

## Manuscrito aceptado/Accepted Manuscript

Título	Establecimiento in vitro de <i>Monstera acuminata</i> Koch y <i>Monstera deliciosa</i> Liebm
Title	In vitro establishment of <i>Monstera acuminata</i> Koch and <i>Monstera deliciosa</i> Liebm
DOI	10.15446/acag.v68n3.75891
Recibido/Received	<b>2018-10-30</b>
Aceptado/Accepted	<b>2019-06-25</b>

Este es el archivo PDF de un documento aceptado para publicación en una versión preliminar. El manuscrito pasará por una serie de fases previas a publicación en su versión final. Por favor tener en cuenta que durante el proceso de producción el documento puede tener cambios que afecten el contenido.

This is the PDF file of a document accepted for publication in a preliminary version. The manuscript will go through a series of phases prior to publication in its final version. Please note that during the production process the document may have changes that affect the content.

Manuscrito aceptado/Accepted Manuscript

# **Establecimiento *in vitro* de *Monstera acuminata* Koch y *Monstera deliciosa* Liebm**

## **In vitro establishment of *Monstera acuminata* Koch and *Monstera deliciosa* Liebm**

<sup>1</sup>Nancy Mariel Casanova Palomeque, <sup>2\*</sup> Vincenzo Bertolini, <sup>3</sup> Leobardo Iracheta Donjuan

<sup>1,2</sup> Colegio de la Frontera Sur, Unidad Tapachula, Mexico, <sup>3</sup> Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP-CERI), Tuxtla Chico, México. \*Autor para correspondencia: vin.bertolini@gmail.com

Rec.: 2018-10-30 Acep.: 2019-06-25

### **Resumen**

En el estudio se evaluó el establecimiento aséptico de *Monstera acuminata* Koch y *Monstera deliciosa* Liebm (Araceae) a partir de hojas y la inducción de la organogénesis *in vitro* de *M. acuminata* K. a partir de discos de tallos de brotes jóvenes. Para el efecto se aplicaron diferentes protocolos de desinfección a hojas maduras y brotes jóvenes, de los cuales se extrajeron explantes foliares de 1 cm<sup>2</sup> y discos de tallo de 1 mm de grosor, aproximadamente. Los explantes se establecieron en medios semisólidos con diferentes tratamientos hormonales durante la etapa de establecimiento aséptico e inducción de la organogénesis. La desinfección con hipoclorito de sodio (NaClO) al 3% por 20 min y el medio Murashige y Skoog (1962) al 50% con el preservador para cultivo de tejidos vegetales (PPM) favoreció una menor oxidación en los explantes foliares de ambas especies. Todos los explantes de *M. deliciosa* en ambos tratamientos cultivados en medio adicionado con PPM y a diferentes protocolos de desinfección sobrevivieron, no presentaron contaminación y más de 80% conservó actividad celular hasta 49 días de edad de cultivo. A los 35 días de cultivo, con la desinfección en Tween-20 + Etanol al 20% + NaClO al 2.5%, y la siembra de los explantes en el medio MS adicionado con 1 mg/l de BAP, 0.5 mg/l de AIA y 0.1 mg/l de ANA se indujeron siete brotes nuevos de discos de tallo. *Monstera deliciosa* presentó mayor capacidad de adaptación a condiciones *in vitro*. Los avances en el establecimiento aséptico y en la inducción de la organogénesis en aráceas nativas para la producción de mimbre, son la base para la conservación *ex situ* de las poblaciones locales.

**Palabras clave:** Araceae, conservación *ex situ*, establecimiento aséptico, explantes foliares, organogénesis.

### **Abstract**

In this paper we present the bases for the aseptic establishment of *Monstera acuminata* Koch and *Monstera deliciosa* Liebm from leaves and the induction of *in vitro* organogenesis of *M. acuminata* K. from discs of stems of young shoots. Different disinfection protocols were applied to mature leaves and young shoots, from which foliar explants of 1 cm<sup>2</sup> of both species were extracted, and stem disks approximately 1 mm of thick in *M. acuminata* K. The explants were established in semi-solid media with different hormonal treatments during the stage of aseptic establishment and induction of organogenesis. Disinfection with 3 % of sodium hypochlorite (NaClO) for 20 min and

