014; Toniutti et al., 2017). El manejo de la enfermedad es principalmente químico (Talhinhas et al., 2017) con las consecuencias conocidas de generación de cepas resistentes y/o contaminación ambiental (Hernández et al., 2021).

Con el interés de causar el mínimo impacto ambiental y a la salud humana y eliminar los riesgos de generación de resistencia, se han explorado algunas estrategias de biocontrol de patógenos utilizando células microbianas directamente o sus metabolitos extracelulares (Köhl et al., 2019; Pandit et al., 2022; Rettinassababady y Jeyalakshmi, 2014; Soenens e Imperial, 2020). Otra alternativa explorada ha sido el estudio y la búsqueda de sustancias inductoras o activadoras de la resistencia vegetal (endógenas o exógenas), tal como el ácido jasmónico, etileno, ácido salicílico entre otras moléculas orgánicas de origen natural (Delgado-Oramas, 2020). El objetivo del presente estudio fue evaluar en campo tres productos formulados a base de bioactivadores de la resistencia vegetal reforzados con microelementos para el control de la roya del café en una plantación comercial en el Soconusco, Chiapas, México.

2. Materiales y Métodos

2.1. Sitio experimental

El experimento se llevó a cabo en una plantación mezclada de café robusta (*Coffea canephora*) y árabe (*C. arabica*, variedad Bourbon) de aproximadamente 1.5 ha. El cafetal tenía intercaladas algunas especies frutales como papaya, papaya, limón, naranja, plátano morado, etc., así como algunas especies forestales como primavera, cedro mundani, cedro rojo, roble, palo de zope, árbol de pan, caoba, etc. asociadas con algunas plantas trepadoras (Araceae) y bromelias. El sitio experimental se ubica en el km 5 de la carretera Tapachula-Felipe Carrillo Puerto-Cacahoatán perteneciente al Cantón “El Chaparrón” del municipio de Tapachula, Chiapas, México (14°59'14" N, 92°14'07" O) a una altitud de 527 msnm. El clima predominante del sitio es cálido húmedo con abundantes lluvias en verano y predominantemente con suelos pesados arcillosos de tipo Luvisol (INEGI, 2017).

2.2. Experimento

Para el experimento se utilizaron plantas de café de la variedad Bourbon (recepas de 1 año). Las aspersiones se realizaron con aspersores de 5 L de capacidad, con un gasto estimado de 200 L ha⁻¹. El periodo experimental comprendió del 27 de julio al 9 de diciembre de 2018 y el sitio experimental estuvo sujeto al manejo normal que da el productor a su cafetal, con la excepción de la aplicación de fungicidas sobre las plantas experimentales. Las aspersiones se realizaron cada 15 días y los tratamientos evaluados fueron los siguientes: 1) testigo (agua), 2) oxiclورو de cobre 85% (2 kg ha⁻¹), 3) Bioactivador PF14-50 (2 L ha⁻¹), 4) Bioactivador PF5 (2 L ha⁻¹) y 5) Bioactivador PSD (2 L ha⁻¹). A todos los tratamientos se les agregó adherente-surfactante para reducir el lavado y mejorar su adherencia (INEX-A, Cosmocel, 2 mL L⁻¹). De acuerdo con la información proporcionada por la empresa formuladora, los bioactivadores evaluados están compuestos por una mezcla específica de oligosacáridos y otros compuestos, así como algunos nutrientes que son requeridos por las plantas para activar las defensas vegetales y estimular el crecimiento. Estos bioactivadores no están comercialmente disponibles y son propiedad de la empresa SAS (Sustainable Agro Solutions, S.A.U., Lleida, España) quien los proporcionó para el estudio. Cada uno de los tratamientos se asperjó sobre 11 plantas de café, cada una de las cuales se consideró como repetición o unidad experimental. En cada planta se marcaron cinco ramas (dos inferiores, una media y dos de la parte alta), a las cuales se les dio seguimiento en cuanto a la severidad de roya durante todo el periodo experimental utilizando una escala de severidad basada en la intensidad de daño y/o síntomas visibles de roya.

2.3. Índice de infección de las plantas

El índice de infección fue determinado mediante una escala de daño, establecida de acuerdo al porcentaje de la hoja con

síntomas visibles de la roya: grado 0= sin síntomas de roya, grado 1= con puntos cloróticos, grado 2: 2-6% con síntomas, grado 3= 7-19% con síntomas, grado 4= 20-44% con síntomas, grado 5= 45-70% de la hoja con síntomas de roya, y grado 6= > 70% de la hoja con roya (Ramírez-Rodríguez et al., 2020). Se muestrearon todas las hojas de las seis ramas y en base a esta escala se calculó el índice de infección (II) para cada planta de acuerdo a la fórmula (Carlier et al., 2002): $II (\%) = (\sum an/6N) \times 100$; donde, a es cada uno de los grados de la escala (0-6), n corresponde al número de hojas presentes en cada grado y N es el número total de hojas muestreadas. Con esta información, se calculó por cada planta el parámetro área bajo la curva del progreso de la enfermedad (abcpe), utilizando la fórmula (Achicanoy, 2000; Mohapatra et al., 2008): $abcpe = \sum [(II_1 + II_2)/2] [t_2 - t_1]$; donde, II_1 y II_2 son los índices de infección acumulados en los tiempos t_1 y t_2 , respectivamente, siendo t_1 y t_2 los días transcurridos entre dos muestreos consecutivos.

La tasa de infección aparente (r) de cada tratamiento se calculó mediante la fórmula de Van der Plank (1963): $r = [1/(t_2-t_1)] [\ln(X_2/1-X_2)-\ln(X_1/1-X_1)]$; donde, t_1 y t_2 representan los días transcurridos (fecha inicial y fecha final del ensayo), X_1 y X_2 son la proporción acumulada de la enfermedad en t_1 y t_2 , y \ln es el logaritmo natural. Con esta información, se calculó el factor Δt entre tratamientos y control (Whitney, 1976): $\Delta t = (1/r) \ln (x_0/x_{0S})$; donde, Δt es el retraso en el progreso de la enfermedad (en días) causado por

el tratamiento (x_{0S}) en comparación con el control (x_0), r es la tasa aparente de infección de x_{0S} calculado con la fórmula de Van der Plank (1963) y \ln es el logaritmo natural.

2.4. Análisis de datos

La evolución en el tiempo de los índices de infección (II) para cada tratamiento se muestra gráficamente tanto de manera acumulada como no acumulada. Para el abcpe se realizó un análisis de varianza de un factor y la separación de medias mediante la prueba de Tukey ($\alpha=0.05$). Previamente los valores de abcpe se transformaron mediante la raíz cuadrada para cumplir los supuestos de normalidad y homocedasticidad. Los análisis estadísticos se realizaron en el paquete estadístico R (R Core Team, 2021; ver 4.1.1.) con apoyo de R Commander (versión 2.7-1). El valor del factor Δt se presenta como una medida descriptiva general del retraso en el progreso de la enfermedad causado por cada tratamiento, calculado con los valores finales de los índices de infección acumulados (IIa) de cada tratamiento.

3. Resultados y Discusión

En la Figura 1 se muestra la evolución normal de los índices de infección (II) de la roya del café en cada tratamiento durante el experimento, mientras que en la Figura 2 se muestran los índices de manera acumulada en cada fecha (IIa).

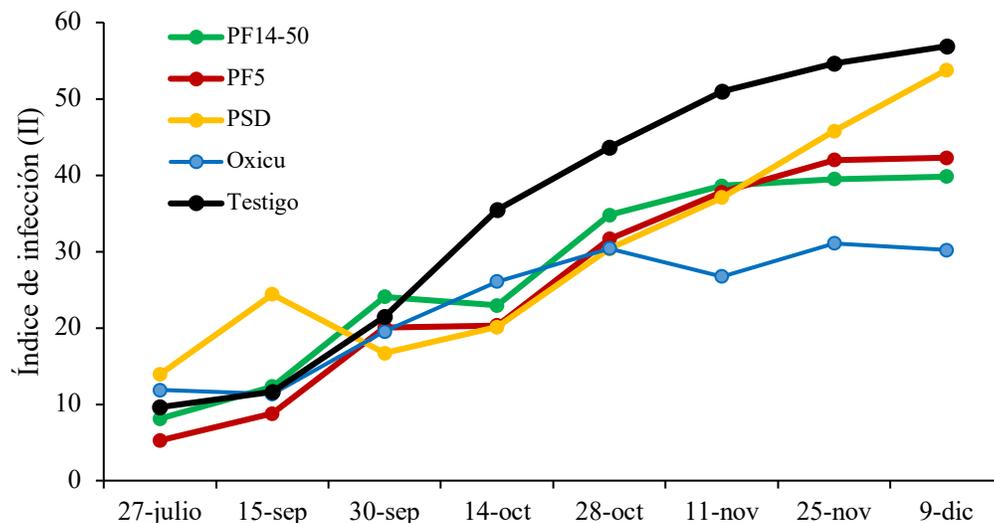


Figura 1. Dinámica de los índices de infección (II) de la roya del café registrados durante la evaluación en campo de bioactivadores de resistencia vegetal durante el año 2018 en el Cantón el Chaparrón, municipio de Tapachula, Chiapas, México.

Como se puede apreciar en la Figura 1, de manera general los índices de infección (II) por roya incrementaron conforme al tiempo, con excepción de un ligero pico observado el 15-sep en el tratamiento PSD. A partir del 14 de octubre la curva de la epidemia se estabilizó para el caso del oxiclورو de cobre,

mientras que en el caso de los bioactivadores PF14-50 y el PF5 las curvas de la enfermedad fueron incrementando, aunque este incremento fue menos pronunciado en comparación con el PSD y el testigo. Al final del ensayo, el oxiclورو de cobre registró un valor promedio menor de II

con respecto al PF5 y PF14-50 (10 y 12 unidades menos, respectivamente).

Con respecto a los índices de infección acumulados (IIa) para cada uno de los tratamientos (Figura 2), el análisis indicó diferencias entre tratamientos en cuanto al área bajo la curva del progreso de la enfermedad (abcpe; $F_{4,50} = 2.59$; $P < 0.05$). El tratamiento PF5 fue el que presentó un valor promedio de abcpe (8559.0 ± 759.8) significativamente menor que el testigo (11937.5 ± 816.9), aunque fue estadísticamente similar

a los demás tratamientos. No obstante, al final del experimento el fungicida a base de oxiclورو de cobre retrasó la enfermedad por 42 días con respecto al testigo, mientras que el bioactivador PF5 causó un retraso de 27 días. Aunque los bioactivadores PF14-50 y PSD acumularon estadísticamente la misma cantidad de enfermedad (abcpe) con respecto al testigo, causaron retrasos importantes en el progreso de la roya, los cuales fueron de 22 y 15 días, respectivamente.

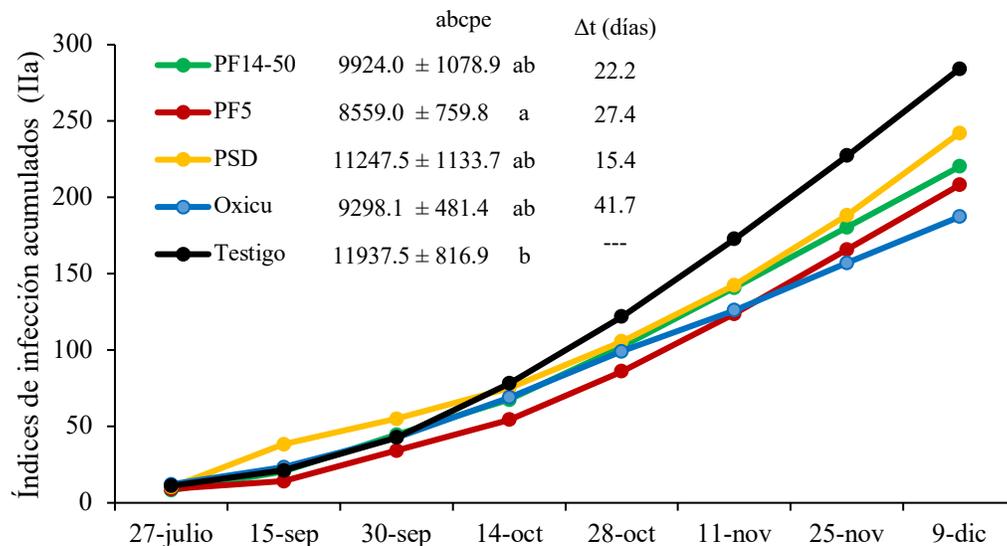


Figura 2. Índices de infección acumulados (IIa) de la roya del café durante la evaluación en campo de los bioactivadores de resistencia vegetal. Se muestran los valores promedio de área bajo la curva (abcpe ± error estándar) por tratamiento (valores con la misma letra son significativamente iguales, $P > 0.05$). Asimismo, se proporciona el valor de Δt (días) por tratamiento en comparación con el control. Los valores finales de IIa (al 9-dic) fueron considerados como x_{05} para tratamiento y x_0 para testigo en el cálculo de Δt (Whitney, 1976).