50 % Murashige y Skoog medium (1962) with PPM, led to less oxidation in the leaf explants of both species. All the explants in the two treatments belonging to *M. deliciosa*, grown in medium added with PPM and different disinfection protocols, survived, did not present contamination and more than 80 % maintained answer's capacity until 49 days of culture. After 35 days of culture, with disinfection in Tween 20 + Ethanol 20% + 2.5% NaClO, and sowing of the explants in the MS medium added with 1 mg/l of BAP, 0.5 mg/l of AIA and 0.1 mg/l of ANA was induced to induce seven new shoots of stem disks. *M. deliciosa* had better ability to adapt to *in vitro* conditions. Advances in the establishment and induction of organogenesis in native araceas for wicker production are the basis for *ex situ* conservation of local populations.

**Index words:** Araceae, aseptic establishment, *ex situ* conservation, foliar explants, organogenesis.

## Introducción

La conservación de poblaciones silvestres de aráceas es de importancia porque de ellas se obtienen fibras para diversos usos en América Latina. *Monstera deliciosa* Liebm. y *Monstera acuminata* Koch son dos especies de esta familia vegetal, útiles para la construcción de herramientas de cestería, artesanías y muebles, además poseen valor cultural y económico en las comunidades Mam del Volcán Tacaná, Chiapas, México (Acebey et al., 2007). Ambas especies son elementos propios del Bosque Mesófilo de Montaña (BMM), ecosistema mexicano amenazado por la deforestación (Villaseñor, 2016) por tanto, y debido a su importancia cultural y artesanal, deben ser rescatadas bajo técnicas apropiadas de conservación ex-situ.

El cultivo *in vitro* es una técnica posible que permite almacenar, seleccionar y mantener el germoplasma bajo condiciones asépticas, para introducirlo de nuevo a su hábitat natural (Reed et al., 2013). En aráceas este método de cultivo ha sido poco documentado. Montes et al. (2004) en hojas juveniles de *Anthurium andreanum* L. encontraron que la desinfección *in vitro* con doble inmersión en NaClO al 0.53% + Tween-20 por 30 min, seguido de otra inmersión en NaClO al 0.27% + Tween-20 por 20 min, resultó eficiente para asegurar el 96% del material vegetal aséptico; mientras que Materán-Oviedo et al. (2008) recomiendan la desinfección con NaClO al 2.5% v/v, durante 15 min, seguido de la inmersión en una solución de 50 mg/l de benomyl + cisteína por 1 min.

La inducción de callo organogénico a partir de explantes foliares ha sido posible en *Anthurium andreadrum* L., según Atak y Celik (2009) empleando sales MS (1962) con 50% de la concentración de sales,

suplementadas con 0.6 mg/l de ácido 2,4-diclorofenilacético (2,4-D) y 1 mg/l de benciladenina (BA); mientras que Valle-Sandoval et al. (2008) recomiendan el uso de sales MS (1962), 3% de sacarosa y 0.6 % de agar, en combinación con bencilaminopurina (BAP) a 2 mg/l y ácido indolacético (AIA) de 0.1 - 1.8 mg/l ó 0.1 mg/l de 2, 4-D y 1 mg/l de BA, para la inducción de brotes a partir de discos de tallo.

Debido a la falta de protocolos de desinfección e inducción in vitro de plantas de la familia aráceas de interés (*Monstera* sp., entre ellas) el objetivo de esta investigación fue establecer los protocolos para el establecimiento aséptico y la inducción de la organogénesis in vitro de *M. acuminata* Koch y *M. deliciosa* Liebm, a partir de hojas y discos de tallos de brotes.

### **Materiales y métodos**

Para el estudio, las plantas de *M. deliciosa* L. y *M. acuminata* K. fueron recolectadas en comunidades del Soconusco (Chiapas, México), respectivamente en Fracción Barrio Nuevo (N 15° 04.112", O 92° 06.740") y en Guadalupe (N 14° 58.13", O 92° 18.117"). Los esquejes recolectados fueron conservados en condiciones de invernadero a 25 ± 2 °C y 77% de humedad relativa por un lapso de 80 días, en las instalaciones del Campo Experimental Rosario Izapa, del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (CERI-INIFAP).