Los tres complejos bioactivadores usados en el presente trabajo mostraron potencial para el control de la roya del café (*Hemileia vastatrix*), pero solamente el bioactivador PF5 fue diferente al testigo (agua) en cuanto al abcpe (Figura 2). Por tratarse de compuestos que ejercen reacción de respuesta de defensa vegetal, los bioactivadores evaluados se consideran dentro del grupo de los inductores de la resistencia vegetal (IRVs), los cuales suelen estar formulados a base de una mezcla especial de oligosacáridos y otras moléculas, así como algunos micronutrientes y azufre que son requeridos por las plantas para activar las defensas vegetales y estimular un adecuado crecimiento.

De manera general, los IRVs son compuestos o sustancias que pueden ser de origen natural o sintético, endógenos (producido por la planta) o exógenos (producidos por patógenos), microbiano, animal o vegetal y son también conocidos como bioactivadores de la defensa o inmunidad vegetal o simplemente *elicitors* (Meena et al., 2022). Es importante mencionar que todas las plantas poseen un mecanismo natural de defensa que puede permanecer inactivo o latente, hasta que es activado naturalmente con la

llegada de un patógeno de manera inducida previo a la llegada del patógeno, tal como en este trabajo (Cai et al., 2023).

Por su naturaleza química los IRVs pueden ser proteínas, péptidos, hormonas, carbohidratos (oligosacáridos, polisacáridos, monosacáridos, incluyendo nanoformas de ~100 nm), glucopéptidos, lípidos, lipopéptidos, lipopolisacáridos, metabolitos de bajo peso molecular, vitaminas, ácidos y compuestos químicos (Alexandersson et al., 2016; Guarnizo et al., 2020; Kongala y Kondreddy 2023; Ochoa-Meza et al., 2021; Yang et al., 2022; Zhu et al., 2024). En las plantas, los IRVs desencadenan mecanismos de resistencia vegetal básicamente en tres etapas: 1) reconocimiento de los inductores, 2) transducción de señales y activación de genes, y 3) expresión de la respuesta de defensa (Zhu et al., 2024). Estas respuestas de defensa pueden manifestarse mediante la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), producción de compuestos antioxidantes de origen enzimático o no enzimático, metabolitos secundarios, activación de la maquinaria enzimática de defensa (quitinasas, glucanasas, proteasas,

celulasas, lipasas, etc.), producción de fitoalexinas, modificación de la composición de la pared celular, acumulación de melatonina, carotenoides y poliaminas, principalmente (Kaur et al., 2022).

Se sabe que la inducción de resistencia se dispara de manera natural mediante el reconocimiento y detección de elicitores o patrones moleculares asociados al patógeno (PAMPs: *pathogen-associated molecular patterns*) a través de receptores específicos (PRRs) ubicados en la superficie celular, mecanismo conocido como Inmunidad Disparada por PAMPs (PTI). Los PRRs a su vez disparan la señalización mediada por el Ca^{2+} , producción de ROS, activación de proteínas-quinasas (p.ej. proteína-quinasa dependientes de calcio, CPKs; o activadas por mitógeno MAPKs) y reprogramación transcripcional para dar paso a la PTI. Algunos patógenos han evolucionado para contrarrestar la PTI mediante la producción de efectores proteicos que introducen a la célula vegetal y que anulan la PTI (mecanismo conocido como susceptibilidad disparada por efectores proteicos, ETS). Aparte de la PTI, un mecanismo de defensa vegetal utiliza receptores proteicos intracelulares que bloquean estos efectores del patógeno, causando la Inmunidad disparada por efectores (ETI) que induce la muerte celular (conocida como reacción de hipersensibilidad, HR) y confina al patógeno en el sitio foliar necrosado. Otro mecanismo de inmunidad conocido ocurre en el caso de las infecciones virales, en donde los PAMPs virales corresponden a RNA de doble cadena (dsRNA) y los PRRs inducen la producción de RNAi (RNA de interferencia) que se adhieren a los dsRNA y no permiten su replicación dentro de la célula causando su degradación. Para contrarrestar este tipo de PTI, los virus han evolucionado para producir proteínas de cubierta (efectores) que suprimen a los RNAi. Como respuesta, las plantas activan a los genes R y producen proteínas-R (proteínas de respuesta) que inactivan a los efectores virales desencadenando con ello la ETI. Otros dos tipos de resistencia que han desarrollado las plantas son la Resistencia Sistémica Inducida (RSI) y la Resistencia Sistémica Adquirida (RSA), dependientes del jasmonato (JA) y/o etileno (Et) y del ácido salicílico (AS), respectivamente, las cuales pueden proteger tejidos no infectados y distantes al punto de infección. Además de la RSA, la PTI y la ETI también son dependientes de AS, aunque la RSA produce una respuesta más duradera y ofrece mayor protección ante una variedad de patógenos. Aunque fenotípicamente la RSA y RSI son análogas, su principal diferencia radica en la molécula señal activadora, además de que la RSI es inducida por microorganismos asociados a la rizósfera vegetal, mediante la producción de ciertos compuestos o moléculas (Meena et al., 2022; Zhou y Wang, 2018; Zhu et al., 2024).

La respuesta o resistencia vegetal también puede inducirse mediante la aplicación de IRVs vía foliar, tal como se aplicaron los bioactivadores en el presente estudio. Algunos IRVs se han evaluado en diferentes solanáceas como chile, tomate, papa y tabaco contra patógenos como el tizón tardío

(*Phytophthora infestans*, *P. capsici*), pudrición vascular (*Ralstonia solanacearum*), antracnosis (*Colletotrichum coccodes*), pudrición gris (*Botrytis cinerea*), entre otros y con resultados favorables (Alexandersson et al., 2016). En trigo se ha evidenciado la lignificación de células y acumulación de compuestos fenólicos, además de la activación de genes de resistencia contra patógenos foliares (Ochoa-Meza et al., 2021), mientras que en arroz y tabaco se observó el cierre estomático, producción de ROS y de cuatro fitoalexinas, además de muerte celular con la aplicación del oligosacárido manan, una molécula considerada como señal de infección o de peligro (DAMPs: *danger-associated molecular pattern*) (Zang et al., 2019). Estos elicitores DAMPs son análogos a los PAMPs (mencionados previamente), MAMPs (*microbe-associated molecular patterns*) y HAMPs (*herbivore-associated molecular pattern*), dependiendo del origen de la molécula señal (Meena et al., 2022). Un ejemplo de HAMPs son los compuestos presentes en las secreciones salivares de larvas del insecto herbívoro *Spodoptera frugiperda* (gusano cogollero), los cuales funcionan como moléculas señal y provocan reacciones de defensa en plantas de maíz (Acevedo et al., 2018). Algunos otros ejemplos de actividad IRVs inducida se observó en plantas de garbanzo, registrándose una mayor actividad peroxidasa, polifenol-oxidasa, mayor acumulación de fenoles, peróxido de hidrógeno y proteínas después del suministro de AS a 1.5 mM (War et al., 2011). En plantas de limón se aplicaron los inductores AS, *Azospirillum brasilense* (cepa Cd) y quitosán contra el HLB (Huanglongbing, *Candidatus Liberibacter asiaticus*), las cuales mostraron estadísticamente menor cantidad de células bacterianas que las plantas control a los 5 meses posttratamiento (Trinidad-Cruz et al., 2019). En maíz, el suministro de células de *A. brasilense* y sus metabolitos extracelulares (incluyendo fitohormonas y AS) provocó la activación de genes de defensa e indujo un mayor crecimiento vegetal (Fukami et al., 2017).

Se ha reportado que la RSA es la forma de resistencia vegetal que ha ofrecido los mejores resultados, pues su efecto es más duradero en el tiempo y puede hacer blanco contra una variedad de patógenos. Como tal, algunas formas que se han explorado para incrementar la producción endógena de ácido salicílico (AS) y activar la RSA es la aplicación de análogos químicos del AS (ácido acetilsalicílico, INA: 2,6- ácido dicloroisonicotínico, ASB: acibenzolar S-metil; benzotiadiazol), quitina, quitosán, fosfitos, laminarina (carbohidrato estructural en el alga café *Laminaria digitata*), quitoooligosacáridos, oligogalacturonidos, extractos vegetales y de levadura, aceites esenciales, biológicos (*Bacillus subtilis* y *Trichoderma harzianum*), ravs UV-C y estrés mecánico inducido. Sin embargo, la eficiencia de los IRVs ha sido altamente variable y poco adoptada en la práctica, en parte al alto nivel de presión de las enfermedades en monocultivos que pudiera ser exacerbado por el cambio climático y los patrones variables de temperatura y precipitación. Por tal razón se sugiere usar estos IRVs en condiciones de baja intensidad de enfermedad, combinar con otras estrategias o

mecanismos diferentes a la RSA (como la RSI) y dar al cultivo las condiciones adecuadas de crecimiento y nutrición (incluyendo nutrición adecuada) para fortalecer el sistema inmune vegetal natural (Urban et al., 2022). En algunos casos, la eficiencia de la aplicación de los IRVs es importante, así como conocer la morfología foliar, por lo que el uso de coadyuvantes que disuelvan la cera cuticular es crucial para poder alcanzar las células epidérmicas (incluyendo células guardas estomáticas) y disparar la respuesta inmune. Asimismo, es importante considerar y conservar la microbiota natural residente de la filósfera vegetal, pues su actividad enzimática puede jugar un rol importante en la transformación de algunos carbohidratos complejos en oligosacáridos que ejercen actividad inductora (Meena et al., 2022; Trouvelot et al., 2014).

La inducción o activación de los mecanismos de defensa vegetal contra fitopatógenos no es una herramienta nueva, pues ha sido una estrategia explorada desde hace más de 100 años y aunque algunos inductores son relativamente de bajo costo comercial, su implementación en la práctica aún es baja (Alexandersson et al., 2016). Sin embargo, por su bajo impacto ambiental, los IRVs han cobrado notable importancia en las últimas dos décadas ante la preocupación mundial que ha causado la actividad humana sobre el ambiente (incluyendo la contaminación por el uso de plaguicidas sintéticos y el cambio climático) y la creciente demanda por el consumo de alimentos inocuos y una agricultura sustentable (Jiang et al., 2021; Zhu et al., 2024). Por tal razón, los bioactivadores usados en el presente experimento representan una potencial herramienta para el control de la roya del café. Al cierre de la edición del presente artículo, la empresa SAS (Sustainable Agro Solutions S.A.) ha informado que los bioactivadores evaluados en este trabajo fueron moléculas que pasaron por un proceso de optimización y potenciación en su actividad como IRVs, siendo la base para la formulación del producto Cafedak®. Esta patente disponible comercialmente, es un bioactivador de las defensas naturales y estimulante del crecimiento en plantas de café, mismo que de acuerdo con su etiqueta contiene un macronutriente (azufre), microelementos (boro, hierro, zinc, molibdeno, manganeso) y compuestos orgánicos con actividad IRVs (consultado en www.sas-agri.com). En Tripathi et al. (2022) se muestran varios ejemplos del rol y los efectos que tienen estos nutrientes en la reducción de la severidad de varias enfermedades y en varios cultivos, por lo que la combinación de nutrientes y los IRVs contenidos en Cafedak® ofrecen una alternativa para el manejo de fitopatógenos económicamente importantes como la roya del café, aunado a su perfil ambientalmente amigable.

4. Conclusión

Las plantas de café asperjadas con el bioactivador PF5 acumularon significativamente menor cantidad de enfermedad que las plantas testigo, aunque fue similar a las plantas asperjadas con el oxiclورو de cobre, PF14-50 y PSD.