#### **Establecimiento aséptico de *M. acuminata* y *M. deliciosa***

En este caso, para obtener los explantes fueron utilizadas dos hojas maduras por especie. En el Laboratorio de Biotecnología Vegetal del CERI-INIFAP, las hojas fueron lavadas con una solución de 5 ml de jabón neutro en 200 ml de agua. Para obtener cuatro segmentos de 3 x 12 cm por hoja, previamente se eliminó la nervadura principal antes de su correspondiente desinfección.

El primer protocolo de desinfección consistió en la inmersión de las hojas en una solución antioxidante fungicida en agitación constante compuesta por 30 g/l de sacarosa + 100 mg/l de ácido ascórbico Meyer® + 150 mg/l de ácido cítrico Meyer® + 1.5 g/l de azoxistrobin (Amistar

Sygenta®), durante 15 min. Se realizaron dos lavados con agua esterilizada; luego se sumergieron en una solución de etanol CTR® a 70% por 15 s, después en una solución de 2.5% de hipoclorito de sodio (NaClO, producto comercial Cloralex®) con tres gotas de Tween®-20 por 20 min en constante agitación. Posteriormente, se realizaron tres lavados con agua destilada esterilizada durante 2 min cada uno y por último, se colocaron durante 5 min en la solución antioxidante, anteriormente descrita.

El segundo protocolo de desinfección difirió del primero, ya que la inmersión en la solución antioxidante fungicida se hizo en agitación constante durante 3 min en bomba de vacío con doble inmersión en NaClO a 1.25% + tres gotas de Tween-20 por 15 min y en NaClO al 0.83% + tres gotas de Tween-20 por 10 min. Entre cada inmersión se realizaron dos lavados de 2 min cada uno, y tres lavados con agua destilada esterilizada antes de la inmersión en la solución antioxidante.

Se prepararon tres diferentes medios de cultivo. El primero fue el testigo que consistió en medio de cultivo Murashige y Skoog (1962) con 50% de las sales minerales, adicionado con las vitaminas de Gamborg (Gamborg et al., 1968), tiamina (0.4 mg/l), inositol (100 mg/l), sacarosa (30 g/l), Phytigel Sigma® (3 g/l) y los reguladores de crecimiento: ácido 2,4-D Sigma® (1 mg/l) y BAP Sigma® (0.2 mg/l). El segundo consistió en el medio testigo adicionado con el fungicida azoxistrobin Amistar® (1 g/l) y Polivinilpirrolidona (PVP) Sigma® (2 g/l); y el tercero fue el medio testigo adicionado con el agente Preservative for Plant Tissue Culture (PPM) Plant Cell Technology. Inc™ (1 ml/l). Los medios de cultivo se esterilizaron a 120 °C y 101325 kg/cm<sup>2</sup> de presión por 20 min en autoclaves antes de ser colocados en placa Petri de 60 X 15 mm con 10 ml en campana de flujo.

En total se construyeron 12 tratamientos con 20 repeticiones cada uno (Tabla 1). Las hojas desinfectadas se disectaron en segmentos de 1 cm<sup>2</sup>, cada explante fue colocado en placas Petri e incubado bajo condiciones de oscuridad durante 49 días. Las variables evaluadas fueron el porcentaje de supervivencia, la contaminación, la actividad

celular y la oxidación. La medición de las variables supervivencia, contaminación y actividad celular (crecimiento) fue de carácter binomial, con 1 (presencia) y 0 (ausencia), mientras que la variable oxidación fue medida por la proporción de la superficie del explante oscurecida, con porcentajes fijos de 20, 25, 50, 75 y 100 %. Las evaluaciones se hicieron cada 7 días hasta 49 días después de la siembra.

**Tabla 1.** Tratamientos para el establecimiento aséptico de *M. acuminata* y *M. deliciosa*. CERI-INIFAP. Chiapas, México.

Trat (no.).	Especie		Protocolo de desinfección		Medio de cultivo		
	<i>M. acuminata</i>	<i>M. deliciosa</i>	SAF + 70% Etanol + 2.5% NaClO + SA	SAF BV + 70% Etanol + 1.25% NaClO + 0.83% NaClO + SA	Medio Testigo (MT)	MT + Amistar + PVP	MT + PPM
1	+	—	+	—	—	+	—
2	+	—	+	—	—	—	+
3	+	—	+	—	+	—	—
4	+	—	—	+	—	+	—
5	+	—	—	+	—	—	+
6	+	—	—	+	+	—	—
7	—	+	+	—	—	+	—
8	—	+	+	—	—	—	+
9	—	+	+	—	+	—	—
10	—	+	—	+	—	+	—
11	—	+	—	+	—	—	+
12	—	+	—	+	+	—	—

Trat. = Tratamiento, SAF= Solución antioxidante fungicida, SAF BV= Solución antioxidante fungicida en bomba de vacío, NaClO= hipoclorito de sodio, SA= Solución antioxidante, MT= Medio testigo, PVP= Polivinilpirrolidona, PPM= Preservative for Plant Tissue Culture. + = Tratamiento aplicado.

### Análisis estadístico de datos

El experimento consistió en un diseño trifactorial: 2 especies, 2 protocolos de desinfección, 3 medios de cultivo. El análisis estadístico de las respuestas contaminación, reactivación y oxidación se hizo a través de un modelo lineal generalizado (GLM), con una distribución binomial para las respuestas de contaminación y actividad celular y distribución normal para la oxidación. Las comparaciones múltiples entre tratamientos fueron realizadas con la aplicación de contrastes ortogonales con corrección de Bonferroni y un nivel de significancia de 5%. Los datos de supervivencia fueron analizados a través de un modelo con censura por intervalo, aplicando la prueba de 'log rank' ponderada

asintótica con un nivel de significancia de 5% en un programa estadístico R versión 2.3 para Windows (R Core Team, 2017).

### **Inducción a la organogénesis en *M. acuminata***

En invernadero se seleccionaron brotes de *M. acuminata* de una longitud, promedio, de 6.6 cm y diámetro de 4.5 mm. El primer protocolo de desinfección consistió en la inmersión de los brotes en una solución de jabón quirúrgico Antibenzil Farmacéuticos Altamirano® al 3% durante 3 min; luego en una solución de Etanol CTR® al 70% por 1 min, y posteriormente en una solución de NaClO Cloralex® al 1.25% + 0.5 ml de Tween-20, por 10 min, todos en constante agitación. Se realizaron tres lavados con agua destilada estéril por 3, 4 y 5 min y por último, los brotes fueron inmersos en la solución antioxidante antes descrita, durante 5 min (Valle-Sandoval et al., 2008).

En el segundo protocolo de desinfección, los explantes fueron lavados con agua de grifo + 2 gotas de Tween-20 durante 5 min, después de inmersos en una solución de Etanol CTR® al 20% por 10 s fueron lavados con agua esterilizada, luego se colocaron por 20 min en una solución de NaClO al 2.08% + 2 gotas de Tween-20, en agitación constante. Se realizaron tres lavados con agua destilada estéril por 3, 4 y 5 min y, por último, fueron inmersos en una solución antioxidante con benomil Promyl® + cisteína Sigma® (1:1) a 50 mg/l durante 5 min (Materán-Oviedo et al., 2008).

Los medios de cultivo se prepararon con sales Murashige y Skoog (1962), vitaminas Gamborg (Gamborg et al., 1968), tiamina (0.4 mg/l), inositol (100 mg/l), sacarosa (30 g/l) y Bacto™ Agar BD (6 g/l). En el primer medio de cultivo se adicionaron los reguladores de crecimiento BAP Sigma® a 1 mg/l, AIA Sigma® a 0.5 mg/l, y ácido naftalenacético (ANA) Sigma® a 0.1 mg/l: En el segundo medio se adicionaron BAP Sigma® a 2 mg/l y AIA Sigma® a 1 mg/l, y ANA Sigma® a 0.5 mg/l. Los medios de cultivo se esterilizaron en autoclave a 120 °C y 101325 kg/cm<sup>2</sup> de presión por 20 min. En campana de flujo laminar (Purifier® series, Labconco®) se colocaron 10 ml en placa Petri de 60 x 15 mm.