Al final del experimento el oxiclورو de cobre retrasó la enfermedad por 42 días, mientras que el PF5, PF14-50 y PSD retrasaron 27, 22 y 15 días, respectivamente, el progreso de la roya en comparación con el testigo.

Se concluye que el PF5 y el oxiclورو de cobre fueron los tratamientos más efectivos, además de hacer evidente el potencial de estos bioactivadores de defensa vegetal (IRVs) para reducir los niveles de severidad de la roya del café.

Agradecimiento

Los autores agradecen al Sr. Ignacio Méndez por haber otorgado todas las facilidades para realizar el experimento en su propiedad.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener conflicto de intereses alguno con el uso de los productos evaluados en el presente trabajo.

Referencias

- Acevedo FE, Peiffer M, Ray S, Meagher R, Luthe DS, Felton GW. 2018 . Intraspecific differences in plant defense induction by fall armyworm strains. *New Phytologist* 218(1): 310-321.
- Achicanoy H. 2000 . Descripción cuantitativa de las epidemias de las plantas. *Revista Facultad Nacional Agronomía Medellín* 53(1): 941-968.
- Alexandersson E, Mulugeta T, Lankinen Å, Liljeroth E, Andreasson E. 2016. Plant resistance inducers against pathogens in *Solanaceae* species-from molecular mechanisms to field application. *International Journal of Molecular Sciences* 17(10): 1673.
- Barrera JF, Avelino J, Huerta G, Herrera J, Gómez J. 2013 . La roya del café, crónica de una devastación anunciada. *ECOFRONTAS* 49: 22-25.
- Barrera-Gaytán JF, Gómez-Ruiz J. 2019 . Plagas y enfermedades del café: características, manejo y retos. En: Bello-Baltazar E, Soto-Pinto L, Huerta-Palacios G, Gómez-Ruiz J. (eds). *Caminar el cafetal: perspectivas socioambientales del café y su gente*. Juan Pablos Editores. San Cristobal de las Casas, Chiapas, México. Pp. 115-139.
- Barrera-Gaytán JF, Pérez-Quintanilla J, Pinson-Rincón E, Díaz-Vicente VM, Rivas-Platero GG. 2014. Plagas y enfermedades del café: Identificación, bioecología y manejo agroecológico. *ECOSUR-UNACH-IICA*. México.
- Cai M, Zhang S, Su L, Li B, Li F, Borrás-Hidalgo O, Sun X, Sun Q, Sun L, Zhao C, Zhao L. 2023. Application of oligosaccharides to induce innate immunity in plants. *BIO Web of Conferences* 72: 01004.
- Canet-Brenes G, Soto Viquez C, Ocampo Thomason P, Rivera Ramirez J, Navarro Hurtado A, Guatemala Morales GM, Villanueva Rodríguez S. 2016. La situación y tendencias de la producción de café en América Latina y el Caribe. *CIATEJ-IICA*. Costa Rica.
- Carlier J, De Waele D, Escalant JV. 2002. Evaluacion global de la resistencia de los bananos al marchitamiento por *Fusarium*, enfermedades de las manchas foliares causadas por *Mycosphaerella* y nemátodos. Guías técnicas. INIBAP 6. Red Internacional para el mejoramiento del banano y plátano.

- Francia
- Delgado-Oramas BP. 2020. La resistencia inducida como alternativa para el manejo de plagas en las plantas de cultivo. *Revista de Protección Vegetal* 35(1): 1-12.
- Fukami J, Ollero FJ, Megías M, Hungria M. 2017. Phytohormones and induction of plant-stress tolerance and defense genes by seed and foliar inoculation with *Azospirillum brasilense* cells and metabolites promote maize growth. *AMB Express* 7(1): 153.
- Guarnizo N, Oliveros D, Murillo-Arango W, Bermúdez-Carmona MB. 2020. Oligosaccharides: defense inducers, their recognition in plants, commercial uses and perspectives. *Molecules* 25(24): 5972.
- Henderson TP. 2019. La roya y el futuro del café en Chiapas. *Revista Mexicana de Sociología* 81(2): 389-416.
- Hernández C, López L, Sánchez L. 2021. Agentes de control biológico de la roya del café ¿Cómo funcionan y qué tan efectivos son? *BioTecnología* 25(1): 21-30.
- INEGI. 2017. Instituto Nacional de Estadística y Geografía. Anuario estadístico y geográfico de Chiapas 2017. Recuperado de <http://www.inegi.org.mx> Fecha de consulta: 27 de marzo de 2024.
- Jiang S, Wang F, Li Q, Sun H, Wang H, Yao Z. 2021. Environment and food safety: A novel integrative review. *Environmental Science and Pollution Research* 28(39): 54511-54530.
- Kaur S, Samota MK, Choudhary M, Choudhary M, Pandey AK, Sharma A, Thakur J. 2022. How do plants defend themselves against pathogens-biochemical mechanisms and genetic interventions. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 28(2): 485-504.
- Köhl J, Kolnaar R, Ravensberg WJ. 2019. Mode of action of microbial biological control agents against plant diseases: relevance beyond efficacy. *Frontiers in Plant Science* 10: 845.
- Kongala SI, Kondreddy A. 2023. A review on plant and pathogen derived carbohydrates, oligosaccharides and their role in plant's immunity. *Carbohydrate Polymer Technologies and Applications* 6: 100330.
- Libert-Amico A, Paz-Pellat F. 2018. Del papel a la acción en la mitigación y adaptación al cambio climático: la roya del café en Chiapas. *Madera y Bosques* 24: e2401914.
- Meena M, Yadav G, Sonigra P, Nagda A, Mehta T, Swapnil P, Harish, Marwal A. 2022. Role of elicitors to initiate the induction of systemic resistance in plants to biotic stress. *Plant Stress* 5: 100103.
- Mohapatra NK, Mukherjee AK, Rao AVS, Nayak P. 2008. Disease progress curves in the rice blast pathosystem compared with the logistic and gompertz models. *ARPN Journal of Agricultural and Biological Science* 3(1): 28-37.
- Ochoa-Meza LC, Quintana-Obregón EA, Vargas-Arispuro I, Falcón-Rodríguez AB, Aispuro-Hernández E, Virgen-Ortiz JJ, Martínez-Téllez MÁ. 2021. Oligosaccharins as elicitors of defense responses in wheat. *Polymers*, 13(18): 3105.
- Pandit MA, Kumar J, Gulati S, Bhandari N, Mehta P, Kalyal R, Rawat CD, Mishra V, Kaur J. 2022. Major biological control strategies for plant pathogens. *Pathogens* 11(2): 273.
- Ramírez-Rodríguez RF, Castañeda-Hidalgo E, Robles C, Santiago-Martínez GM, Pérez-León MI, Lozano-Trejo S. 2020. Efectividad de biofungicidas para el control de la roya en plántulas de café. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 11(6): 1403-1412.
- Retinassababady C, Jeyalakshmi C. 2014. Bio-Fungicides: the best alternative for sustainable food security and ecosystem. En Kharwar RN, Upadhyay RS, Dubey NK, Raghuwanshi R. (eds). *Microbial diversity and biotechnology in food security*. Pp. 401-411.
- SIAP. 2023. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. Anuario Estadístico de la Producción Agrícola 2023. Recuperado de <https://nube.siap.gob.mx/cierreagricola/> Fecha de consulta: 29 de marzo de 2024.
- Soenens A, Imperial J. 2020. Biocontrol capabilities of the genus *Serratia*. *Phytochemistry Reviews* 19(3): 577-587.
- Talhinhas P, Batista D, Diniz I, Vieira A, Silva DN, Loureiro A, Tavares S, Pereira AP, Azinheira HG, Guerra-Guimarães L, Várzea V, Silva MC. 2017. The coffee leaf rust pathogen *Hemileia vastatrix*: one and a half centuries around the tropics. *Molecular Plant Pathology* 18(8): 1039-1051.
- Toniutti L, Breieler JC, Etienne H, Campa C, Doubeau S, Urban L, Lambot C, Pinilla JCH, Bertrand B. 2017. Influence of environmental conditions and genetic background of *Arabica* coffee (*C. arabica* L.) on leaf rust (*Hemileia vastatrix*) pathogenesis. *Frontiers in Plant Science* 8: 2025.
- Trinidad-Cruz JR, Rincón-Enríquez G, Quiñones-Aguilar EE, Arce-Leal AP, Leyva-López NE. 2019. Inductores de resistencia vegetal en el control de *Candidatus Liberibacter asiaticus* en árboles de limón (*Citrus aurantifolia*) mexicano. *Revista Mexicana de Fitopatología* 37(2): 304-317.
- Tripathi R, Tewari R, Singh KP, Keswani C, Minkina T, Srivastava AK, De Coarto H, Sansinenea E. 2022. Plant mineral nutrition and disease resistance: A significant linkage for sustainable crop protection. *Frontiers in Plant Science* 13: 883970.
- Trouvelot S, Héloir MC, Poinssot B, Gauthier A, Paris F, Guillier C, Combiér M, Trdá L, Daire X, Adrian M. 2014. Carbohydrates in plant immunity and plant protection: roles and potential application as foliar sprays. *Frontiers in Plant Science* 5: 592.
- Urban L, Lauri F, Ben Hdech D, Aarouf J. 2022. Prospects for increasing the efficacy of plant resistance inducers stimulating salicylic acid. *Agronomy* 12: 3151.
- Van der Plank JE. 1963. *Plant diseases: epidemics and control*. Academic Press. New York. 349 p.
- War AR, Paulraj MG, War MY, Ignacimuthu S. 2011. Role of salicylic acid in induction of plant defense system in chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Plant Signaling and Behavior*, 6(11): 1787-1792.
- Whitney PJ. 1976. *Microbial plant pathology*. Hutchinson & Co Ltd. London.
- Yang B, Yang S, Zheng W, Wang Y. 2022. Plant immunity inducers: From discovery to agricultural application. *Stress Biology* 2(1): 5.
- Zang H, Xie S, Zhu B, Yang X, Gu C, Hu B, Gao T, Chen Y, Gao X. 2019. Mannan oligosaccharides trigger multiple defence responses in rice and tobacco as a novel danger-associated molecular pattern. *Molecular Plant Pathology* 20(8): 1067-1079.
- Zhou M, Wang W. 2018. Recent advances in synthetic chemical inducers of plant immunity. *Frontiers in Plant Science* 9: 1613.
- Zhu F, Cao MY, Zhang QP, Mohan R, Schar J, Mitchell M, Chen H, Liu F, Wang D, Fu ZQ. 2024. Join the green team: Inducers of plant immunity in the plant disease sustainable control toolbox. *Journal of Advanced Research* 57: 15-42.



ARTÍCULO DE REVISIÓN

Sistema inmune innato vegetal

Wendy Ivette Aragón-Gómez*, Beatriz Adriana García-Velázquez, Citlali Sarahi Delgado-Guizar

Instituto de Biociencias, Universidad Autónoma de Chiapas. Tapachula, Chiapas, México.

Resumen

Debido a su naturaleza sésil, las plantas no pueden escapar fácilmente de situaciones estresantes. Sin embargo, desarrollaron un sistema inmune innato de múltiples capas para contrarrestar ciertas tensiones. Los componentes altamente especializados del sistema inmune permiten a la planta detectar una situación peligrosa. Estas señales de peligro pueden tener orígenes exógenos (PAMPs) o endógenos (DAMPs) y ser reconocidas a través de receptores de reconocimiento de patrones (PRR), lo que conduce a la inmunidad desencadenada por PAMPs (PTI) o por efectores (ETI). Después de la activación de los receptores de reconocimiento de patrones de las plantas, la señal suele transmitirse hacia la fosforilación de proteínas, provocando respuestas inmunes relacionadas con los patógenos, como oscilaciones en el flujo de Ca^{2+} , la acumulación de especies reactivas de oxígeno, acumulación de calosa, producción de fitohormonas y cambios transcripcionales. En esta revisión, se realiza un compendio sobre las características moleculares y bioquímicas de los mecanismos de defensa en las plantas.