Los brotes sin hojas envoltentes se cortaron en discos de 1 mm de grosor (explante) bajo un estereoscopio Reichert®. La siembra se realizó en forma rápida para evitar la oxidación del tejido y se respetó la polaridad positiva de los discos, según la sección de los brotes apical, media y basal. Se utilizó un brote para cada tratamiento, y en total se establecieron cuatro tratamientos con diferentes repeticiones.

Los explantes de los tratamientos 1 y 2 fueron sometidos al primer protocolo de desinfección consistente en jabón al 3% + etanol al 70% + NaClO al 1.25 % + solución antioxidante, mientras que los de los tratamientos 3 y 4 fueron sometidos al segundo protocolo (Tween-20 + etanol al 20% + NaClO al 2.08% + solución benomil + cisteína). Los explantes de los tratamientos 1 y 3 se cultivaron en el medio adicionado con BAP (1 mg/l) + AIA (0.5 mg/l) + ANA (0.1 mg/l), y los de los tratamientos 2 y 4 en el medio adicionado con BAP (2 mg/l) + AIA (1 mg/l) + ANA (0.5 mg/l).

Los tratamientos fueron mantenidos durante 14 días en condiciones de oscuridad a 28 °C y luego en fotoperiodo de 16 h. Las variables evaluadas fueron el porcentaje de supervivencia, la contaminación, la inducción de brotes y la formación de callo, tomando como medidas valores de 1 para la presencia y 0 para la ausencia. La variable oxidación se midió con porcentajes fijos de 20, 25, 50, 75 y 100%, de acuerdo con la proporción de la superficie del explante que presenta respuesta, y el número de brotes nuevos por tratamiento. Las evaluaciones se hicieron cada 7 días hasta el día 35 después de la siembra.

Con el uso de un estereoscopio Zeiss® (1.0 X FWD 81 mm) se llevaron a cabo cortes histológicos a mano alzada de los brotes inducidos, con el fin de conocer su origen celular. Los cortes fueron teñidos con dos gotas de fluoroglucinol al 0.05% por 2 min y una gota de ácido clorhídrico (HCl) al 0.1 N por 2 min, para su observación en el microscopio de luz Velab® al 4X, 10X y 40X.



## Análisis de los datos

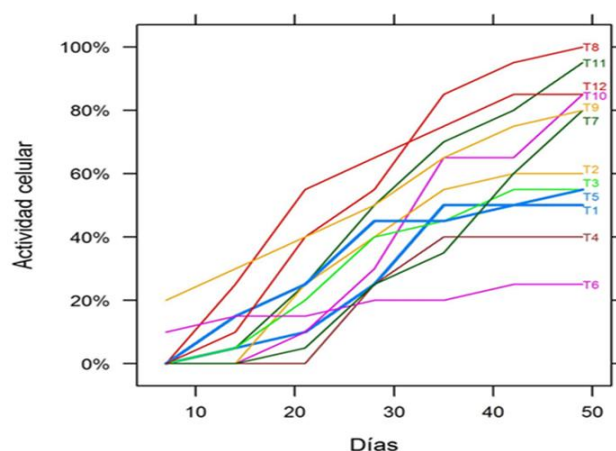
El análisis de las variables respuesta fue descriptivo. Se graficaron los porcentajes de oxidación, actividad celular y formación de callo por cada sección del brote (apical, medio y basal) a los 35 días después de la siembra en el programa estadístico R versión 2.3 para Windows.

## Resultados

### Establecimiento in vitro de *M. acuminata* y *M. deliciosa*

En el establecimiento aséptico de explantes foliares en ambas especies se encontraron diferencias ( $P < 0.05$ ) entre tratamientos para la variable supervivencia ( $\chi^2 = 77.6657$ ,  $gl = 11$ ,  $P = 4.165e-12$ ). Cuarenta y nueve días después de la siembra los explantes de *M. deliciosa* presentaron mayor sobrevivieron que los de *M. acuminata* (Tabla 2).