Palabras clave:

Cutícula
Defensa vegetal
Efectores
Pared celular
Patógenos
Receptores

Keywords:

Cuticle
Plant defense
Effectors
Cell wall
Pathogens
Receptors

The plant immune system

Abstract

Due to the sessile nature, plants cannot simply escape a stressful situation. However, plants developed a multilayered immune system to counteract certain stresses. Highly specialized components of the immune system enable the plant to detect a dangerous situation. These danger signals can have exogenous (PAMPs) or endogenous (DAMPs) origins and be recognized through surface-localized pattern recognition receptors (PRRs), which leads to PAMP-triggered immunity (PTI) or effector-triggered immunity (ETI). After the activation of plant pattern recognition receptors, the signal is usually transmitted downstream by protein phosphorylation; it causes disease-related immune responses such as downstream Ca^{2+} signal inflow, reactive oxygen accumulation, callose accumulation, phytohormones production, and transcriptional changes. In this work a compendium is realized on the molecular and biochemical characteristics of the defense mechanisms in the plants.

* Autor para correspondencia:

Instituto de Biociencias,
Universidad Autónoma de
Chiapas.
Boulevard Príncipe Akishino
sin número, Colonia
Solidaridad 2000, C.P.
30798.
Tapachula, Chiapas, México.
Teléfono: + 52 9626427972.
Correo-electrónico:
wendy.aragon@unach.mx

1. Introducción

Las plantas están expuestas constantemente a condiciones ambientales adversas y en comunicación recíproca con insectos, nematodos, virus, bacterias y hongos tanto benéficos como patógenos, durante las distintas etapas de su desarrollo (Dangl et al., 2013). Uno de los primeros sitios donde las plantas interactúan con los fitopatógenos, es la cutícula, por lo que es considerada la primera línea de defensa contra éstos. Recientemente se ha descrito que los componentes químicos de la cutícula como la cutina y las ceras regulan íntimamente no solo el desarrollo y defensa de las plantas, sino también el crecimiento de los fitopatógenos (Aragón et al., 2017).

En la interacción planta-fitopatógenos, las respuestas de defensa pueden derivarse de las barreras preformadas como la cutícula, o inducirse en cada una de sus células que forman parte del sistema inmune innato vegetal (Boller y Felix, 2009; Jones y Dangl, 2006). Las plantas han desarrollado una compleja y robusta adaptación para reconocer y/o percibir tanto señales propias, como exógenas, para activar mecanismos de defensa. La activación de respuestas de defensa depende del reconocimiento específico del tipo de patógeno, por medio de diálogo molecular entre los organismos involucrados. Se han descrito dos principales niveles de defensa. El primero, implica la percepción y reconocimiento de moléculas o elicitores altamente conservadas y específicas de microorganismos patógenos, denominadas de manera general como PAMPs (del inglés, *Pathogen-associated molecular patterns*), a través de receptores PRR (del inglés, *Pattern recognition receptors*), y de moléculas propias de la planta liberadas tras el ataque del fitopatógeno denominadas DAMPs (del inglés, *Damage-associated molecular patterns*), entre ellas, monómeros de cutina y/o fragmentos de pared celular; las cuales activan el mecanismo de defensa denominado PTI (del inglés, *PAMP-*

triggered immunity) (Boller y Felix, 2009; Macho y Zipfel, 2014).

Un segundo nivel de defensa puede originarse con patógenos que evaden la PTI y ocurre típicamente de manera específica entre planta-patógeno, en el cual proteínas de virulencia producidas por el patógeno (llamadas efectoras), son reconocidas por receptores intracelulares del tipo NLR (del inglés, *Nucleotide-binding leucine-rich repeat*) y activan la inmunidad activada por efectores, llamada ETI (del inglés, *Effector-triggered immunity*) (Figura 1). El reconocimiento intracelular de los efectores se asocia a menudo con la muerte celular programada, PCD (del inglés, *Programmed Cell Death*), conocida como respuesta hipersensible, HR (del inglés, *Hypersensitive Response*), y la posterior inducción de la resistencia sistémica adquirida, SAR, (del inglés, *Systemic Acquired Resistance*) (Hacquard et al., 2017; Jones y Dangl, 2006). Inmediatamente después de la percepción de PAMPs/DAMPs/efectores, una respuesta temprana es la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), seguido de cascadas de señalización que implican flujos de Ca^{2+} y cascadas de MAP cinasas, MAPK (del inglés, *Mitogen-Activated Protein Kinases*), deposición del polisacárido calosa para reforzar la pared celular y producción de fitoalexinas. Todas estas señales convergen en la producción de hormonas vegetales, entre ellas etileno (ET), ácido jasmónico (AJ), ácido salicílico (AS) y ácido abscísico (ABA), que desencadenan una reprogramación transcripcional de genes relacionados con la defensa (Dodds y Rathjen, 2010; Göhre y Robatzek, 2008).

Por lo anterior, en esta revisión se realizó un compendio de la literatura científica reciente sobre el sistema inmune innato vegetal, así como los principales actores que participan en el reconocimiento de moléculas propias y ajenas; y los mecanismos moleculares que se desencadenan en respuesta a éste.

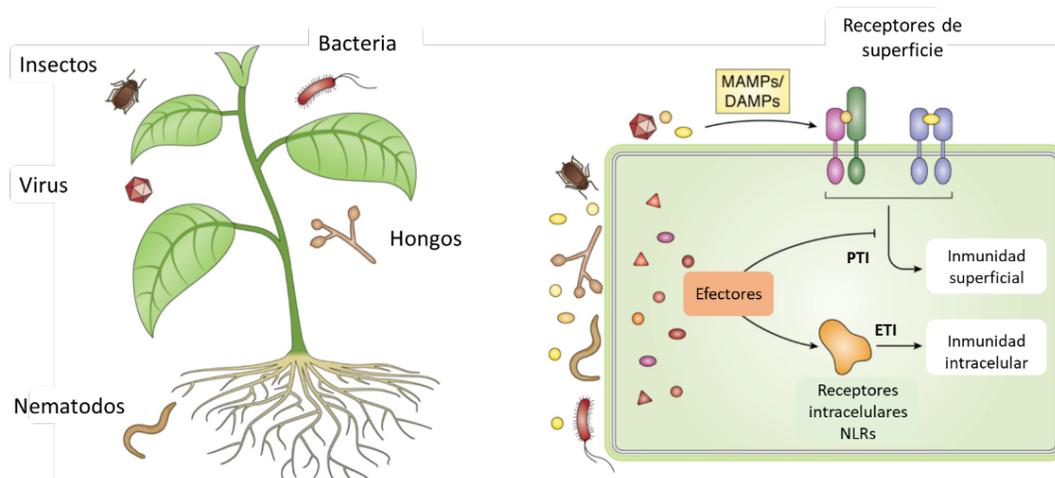


Figura 1. Esquema general de la inmunidad de las plantas. A la izquierda, las plantas están expuestas a diversos patógenos que causan enfermedades, tanto a través de sus superficies aéreas como estructuras subterráneas. A la derecha, los patógenos producen MAMPs o generan DAMPs que pueden ser percibidos por receptores para iniciar la inmunidad superficial (PTI). También liberan efectores para suprimir las vías de señalización y éstos pueden ser detectados por receptores intracelulares (NLR) para iniciar la inmunidad intracelular (ETI). Imagen modificada de Bentham et al. (2020).

2. Sistema inmune innato, mecanismo de defensa inducible

Durante su desarrollo, las plantas se enfrentan a una gran variedad de patógenos. Para considerarse patógeno, los microorganismos deben acceder al interior de la planta, ya sea penetrando la superficie de la hoja o la raíz directamente o entrando a través de aberturas naturales, como estomas o bien mediante heridas. Debido a su naturaleza sésil, las plantas no pueden evitar el peligro simplemente alejándose o escondiéndose, además, carecen de un sistema inmunitario adaptativo, como si lo tienen los animales. Las células vegetales son autónomas para percibir o reconocer a los patógenos y activar mecanismos de defensas que los detengan, por lo que han desarrollado un sistema inmune innato, capaz de distinguir las señales exógenas derivadas de los patógenos, de las propias (endógenas) (Jones y Dangl, 2006).

El sistema inmune innato vegetal, está constituido por niveles de defensa sucesivos descritos en el modelo más aceptado hasta el momento, conocido como zig-zag, que involucra dos ramas de estrategias moleculares de defensa. En la primera, intervienen mecanismos de reconocimiento de patrones moleculares del patógeno (PAMPs) o de patrones asociados al daño en la planta derivado por la acción del patógeno (DAMPs) a través de los receptores de reconocimiento de patrones (PRR) anclados a la superficie celular, para inducir un conjunto de respuestas denominadas colectivamente como inmunidad desencadenada por estos patrones, PTI (Boller y Felix, 2009; Jones y Dangl, 2006). De manera paralela, los patógenos han co-evolucionado con su hospedero y desarrollaron estrategias de supresión de la PTI, mediante la síntesis de moléculas llamadas efectores, que le permiten asegurar su colonización. Sin embargo, para contrarrestar esta función, las plantas desarrollaron un segundo nivel de inmunidad innata activada por efectores denominada ETI, basada en el reconocimiento directo o indirecto de los efectores por parte de un grupo de receptores o proteínas de resistencia (R) (Dodds y Rathjen, 2010). La mayoría de los genes R codifican para receptores del tipo NB-LRR (con dominio de unión a nucleótidos y repeticiones ricas en leucinas), los cuales confieren resistencia a diversos hongos, bacterias, virus e insectos patógenos. ETI es una respuesta PTI acelerada y amplificada en el sitio de infección, resultando en una respuesta celular hipersensible, que limita la expansión del patógeno al resto de las células.

La activación de la respuesta inmune en las plantas desencadena cascadas de eventos de señalización complejos; por lo tanto, la resistencia o susceptibilidad de una especie vegetal depende de la interacción entre el patógeno y la planta. La colonización por el patógeno y el desarrollo de la enfermedad solo tiene lugar cuando el patógeno tiene la capacidad de evadir las barreras físicas de defensa y las respuestas inmunes PTI y ETI.

2.1. Alteración del flujo iónico y activación de MAPK

Tras el reconocimiento de los PAMPs/DAMPs o de efectores, se desencadena una serie de respuestas tempranas que incluyen: flujo de iones a través de la membrana plasmática, que provoca la entrada de H^+ y de Ca^{2+} en la célula, y la salida de K^+ y aniones al espacio extracelular. La concentración de Ca^{2+} es de particular interés, ya que se sabe que éste funciona como segundo mensajero en varios procesos celulares. La aplicación exógena de PAMPs como flagelina (flg22) y EF-Tu (elf8), de DAMP como Pep1 (del inglés, *Plant elicitor peptides*) y el efector AvrRpm1 de *Pseudomonas syringae* DC3000 a plántulas de *Arabidopsis*, genera un aumento en el calcio citosólico, que está asociado con la activación transcripcional de algunos genes de defensa (Flury et al., 2013; Ranf et al., 2011). El flujo de calcio también es requerido para que se lleve a cabo la respuesta hipersensible y la producción de ROS. Además de los flujos de iones, se activan cascadas de fosforilación de gran importancia en distintas vías de transducción y amplificación de señales intracelulares, mediadas por MAPK cinasas o por cinasas dependientes de calcio (CDPK), que fosforilan factores de transcripción implicados en la expresión de genes relacionados con la defensa (Boller y Felix, 2009).

2.2. Estrés oxidativo

Otra de las respuestas tempranas que ocurren es el denominado estrés oxidativo que involucra la producción de ROS. Las plantas están expuestas a un ambiente oxidante y producen constantemente ROS en los cloroplastos, mitocondrias, peroxisomas y otros sitios de la célula como el apoplasto, como consecuencia de procesos metabólicos primarios como la fotosíntesis y la respiración. La diversidad de ROS, incluyen el radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el radical hidroxilo (OH^{\bullet}), el singlete de oxígeno (1O_2) y el óxido nítrico (NO) (Lehmann et al., 2015; O'Brien et al., 2012). Sin embargo, tras el reconocimiento del patógeno, las células vegetales producen principalmente H_2O_2 , localizado en el apoplasto, cuya producción resulta de la participación de enzimas productoras de ROS, como las NADPH oxidasas, localizadas en la membrana plasmática (RBOH), peroxidasas y poliaminas oxidasas (PAO) (Torres et al., 2006). Las NADPH oxidasas de plantas son similares a las RBO (del inglés, *Respiratory Burst Oxidase*) de mamíferos y se identificaron por primera vez en arroz. En *Arabidopsis*, se han identificado 10 genes *Atrboh* (del inglés, *respiratory bursts oxidase homologs*), que codifican para NADPH oxidasas, pero solo *AtrbohD* y *AtrbohF* se han asociado con funciones redundantes en la defensa contra los patógenos *Hyaloperonospora arabidopsidis* y *P. syringae* (Torres et al., 2006; Torres y Dangl, 2005). Debido a su alta toxicidad, las ROS han estado implicadas no sólo en funciones antimicrobianas directas, sino también en mecanismos de señalización celular para la activación de otros mecanismos de defensa; por ejemplo, la producción de fitoalexinas, el reforzamiento de la pared celular, la respuesta hipersensible y la activación de genes de defensa.

2.3. Respuesta hipersensible y muerte celular programada

La muerte celular programada es un mecanismo imprescindible en todos los organismos multicelulares, está implicado desde regular procesos de crecimiento y desarrollo, hasta responder a condiciones ambientales. También, juega un papel importante en la inmunidad vegetal, activándose durante la ETI y dando lugar a la respuesta hipersensible, la cual está precedida por eventos tempranos anteriormente descritos. Se ha demostrado que la HR es altamente efectiva para el control de la infección causada por patógenos hemibiotrofos (*Xantomonas campestris* y *P. syringae*) y biotrofos (aquellos que requieren tejido vegetal vivo para asegurar su supervivencia) como *H. arabidopsidis*, ya que limita la disponibilidad de nutrientes en el sitio de la infección, con la finalidad de delimitar su propagación (Boller y Felix, 2009). Sin embargo, en patógenos necrotrofos (aquellos que completan su ciclo de vida usando tejido vegetal muerto) como *B. cinerea* y *S. sclerotiorum*, son los propios patógenos los que inducen la HR produciendo enzimas degradadoras de la pared celular, para macerar el tejido y beneficiar su propagación en la planta (Govrin y Levine, 2000).

2.4. Participación de las fitohormonas en la defensa

Las respuestas de defensa son el resultado de una compleja interacción entre diversas rutas, entre ellas la producción de ROS, de óxido nítrico, HR y producción de fitohormonas.

Dentro de las principales hormonas implicadas en la interacción planta-patógeno se ha identificado al AS, al AJ y al ET. Sin embargo, también se ha descrito la participación de otras hormonas como el ABA, las auxinas, las citoquininas (CK), las giberelinas (GA) y los brasinoesteroides (BR) (Figura 2). La caracterización genética y la contribución de estas rutas en los procesos de desarrollo y de defensa en las plantas, se ha dado a partir de la identificación de mutantes alteradas en su biosíntesis, percepción y transducción de señales. Dependiendo de la interacción planta-patógeno, se llegan a activar una o varias rutas de defensa mediadas por estas hormonas, las cuales pueden interactuar de manera sinérgica o antagónica, formando una compleja red de intercomunicación, que proporciona a la planta capacidad para ajustar sus respuestas de defensa (Denancé et al., 2013; Pieterse et al., 2009; Pieterse et al., 2012). Estas moléculas están involucradas en lo que parecen ser dos vías principales de señalización para la defensa de patógenos: una vía dependiente de ácido salicílico y una vía independiente de AS que involucra a AJ y ET. La señalización por AS regula positivamente la defensa de la planta típicamente (pero no exclusivamente), contra patógenos biotrofos, mientras que las vías AJ/ET comúnmente se han descrito como necesarias para la resistencia a patógenos necrotrofos e insectos herbívoros (Denancé et al., 2013) (Figura 2).

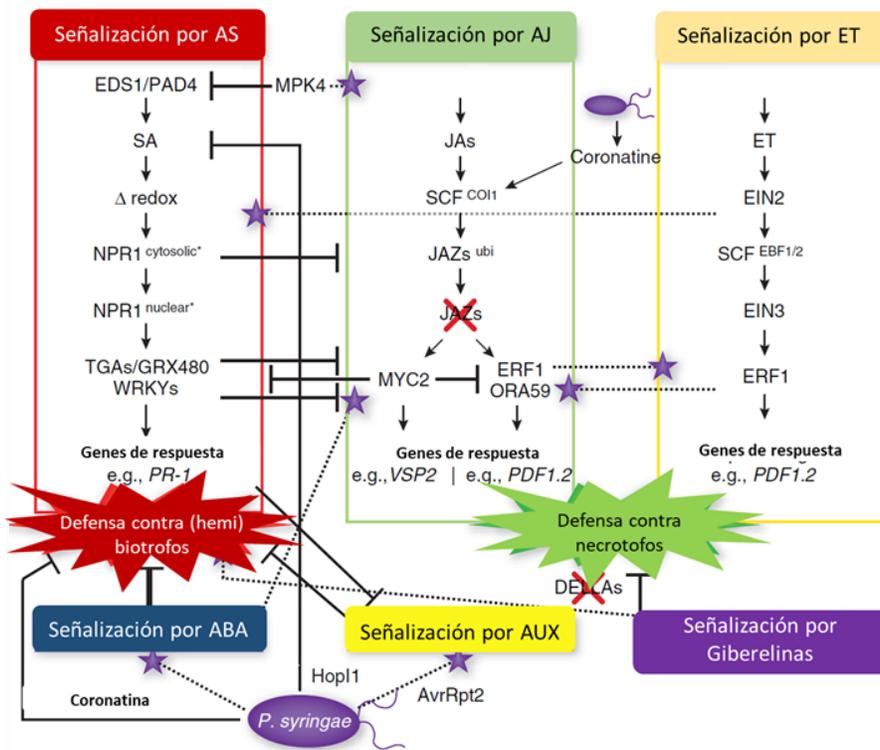


Figura 2. Redes de comunicación entre las fitohormonas en la respuesta inmune de las plantas. La comunicación entre las vías de señalización hormonal proporciona a la planta una gran capacidad reguladora que puede adaptar su respuesta de defensa a diferentes tipos de patógenos. Los componentes de transducción de señales con efecto positivo o de activación son mostrados con estrellas púrpuras; el efecto inhibitorio es mostrado con líneas truncadas (⊥). Imagen adaptada de Pieterse et al. (2009).

El papel del AS durante las interacciones planta-patógeno, fue registrado por primera vez en plantas de tabaco y pepino en 1990. Las plantas con mayor resistencia al virus del mosaico del tabaco (TMV) mostraron una fuerte acumulación de esta molécula, mientras que en plantas susceptibles a TMV, los niveles de SA se redujeron significativamente (Malamy et al., 1990). Diversos estudios han mostrado que los niveles endógenos de SA aumentan en el tejido infectado y que la aplicación exógena de esta molécula incrementa la resistencia a muchos patógenos (Maruri-López et al., 2019; Pieterse et al., 2012). Dentro de la ruta de señalización mediada por SA, destaca el gen *NPR1* (del inglés, *Non-expressor of PR genes 1*) por su papel como regulador maestro positivo de esta vía, actuando como activador transcripcional de genes relacionados con la defensa. La mayoría de éstos se activan transcripcionalmente y son llamados genes *PR* (del inglés, *Pathogenesis-Related*), entre ellos destacan *PR1* y *PR5*, los cuales son utilizados como marcadores de esta ruta de señalización. Asimismo, se conocen varios factores de transcripción del tipo WRKY que desempeñan importantes funciones río abajo de *NPR1*, tales como mediar las respuestas de defensa en las plantas (Kunkel y Brooks, 2002; Pieterse et al., 2012).

La señalización dependiente de AJ y de ET, se produce a través del incremento de su síntesis en respuesta a heridas, insectos y patógenos necrótrofos. Mutantes de *Arabidopsis* afectadas en la producción y en la percepción de JA, como la triple mutante *fad3-fad7-fad8* y la mutante sencilla *jar1* (del inglés, *jasmonic acid resistant 1*), respectivamente, exhiben una marcada susceptibilidad a patógenos necrotrofos, como son los hongos *Alternaria brassicicola*, *Botrytis cinerea*, *Plectosphaerella cucumerina* y a la bacteria *Pectobacterium carotovora*. En *Arabidopsis*, la señalización por AJ se ha demostrado que se lleva a cabo a través de dos rutas mediadas principalmente por factores de transcripción, una de ellas incluye a *MYC2/JIN1* (del inglés, *Jasmonate insensitive 1*) y la otra, a varios miembros de la familia AP2/ERF (del inglés, *Apetala2/Ethylene-Response Factor*) (Pieterse et al., 2012). Al igual que en la vía por AJ, en la vía del ET, los ERF son los principales reguladores en respuesta a patógenos, destacando EIN2 y EIN3 que activan las respuestas de defensa. ET participa con las vías de AS y de AJ, ya sea de forma antagonica o induciéndolas para lograr respuestas de defensa personalizadas.

En los últimos años, se ha descrito la participación de nuevos mediadores de las respuestas de defensa, como son el ácido abscísico y los brasinoesteroides. El ácido abscísico, además de controlar procesos de desarrollo de la planta (germinación, dormancia, respuesta a sequía, apertura de estomas), puede funcionar como un regulador positivo o negativo en función del tipo de interacción planta-patógeno. Mutantes de sobreexpresión con alteración en la síntesis o en la señalización de ABA, en tomate (*sitiens*) y en *Arabidopsis* (*abi1-1*, *abi2-1*, *aba1-6*, *aba2-12*, *ao3-2* y *pyr1-pyl1-pyl2-pyl4*), conducen a una mayor resistencia a diferentes patógenos, como *B. cinerea*, *P. syringae*, *Fusarium*

oxysporum, *P. cucumerina* y *Hyaloperonospora parasitica* (Denancé et al., 2013). Por su parte, el papel de los BA se comenzó a estudiar por la implicación del receptor citoplásmico BAK1 (del inglés, *Bri1-Associated receptor Kinase*) en la respuesta inmune PTI, principalmente en la regulación de la muerte celular y por interactuar físicamente con varios receptores del tipo PRR. Asimismo, se agregó a la lista de los componentes compartidos por las vías de los BA y en la inmunidad por PTI, la participación del receptor BIK1 (del inglés, *Botrytis-Induced Kinase 1*).

2.5. Acumulación de calosa

Una de las últimas respuestas de la defensa en la acumulación de calosa. En *Arabidopsis*, la acumulación de calosa se puede detectar a partir de las 16 h después del tratamiento con PAMPs fijando y tiñendo el tejido con azul de anilina (Gómez-Gómez et al., 1999). En el tejido de la hoja, la calosa se localiza en las papilas, un tejido que se extiende desde la membrana plasmática a la pared celular. Sin embargo, el papel exacto de la deposición de calosa en la defensa de las plantas aún no está claro. La deposición de calosa está asociada con la producción de ROS, compuestos fenólicos y varias proteínas de la pared celular. Estos eventos han confirmado funciones antimicrobianas o de refuerzo de la pared celular (Voigt, 2014).

2.6. Cambios transcripcionales

Tras la percepción de PAMPs y/o DAMPs, las plantas inician una reprogramación profunda y dinámica de la expresión génica. Casi todas las respuestas de defensa descritas anteriormente están reguladas por un conjunto de genes diferentes (Li et al., 2016; Tsuda y Somssich, 2015). Los estudios en *Arabidopsis* revelaron que 30 min después del tratamiento con flg22, la expresión de aproximadamente 1000 genes estaba regulada al alza y sólo 200 genes regulados a la baja. Entre los genes inducidos se encuentran también el PRR *FLS2* y *EFR* (Zipfel et al., 2004). El análisis comparativo de la expresión génica después de la infección con bacterias *Pseudomonas* spp. virulentas y una cepa no patógena mostró que la respuesta transcripcional a los patrones bacterianos conservados comienza antes de que la propia bacteria comience a multiplicarse. Los primeros genes inducidos están relacionados con las respuestas de defensa y la biosíntesis de ácido salicílico (Shiu et al., 2004; Zipfel et al., 2004).

3. Conclusión

La inmunidad de las plantas se basa en una respuesta compleja y muy flexible en su capacidad para reconocer y contrarrestar diferentes invasores. Para combatir eficazmente la invasión de patógenos microbianos e insectos, las plantas utilizan barreras físicas preexistentes, así como mecanismos de defensa inducibles que se activan ante el ataque. Además de reaccionar localmente, las plantas pueden generar una respuesta sistémica que establece una capacidad defensiva mejorada en tejidos distantes del sitio del ataque primario. El conocimiento a mayor detalle de estas interacciones

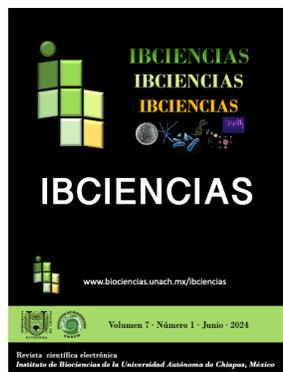
complejas que suceden en la planta ante el reconocimiento de distintos microorganismos puede aplicarse para el desarrollo de nuevas estrategias biotecnológicas que sean más amigables con el ambiente para el control de enfermedades y de plagas y así generar cultivos más resistentes.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses

Referencias

- Aragón W, Reina-Pinto JJ, Serrano M. 2017. The intimate talk between plants and microorganisms at the leaf surface. *Journal of Experimental Botany* 68: 5339-5350.
- Bentham AR, De la Concepcion JC, Mukhi N, Zdrzałek R, Draeger M, Gorenkin D, Hughes RK, Banfield MJ. 2020. A molecular roadmap to the plant immune system. *The Journal of Biological Chemistry* 295(44): 14916-14935.
- Boller T, Felix G. 2009. A renaissance of elicitors: perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors. *Annual Review of Plant Biology* 60: 379-406.
- Dangl JL, Horvath DM, Staskawicz BJ. 2013. Pivoting the plant immune system from dissection to deployment. *Science* 341: 746-751.
- Denancé N, Sánchez-Vallet A, Goffner D, Molina A. 2013. Disease resistance or growth: the role of plant hormones in balancing immune responses and fitness costs. *Frontiers in Plant Science* 4: 155.
- Dodds PN, Rathjen JP. 2010. Plant immunity: Towards an integrated view of plant-pathogen interactions. *Nature Reviews Genetics* 11: 539-548.
- Flury P, Klausner D, Schulze B, Boller T, Bartels S. 2013. The anticipation of danger: microbe-associated molecular pattern perception enhances AtPep-triggered oxidative burst. *Plant Physiology* 161: 2023-2035.
- Göhre V, Robatzek S. 2008. Breaking the barriers: microbial effector molecules subvert plant immunity. *Annual Review of Phytopathology* 46: 189-215.
- Gómez-Gómez L, Felix G, Boller T. 1999. A single locus determines sensitivity to bacterial flagellin in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* 18: 277-284.
- Govrin EM, Levine A. 2000. The hypersensitive response facilitates plant infection by the necrotrophic pathogen *Botrytis cinerea*. *Current Biology* 10: 751-757.
- Hacquard S, Spaepen S, Garrido-Oter R, Schulze-Lefert P. 2017. Interplay between innate immunity and the plant microbiota. *Annual Review of Phytopathology* 55: 565-589.
- Jones JD, Dangl JL. 2006. The plant immune system. *Nature* 444: 323-329.
- Kunkel BN, Brooks DM. 2002. Cross talk between signaling pathways in pathogen defense. *Current Opinion in Plant Biology* 5: 325-331.
- Lehmann S, Serrano M, L'haridon F, Tjamos SE, Metraux JP. 2015. Reactive oxygen species and plant resistance to fungal pathogens. *Phytochemistry* 112: 54-62.
- Li B, Meng X, Shan L, He P. 2016. Transcriptional Regulation of Pattern-Triggered Immunity in Plants. *Cell Host Microbe* 19: 641-650.
- Macho AP, Zipfel C. 2014. Plant PRRs and the activation of innate immune signaling. *Molecular Cell* 54: 263-272.
- Malamy J, Carr JP, Klessig DF, Raskin I. 1990. Salicylic Acid: A likely endogenous signal in the resistance response of tobacco to viral infection. *Science* 250: 1002-1004.
- Maruri-López I, Aviles-Baltazar NY, Buchala A, Serrano M. 2019. Intra and extracellular journey of the phytohormone salicylic acid. *Frontiers in Plant Science* 10: 423.
- O'Brien JA, Daudi A, Butt VS, Paul BG. 2012. Reactive oxygen species and their role in plant defence and cell wall metabolism. *Planta* 236: 765-779.
- Pieterse CM, Van Der Does D, Zamioudis C, Leon-Reyes A, Van Wees SC. 2012. Hormonal modulation of plant immunity. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 28: 489-521.
- Pieterse CMJ, Leon-Reyes A, Van Der Ent S, Van Wees SCM. 2009. Networking by small-molecule hormones in plant immunity. *Nature Chemical Biology* 5: 308-316.
- Ranf S, Eschen-Lippold L, Pecher P, Lee J, Scheel D. 2011. Interplay between calcium signalling and early signalling elements during defence responses to microbe- or damage-associated molecular patterns. *The Plant Journal* 68: 100-113.
- Shiu SH, Karlowski WM, Pan RS, Tzeng YH, Mayer KFX, Li WH. 2004. Comparative analysis of the receptor-like kinase family in Arabidopsis and rice. *The Plant Cell* 16: 1220-1234.
- Torres MA, Dangl JL. 2005. Functions of the respiratory burst oxidase in biotic interactions, abiotic stress and development. *Current Opinion in Plant Biology* 8: 397-403.
- Torres MA, Jones JDG, Dangl JL. 2006. Reactive oxygen species signaling in response to pathogens. *Plant Physiology* 141: 373-378.
- Tsuda K, Somssich IE. 2015. Transcriptional networks in plant immunity. *New Phytologist* 206: 932-947.
- Voigt CA. 2014. Callose-mediated resistance to pathogenic intruders in plant defense-related papillae. *Frontiers in Plant Science* 5, 168.
- Zipfel C. 2014. Plant pattern-recognition receptors. *Trends in Immunology* 35: 345-351.



ARTÍCULO CORTO

Cuantificación de fenoles y flavonoides en callos de *Psychotria erythrocarpa* Schldl

Leonardo Santiago-Segura, Miguel Ángel Ramírez-López, Jazmín Axél De la Cruz-López, Joseph Rodrigo Hernández-Hernández, Juan Antonio Maza-Ruiz, Erick Javier Sarmiento-Gómez, Federico Antonio Gutiérrez-Miceli, José Alfredo Santiz-Gómez*

División de Estudios de Posgrado e Investigación, laboratorio de cultivo de tejidos vegetales, Tecnológico Nacional de México/Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez. Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México.

Resumen

La familia Rubiaceae se caracteriza por la producción de una gran diversidad de metabolitos bioactivos, los cuales han mostrado gran potencial farmacológico. El género *Psychotria* pertenece a esta familia. Para *Psychotria erythrocarpa* no existen reportes sobre el perfil fotoquímico y el cultivo *in vitro*. Por ello, el objetivo de esta investigación fue inducir la formación de callos en explantes de *P. erythrocarpa* para determinar el contenido de fenoles y flavonoides. Se desinfectaron explantes de tallos y hojas y se indujo la formación de callos empleando un diseño experimental multifactorial 2^3 evaluando el efecto del ácido naftalenacético, ácido 2,4-diclorofenoxiacético y bencilaminopurina en concentraciones de 0 a 2 mg L⁻¹. Se obtuvieron valores de desinfección del 33% al 100% y no hubo diferencia significativa entre los tipos de explantes. Respecto a la formación de callos, el mejor tratamiento fue el que contenía ácido naftalenacético y bencilaminopurina para los explantes de tallos y para los explantes de hojas el tratamiento que contenía ácido 2,4-diclorofenoxiacético y bencilaminopurina. Los explantes de tallos mostraron diferencia significativa respecto a los explantes de hojas. Finalmente, el contenido de fenoles y flavonoides totales no presentó diferencia significativa entre los dos tipos de callos evaluados, pero sí fue significativamente diferente cuando se comparó con el tratamiento control. Esta investigación es el primer reporte sobre la desinfección de explantes para el establecimiento *in vitro*, inducción de callos y cuantificación de metabolitos secundarios en *P. erythrocarpa*.

Palabras clave:

Callogénesis
Desinfección
Metabolitos secundarios
Reguladores de crecimiento

Keywords:

Callogenesis
Disinfection
Secondary metabolites
Growth regulators

Quantification of phenols and flavonoids in callus of *Psychotria erythrocarpa* Schldl

Abstract

The Rubiaceae family is characterized by the production of a great diversity of bioactive metabolites which have shown great pharmacological potential. The *Psychotria* genus belongs to this family. In *Psychotria erythrocarpa* there are no reports about the phytochemical profile and *in vitro* culture. Therefore, the aim of this research was to induce callus formation in *P. erythrocarpa* explants to determine the phenol and flavonoid content. For this purpose, stem and leaf explants were disinfected, and callus formation was induced using a multifactorial experimental design 2^3 evaluating the effect of naphthaleneacetic acid, 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and benzylaminopurine in concentrations of 0 to 2 mg L⁻¹. The disinfection was from 33% to 100% and there was no significant difference between the types of explants. Regarding callus formation, the best treatment was the one containing naphthaleneacetic acid and benzylaminopurine for stem explants and the treatment containing 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and benzylaminopurine for leaf explants. Stem explants showed a significant difference compared to leaf explants. Finally, the content of total phenols and flavonoids did not present a significant difference between the two types of calluses evaluated, but it was significant when compared with the control treatment. This research is the first report on the disinfection of explants for *in vitro* establishment, callus induction and quantification of secondary metabolites in *P. erythrocarpa*.

* Autor para correspondencia:

División de Estudios de Posgrado e Investigación, Laboratorio de cultivo de tejidos vegetales, Tecnológico Nacional de México/ Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez. Carretera Panamericana km. 1080, Colonia Juan Crispin. C.P. 29050. Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México. Teléfono: + 52 9616150138 ext. 304-305. Correo-electrónico: jose.sg@tuxtla.tecnm.mx

1. Introducción

La familia de las Rubiaceae incluye aproximadamente 637 géneros y 13,000 especies. Tiene una distribución cosmopolita que se concentra principalmente en los trópicos (Mongrand et al., 2005; Pereira y Meireles, 2010). La familia Rubiaceae se caracteriza por la producción de una gran diversidad de metabolitos bioactivos como iridoides, alcaloides indol, antraquinonas, terpenoides, taninos, saponinas, esteroides, flavonoides y otros derivados fenólicos, muchos de ellos con gran potencial farmacológico y otros empleados en la medicina tradicional (Cardoso et al., 2008; Martins y Nunez, 2015). El número de productos descritos, la diversidad estructural y las actividades farmacológicas reportadas para varias especies de la familia Rubiaceae demuestran que es una fuente prometedora de nuevas sustancias bioactivas o productos como moléculas activas e incluso prototipos de fármacos. Muchas de estas plantas tienen uso generalizado en la medicina tradicional y algunas han mostrado efectos antiinflamatorios, analgésicos, antibacterianos, mutagénicos, antivirales, antioxidantes y actividad sobre el sistema nervioso central (Heitzman et al., 2005).

Su clasificación taxonómica es compleja y se divide en cuatro subfamilias: Rubioideae, Cinchonoideae, Antirheoideae e Ixoroideae (Martins y Nunez, 2015). Dentro de la subfamilia Rubioideae se encuentra el género *Psychotria*. Las plantas del género *Psychotria* son productoras de sustancias con actividad sobre el sistema nervioso central, como *P. viridis*, conocida popularmente como “ayahuasca” que significa “vino del alma”, la cual se utiliza en ceremonias religiosas (Freedland y Mansbach, 1999). *P. acuminata* es otra planta medicinal de interés comercial y farmacéutico debido a su capacidad para producir alcaloides como isoquinolina, emetina, cefaelina y psychotrina (Glinski et al., 1995).

P. ipecacuanha, es una planta medicinal que se encuentra en peligro de extinción, debido principalmente a la sobreexplotación y pérdida de su hábitat natural (Alves-García et al., 2005) debido a que el extracto de la raíz es utilizado y reconocido en la farmacopea como amebicida, emético y expectorante (Nomura y Kutchan, 2010). En esta especie la emetina, es el componente bioactivo que se encuentra en mayor proporción (60-70%), es extraído de la corteza del rizoma y de las raíces. Actúa inhibiendo la síntesis y actividad de proteínas, del ADN y ARN ribosomales y mitocondriales en ensayos realizados en células de mamífero, levaduras y vegetales (Akinboye y Bakare, 2011), también se ha reportado que este alcaloide tiene actividad antiviral significativa contra el virus del dengue (Low et al., 2009).

En cuanto al empleo de las técnicas de cultivo *in vitro* en este género, en *P. ipecacuana* se ha reportado la propagación a partir de ápices, segmentos nodales y de raíz (Ideda et al., 1988; Jha y Jha, 1989; Yoshimatsu y Shimomura, 1991; Yoshimatsu y Shimomura, 1994), la embriogénesis somática (Naranjo et al., 2014; Rout et al., 2000) y el empleo de

sistemas de inmersión temporal (Batistini et al., 2002). En *P. acuminata* se han obtenido brotes a partir de hojas y se ha establecido la propagación clonal (Lara et al., 2003). Las especies de la familia Rubiaceae han sido ampliamente estudiadas desde el punto de vista fitoquímico. Por otro lado, pocos estudios han utilizado este conocimiento como herramienta en estudios de cultivo *in vitro* y se han limitado a estudiar solo algunas especies. En este sentido, es importante ampliar las investigaciones a otras especies del género *Psychotria* para aumentar la probabilidad de encontrar compuestos bioactivos, lo que permitirá descubrir nuevos fármacos originados en la naturaleza o encontrar otras alternativas en el cultivo *in vitro* para incrementar la producción de metabolitos secundarios de interés farmacológico. Por ello, el objetivo de esta investigación fue inducir la formación de callos en explantes de *Psychotria erythrocarpa* para determinar el contenido de fenoles y flavonoides en el cultivo *in vitro*.

2. Materiales y Métodos

2.1. Material vegetal

Plántulas de *P. erythrocarpa* Schtdl de tres meses de edad cultivadas en invernadero fueron proporcionadas por el Jardín Botánico Faustino Miranda de Tuxtla Gutiérrez Chiapas, México (16°45' N, 93°07' O). Las plántulas se emplearon para obtener explantes asépticos para la posterior inducción de callos.

2.2. Desinfección de explantes

Se seleccionaron muestras de hojas y tallos y se desinfectaron. Primero se llevó a cabo un lavado con agua y jabón líquido comercial durante 10 min con agitación manual seguido de un enjuague con agua destilada. Posteriormente se realizó un lavado con captan (Metfaver®) y Agri-mycin 500® al 0.5% (p v⁻¹) durante 10 min con agitación manual y posteriormente se realizó un enjuague con agua destilada. La desinfección se llevó a cabo en una campana de flujo laminar (VECO®), las muestras se sumergieron en una solución de etanol (MEYER®) al 70% (v v⁻¹) durante 5 min, posteriormente se realizaron tres enjuagues de 3 min cada uno con agua destilada esterilizada. Después, se realizó la desinfección con NaClO comercial al 50% (v v⁻¹) durante 10 min con agitación manual. Finalmente se realizaron tres enjuagues de 3 min cada uno con agua destilada esterilizada. Los explantes desinfectados se emplearon para la inducción de callos.

2.3. Inducción de callos

Los explantes desinfectados se establecieron en medio MS (Sigma-Aldrich®) suplementado con 30 g L⁻¹ de sacarosa y 2.5 g L⁻¹ de fitagel (Sigma-Aldrich®). Para la inducción de callogenesis se empleó un diseño experimental factorial 2³, evaluando tres reguladores de crecimiento que fueron ácido naftalenacético (ANA, Sigma-Aldrich®), bencilaminopurina (BAP, Sigma-Aldrich®) y ácido 2,4-dicloroenoxiacético (2,4-D, Sigma-Aldrich®) cada uno con dos concentraciones

que fueron 0 y 2 mg L⁻¹, generando 8 tratamientos (Cuadro 1) con tres repeticiones cada uno. Finalmente, los cultivos se mantuvieron en cámara bioclimática con un fotoperíodo de 16 h a 25±2 °C durante 40 días y se determinó el porcentaje de desinfección y el porcentaje de formación de callos. Los mejores tratamientos en la inducción de callos se seleccionaron para continuar con la proliferación de callos y la posterior cuantificación de fenoles y flavonoides totales.

Cuadro 1. Diseño experimental multifactorial 2³ empleado para la inducción de callos en explantes de *Psychotria erythrocarpa* Schldl.

Tratamientos	Reguladores de crecimiento (mg L ⁻¹)		
	ANA	BAP	2,4-D
1	0	0	0
2	2	0	0
3	0	2	0
4	2	2	0
5	0	0	2
6	2	0	2
7	0	2	2
8	2	2	2

2.4. Obtención de extractos metanólicos

Los extractos metanólicos tanto de callos como de plantas mantenidas en invernadero (Control) se obtuvieron de acuerdo con Martínez-Silvestre et al. (2022). Se pesaron 250 mg de muestra vegetal y se adicionaron 50 mL de metanol (MEYER®), se mantuvo bajo sonicación (Ultrasonic, CO-Z PS-30) durante 10 min a temperatura ambiente. Posteriormente se mantuvieron en agitador rotatorio (Barnstead, SHKA3000) a 100 rpm por 24 h. Al término de este periodo, las muestras se centrifugaron a 4000 rpm durante 10 min. El sobrenadante se filtró y el residuo se lavó dos veces con 5 mL de metanol para posteriormente volver a filtrar. Los sobrenadantes combinados se evaporaron a presión reducida en un rotavapor (BUCHI® R-100) y se almacenó como extracto seco a -20 °C hasta su uso para resuspender en 3 mL de metanol.

2.5. Determinación de fenoles totales

La cuantificación de compuestos fenólicos se llevó a cabo mediante el método de Folin-Ciocalteu, según lo descrito por Singleton et al. (1999). Se tomaron 20 µL del extracto metanólico correspondiente y se añadieron 1.5 mL de agua destilada y 100 µL de reactivo de Folin-Ciocalteu (Sigma-Aldrich®). Después de 5 min se añadieron 300 µL de solución de carbonato de sodio (Sigma-Aldrich®) al 20% (p v⁻¹). La mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 2 h. La absorbancia resultante se midió a 765 nm empleando un espectrofotómetro UV-VIS (Thermo Scientific®, GENESYS 150). El contenido fenólico total se expresó en mg equivalentes de ácido gálico por g de peso seco. La cuantificación se realizó con respecto a la curva de calibración estándar de 0 a 1000 mg L⁻¹ de ácido gálico (Sigma-Aldrich®) disuelto en metanol.

2.6. Determinación de flavonoides totales

La cuantificación de flavonoides se llevó a cabo mediante el método establecido por Chang et al. (2002). A 250 µL del extracto metanólico correspondiente, se le adicionaron 750 µL de etanol (MEYER®) al 95% (v v⁻¹), 50 µL de cloruro de aluminio (MEYER®) al 10% (p v⁻¹), 50 µL de acetato de potasio (BAKER®) 1 M y 1.4 mL de agua destilada. La mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 30 min y posteriormente se determinó la absorbancia a 415 nm empleando un espectrofotómetro UV-VIS (Thermo Scientific®, GENESYS 150). Los resultados se expresaron como mg equivalentes de quercetina por g de peso seco. La cuantificación se realizó con respecto a la curva de calibración estándar de quercetina (Sigma-Aldrich®) a concentraciones de 0 a 100 mg L⁻¹.

2.7. Análisis de datos

Todos los experimentos se realizaron completamente al azar y para cada unidad experimental se tuvieron tres repeticiones. Con los datos obtenidos se realizó análisis de varianza de una vía para conocer los efectos de las interacciones entre los niveles de los factores. Las medias fueron comparadas mediante la prueba de LSD (P<0.05) con ayuda del software estadístico Statgraphics Centurion XVII.

3. Resultados y Discusión

3.1. Desinfección e inducción de callos

El principal requerimiento para el cultivo *in vitro* es la asepsia en los tejidos cultivados, por tal motivo el protocolo de desinfección debe brindar elevados porcentajes de desinfección en los explantes a utilizar. Sin embargo, tratamientos más fuertes de desinfección con los productos utilizados siempre resultan en un control total de la contaminación, pero asociado con la muerte de los explantes, sobre todo cuando se emplean agentes oxidantes como el NaClO. El protocolo de desinfección empleado permitió porcentajes de desinfección desde el 33% hasta el 100% tanto en los explantes de hojas como en los explantes de tallos (Cuadro 2). En ambos tipos de explantes no hubo diferencia estadística significativa (P<0.05) respecto al porcentaje de desinfección, por lo que fue posible la obtención de explantes asépticos para la inducción de callos. Resultados similares empleando NaClO y etanol se han reportado en brotes de *Psychotria ipecacuana* (Ideda et al., 1988). De igual manera los resultados obtenidos en esta investigación son correspondientes a lo reportado por Lara et al. (2003) en la desinfección de explantes de hojas y tallos de *Psychotria acuminata*.

Respecto a la inducción de callos, se obtuvo 33% de formación de callos en los tratamientos 5, 7 y 8 en los explantes de hojas. Así mismo, se obtuvo 66% y 100% de formación de callos en los tratamientos 4 y 6, respectivamente, en los explantes de tallos los cuales presentaron diferencia significativa (P<0.05) comparado con los explantes de hojas (Cuadro 2). La inducción de callo se hizo evidente inicialmente en las zonas de corte de las hojas,

en los bordes y en la zona de incisión de los tallos, debido a la tendencia que tienen los cultivos vegetales de formar callos

a partir de las heridas como una medida de defensa natural (George et al., 2008).

Cuadro 2. Valores de desinfección y formación de callos en explantes de *Psychotria erythrocarpa* Schltldl.

Tratamientos	Explantes de hojas		Explantes de tallos	
	Desinfección (%)	Callogénesis (%)	Desinfección (%)	Callogénesis (%)
1	100 ^a	0 ^c	66 ^a	0 ^c
2	66 ^a	0 ^c	33 ^a	0 ^c
3	66 ^a	0 ^c	100 ^a	0 ^c
4	33 ^a	0 ^c	66 ^a	66 ^{ab}
5	66 ^a	33 ^{bc}	33 ^a	0 ^c
6	100 ^a	0 ^c	100 ^a	100 ^a
7	66 ^a	33 ^{bc}	66 ^a	0 ^c
8	100 ^a	33 ^{bc}	66 ^a	0 ^c
LSD	79.61	48.01	79.61	48.01

^{a-c}Letras diferentes por columna denotan diferencia significativa (P<0.05)

Después de 40 días de incubación, los callos obtenidos a partir de los explantes de tallos fueron friables con tonalidades de color beige traslucidos en los bordes y tonalidades verde-amarillo en el centro del callo (Figura 1A), mientras que los callos obtenidos a partir de los explantes de hojas también fueron friables, pero con tonalidades amarillas en los bordes y tonalidades verdes intensas en el centro del callo (Figura 1B).

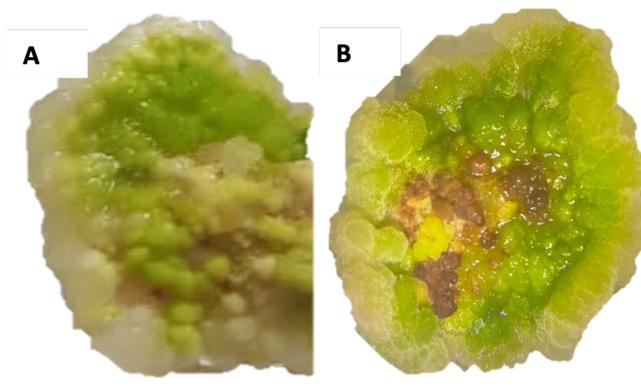


Figura 1. Formación de callos en explantes de *Psychotria erythrocarpa* Schltldl, después de 40 días de incubación. Callos desarrollados en explantes de tallos (A), callos desarrollados en explantes de hojas (B). Barra de escala= 1 cm.

En ambos tipos de callos se observó secciones con tonalidades café y marrón en el centro del callo, esto debido a la oxidación fenólica del explante original (tallo u hoja) sobre el cual se desarrolló cada tipo de callo, lo cual no afectó su crecimiento y desarrollo. Estos resultados son similares a lo reportado en *P. ipecacuana* cuando los explantes de hojas se agrandaron y desarrollaron callos en las superficies de corte y posteriormente cubrieron toda la superficie de los explantes (Rout et al., 2000). De igual manera, se ha reportado que los callos obtenidos en explantes de hojas de *P. ipecacuana* suplementados con cinetina y 2,4-D presentaron una tasa de crecimiento más rápida compara con los explantes que fueron suplementados con cinetina y ANA

mientras que la combinación de BAP y ANA redujo la inducción de callos (Rout et al., 2000). En *P. ipecacuana* también se ha reportado que las combinaciones de ANA y BAP son más efectivas para lograr la formación de brotes múltiples (Ideda et al., 1988). Así mismo, se ha reportado que la adición de ANA en explantes de hojas induce la formación de raíces en esta especie (Yoshimatsu y Shimomura, 1994). En *P. acuminata* se ha reportado que la combinación de BAP y ANA induce la formación de callos organogénicos en explantes de entre nudos (Lara et al., 2003). Por ello, para la proliferación de callos, se seleccionó el tratamiento 4 (ANA+BAP) para los callos provenientes de explantes de tallos y el tratamiento 7 (BAP+2,4-D) para los callos provenientes de los explantes de hojas, debido a que se requerían callos para la cuantificación de fenoles y flavonoides totales y no brotes, raíces o embriones. En este sentido, las especies perennes tienen en general menor plasticidad en respuesta al medio ambiente y una tasa de crecimiento más lenta que las especies herbáceas, por ello, requieren de concentraciones más elevadas de reguladores de crecimiento para generar una respuesta morfogénica (Yoshimatsu y Shimomura, 1991). Las concentraciones de reguladores de crecimiento empleadas en esta investigación son correspondientes a lo reportado en *P. ipecacuana* y *P. acuminata*, y permitieron la inducción de callos tanto en los explantes de hojas como en los explantes de tallos ya que la relación entre estos reguladores induce la división celular ilimitada al desencadenar su potencial proliferativo a través de callogénesis (Ikeuchi et al., 2013; Rahman et al., 2019).

3.2. Determinación de fenoles y flavonoides totales

El contenido de fenoles y flavonoides totales en callos proliferados a partir de explantes de tallos y hojas se comparó con el de plantas Control (Cuadro 3). El contenido de fenoles y flavonoides totales en las plantas control mostró diferencia significativa (P<0.05) respecto al contenido de fenoles y flavonoides totales en los callos proliferados. Sin embargo, no hubo diferencia significativa (P>0.05) entre los dos tipos de callos evaluados.

Cuadro 3. Concentración de fenoles y flavonoides totales en el cultivo de callos de *Psychotria erythrocarpa* Schltld.

Tratamientos	Reguladores de crecimiento (mg L ⁻¹)			Fenoles totales (mg equivalentes de ácido gálico g ⁻¹ de peso seco)	Flavonoides totales (mg equivalentes de quercetina g ⁻¹ de peso seco)
	ANA	BAP	2,4-D		
Control (plantas de invernadero)	0	0	0	0.262 ^a	0.129 ^a
4 (callos provenientes de tallos)	2	2	0	0.034 ^b	0.054 ^b
7 (callos provenientes de hojas)	0	2	2	0.137 ^b	0.064 ^b
LSD				0.1108	0.0303

^{a,b}Letras diferentes por columna denotan diferencia significativa (P<0.05)

El cultivo de tejidos vegetales representa una alternativa para la obtención compuestos o moléculas activas de plantas. En este sentido, la callogenésis es el proceso morfogénico mediante el cual se da lugar a la formación de estructuras desdiferenciadas en tejidos vegetales. El callo es una masa desorganizada de células poco diferenciadas que se da en respuesta a una lesión, herida o estímulo en una parte específica del tejido vegetal. Se forma como barrera protectora que ayuda a la planta a sellar una herida y promueve la regeneración del tejido, por lo que ocurre de manera natural como defensa ante daños como cortes, heridas o infecciones (Ikeuchi et al., 2013). La callogenésis puede ser inducida de forma controlada mediante técnicas de cultivo de tejidos vegetales. El cultivo de células a partir de callo puede ser utilizado para la producción de metabolitos secundarios en biorreactores, lo que es ventajoso en plantas con propiedades medicinales (Lara et al., 2003) y pueden ser aplicadas en *P. erythrocarpa*. Para que haya una producción óptima de metabolitos secundarios, debe haber presencia de hormonas como las citoquininas ya que estas trabajan en sinergia con las auxinas endógenas. Por otra parte, la presencia equilibrada de auxinas y citoquininas en el medio de cultivo puede mejorar la acumulación de metabolitos secundarios, ya que las auxinas promueven la formación de callos y la proliferación celular, mientras que las citoquininas promueven la diferenciación celular, lo que está estrechamente relacionado con la acumulación de metabolitos secundarios (Pérez-Alonso y Jiménez, 2011). En *P. erythrocarpa* no existen reportes sobre el perfil fitoquímico, sin embargo, se ha reportado el incremento en la producción de camptotecina en callos de *Nothapodytes foetida* suplementados con BAP y 2,4-D (Thengane et al., 2003), la producción de camptotecina y 10-hidroxicamptotecina en callos de *Camptotheca acuminata* suplementados con ANA y BAP (Wiefenfeld et al., 1997), así como la acumulación de fenoles y flavonoides en callos de *Sideroxylon capiri* suplementados con 2,4-D y TDZ (Martínez-Silvestre et al., 2022). Por lo que el cultivo de callos suplementados con ANA+BAP y 2,4-D+BAP representa una alternativa en la producción de metabolitos secundarios en esta especie.

4. Conclusión

Esta investigación es el primer reporte sobre la desinfección de explantes para el establecimiento del cultivo *in vitro*, inducción de callos y cuantificación de metabolitos secundarios en *Psychotria erythrocarpa* Schltld. Los explantes de *P. erythrocarpa*, fueron susceptibles a la desinfección y morfogénesis *in vitro* por lo que fue posible la inducción de callos en esta especie incrementando las fuentes de obtención de metabolitos secundarios a partir del cultivo de tejidos vegetales.

Agradecimientos

Los autores agradecen laboratorio de cultivo de tejidos vegetales del Tecnológico Nacional de México/Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez por proporcionar las instalaciones para la realización de la investigación y al Jardín Botánico Faustino Miranda de Tuxtla Gutiérrez Chiapas, México, por la donación de plántulas de *Psychotria erythrocarpa* Schltld.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Referencias

- Akinboye ES, Bakare O. 2011. Biological activities of emetine. *Open Natural Products Journal* 4: 8-5.
- Alves-García R, Oliveira L, Alves-Moreira M, Silva-Barros W. 2005. Variation in emetine and cephaeline contents in roots of wild Ipecac (*Psychotria ipecacuanha*). *Biochemical Systematics and Ecology* 33: 233-243.
- Batistini AP, Moro JR, França SC, Pereira AMS. 2002. Avaliação de diferentes sistemas de cultivo "in vitro" para micropropagação de *Psychotria ipecacuanha* (Brot.) Stokes. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais* 5(1): 27-35.
- Cardoso CL, Silva DHS, Young MCM, Castro-Gamboa I, Bolzani, VDS. 2008. Indole monoterpene alkaloids from *Chimarrhis turbinata* DC Prodr.: a contribution to the chemotaxonomic studies of the Rubiaceae family. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 18: 26-29.
- Chang C, Yang M, Wen H, Chern J. 2002. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary

- colorimetric methods. *Journal of Food and Drug Analysis* 10: 178-182.
- Freedland CS, Mansbach RS. 1999. Behavioral profile of constituents in ayahuasca, an Amazonian psychoactive plant mixture. *Drug and Alcohol Dependence* 54: 183-194.
- George EF, Hall MA, Klerk GJD. 2008. Plant Tissue Culture Procedure - Background. En: George EF, Hall MA, Klerk GJD. (eds). *Plant Propagation by Tissue Culture*. Springer, Dordrecht. Pp. 1-28.
- Glinski JA, David E, Warren TC, Hansen G, Leonard SF, Pitner P, Pav S, Arvigo R, Balick MJ, Panti E, Grob PM. 1995. Inactivation of cell surface receptors by pheophorbide "a", a green pigment isolated from *Psychotria acuminata*. *Photochemistry and Photobiology* 62(4): 144-150.
- Heitzman ME, Neto CC, Winiarz E, Vaisberg AJ, Hammond GB. 2005. Ethnobotany, phytochemistry and pharmacology of *Uncaria* (Rubiaceae). *Phytochemistry* 66: 5-29.
- Ideda K, Teshima D, Aoyama T, Satake M, Shimomura K. 1988. Clonal propagation of *Cephaelis ipecacuanha*. *Plant Cell Reports* 7(4): 288-291.
- Ikeuchi M, Sugimoto K, Iwase. 2013. Plant callus: mechanisms of induction and repression. *The Plant Cell* 5(9): 3159-3173.
- Jha S, Jha TB. 1989. Micropropagation of *Cephaelis ipecacuanha* rich. *Plant Cell Reports* 8(8): 437-439.
- Lara A, Valverde R, Gómez L, Hidalgo N. 2003. Micropropagación de la planta medicinal *Psychotria acuminata*. *Agronomía Costarricense* 27(2): 7-20.
- Low SYJ, Caiyun CK, Xing WK, Mah-Lee NM, Jang HCJ. 2009. Antiviral activity of emetine dihydrochloride against dengue virus infection. *Journal of Antivirals & Antiretrovirals* 1(1): 62-71.
- Martins D, Nunez CV. 2015. Secondary metabolites from Rubiaceae species. *Molecules* 20(7): 13422-13495.
- Martínez-Silvestre KE, Santiz-Gómez JA, Luján-Hidalgo MC, Ruiz-Lau N, Sánchez-Roque Y, Gutiérrez-Miceli FA. 2022. Effect of UV-B radiation on flavonoids and phenols accumulation in tempisque (*Sideroxylon capiri* Pittier) callus. *Plants* 11: 473.
- Mongrand S, Badoc A, Patouille B, Lacomblez C, Chavent M, Bessoule JJ. 2005. Chemotaxonomy of the Rubiaceae family based on leaf fatty acid composition. *Phytochemistry* 66: 549-559.
- Naranjo EJ, Urrea AI, Atehortúa L. 2014. Avances en la propagación vía embriogénesis somática de *Psychotria ipecacuana* (Brot.) Stokes, planta medicinal en peligro crítico. *Revista Colombiana de Biotecnología* 16(1): 86-92.
- Nomura T, Kutchan T. 2010. Three new o-methyltransferases are sufficient for all o-methylation reactions of ipecac alkaloid biosynthesis in root culture of *Psychotria ipecacuanha*. *The Journal of Biological Chemistry* 285(10): 7722-7738.
- Pereira CG, Meireles MAA. 2010. Supercritical fluid extraction of bioactive compounds: Fundamentals, applications and economic perspectives. *Food and Bioprocess Technology* 3: 340-372.
- Pérez-Alonso N, Jiménez, E. 2011. Producción de metabolitos secundarios de plantas mediante el cultivo *in vitro*. *Biotecnología Vegetal* 11(4): 195-211.
- Rahman N, Rosli R, Kadzimin S, Hakiman M. 2019. Effects of auxin and cytokinin on callus induction in *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. *Fundamental and Applied Agriculture* 4(3): 928-932.
- Rout G, Samantaray S, Das P. 2000. In vitro somatic embryogenesis from callus cultures of *Cephaelis ipecacuanha* A. Richard. *Scientia Horticulturae* 86(1): 71-79.
- Singleton V, Orthofer R, Lamuela R. 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. En: Packer L. (ed). *Methods in Enzymology* Vol. 299. Academic Press. London, UK. Pp. 153-178.
- Thengane SR, Kulkarni DK, Shrikhande VA, Joshi SP, Sonawane KB, Krishnamurthy KV. 2003. Influence of medium composition on callus induction and camptothecin(s) accumulation in *Nothapodytes foetida*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 72(3): 247-251.
- Wiedenfeld H, Furmanowa M, Roeder E, Guzewska J, Gustowski W. 1997. Camptothecin and 10-hydroxycamptothecin in callus and plantlets of *Camptotheca acuminata*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 49(3): 213-218.
- Yoshimatsu K, Shimomura K. 1991. Efficient shoot formation on internodal segments and alkaloid formation in the regenerates of *Cephaelis ipecacuanha* A. Richard. *Plant Cell Reports* 9(10): 567-570.
- Yoshimatsu K, Shimomura K. 1994. Plant regeneration on cultured root segments of *Cephaelis ipecacuanha* A. Richard. *Plant Cell Reports* 14(2-3): 98-101.