El análisis estadístico de la actividad celular mostró que la respuesta o actividad en los explantes tuvo interacción significativa entre tratamientos ( $\chi^2 = 48.082$ ,  $gl = 11$ ,  $P = 1.38e-06$ ) y el tiempo ( $\chi^2 = 330.84$ ,  $gl = 1$ ,  $P = 0.01$ ). La actividad celular consistió en el doblamiento, alargamiento e hinchazón de los segmentos de la hoja. Cuarenta y nueve días después de la siembra, solo los tratamientos 8, 10, 11 y 12 presentaron porcentajes superiores a 80% de actividad celular, seguido de los tratamientos 9 y 7; mientras que en los tratamientos 1, 2, 3 y 5 esta actividad varió entre 60 y 40%, y en los tratamientos 4 y 6 fue menor que 40% (Figura 1).



**Figura 1.** Curvas de actividad celular de *M. deliciosa* y *M. acuminata* en los tratamientos evaluados. T= Tratamiento. CERI-INIFAP. Chiapas, México.

**Tabla 2.** Efecto de los tratamientos en los porcentajes de supervivencia de los segmentos de hoja madura 49 días después de la siembra. Promedios de 20 repeticiones por tratamiento. CERI-INIFAP. Chiapas, México.

<b>Tratamiento</b>	<b>Supervivencia (%)</b>
<b>T1.</b> <i>M. acuminata</i> + 2.5 % NaClO + MS (A + PVP)	43.30 b*
<b>T2.</b> <i>M. acuminata</i> + 2.5 % NaClO + MS (PPM)	50.00 b
<b>T3.</b> <i>M. acuminata</i> + 2.5 % NaClO + MS	40.00 b
<b>T4.</b> <i>M. acuminata</i> + 1.25 % + 0.83% NaClO + MS (A + PVP)	45.00 b
<b>T5.</b> <i>M. acuminata</i> + 1.25 % + 0.83% NaClO + MS (PPM)	45.00 b
<b>T6.</b> <i>M. acuminata</i> + 1.25 % + 0.83% NaClO + MS	25.00 b
<b>T7.</b> <i>M. deliciosa</i> + 2.5 % NaClO + MS (A + PVP)	95.00 a
<b>T8.</b> <i>M. deliciosa</i> + 2.5 % NaClO + MS (PPM)	100.00 a
<b>T9.</b> <i>M. deliciosa</i> + 2.5 % NaClO + MS	85.00 ab
<b>T10.</b> <i>M. deliciosa</i> + 1.25 % + 0.83 % NaClO + MS (A + PVP)	90.00 a
<b>T11.</b> <i>M. deliciosa</i> + 1.25 % + 0.83 % NaClO + MS (PPM)	100.00 a
<b>T12.</b> <i>M. deliciosa</i> + 1.25 % + 0.83 % NaClO + MS	85.00 ab

\*Valores con letras iguales no son estadísticamente diferentes (log rank ponderada asintótica,  $P < 0.05$ ). NaOCl= hipoclorito de sodio, MS= Medio de cultivo Murashige y Skoog (1962), A= Amistar, PVP= Polivinilpirrolidona, PPM= Preservative for Plant Tissue Culture.

En el análisis de varianza del modelo logístico de contaminación se observó que el tiempo de cultivo influyó en la contaminación de los explantes ( $\chi^2 = 80.089$ ,  $gl = 1$ ,  $P = 0.01$ ) y a los 49 días se presentaron diferencias estadísticas entre tratamientos ( $\chi^2 = 23.694$ ,  $gl = 7$ ,  $P = 1.29E-03$ ).

La contaminación fúngica en los explantes fue más frecuente que la bacteriana. Los explantes de *M. deliciosa* desinfectados por el primer protocolo —solución antioxidante fungicida + 70% Etanol + 2.5% NaClO + Solución antioxidante— y sembrados en medio de cultivo con Amistar + PVP (tratamiento 7) y en el medio con PPM (tratamientos 8); y el tratamiento 11 del segundo protocolo —solución antioxidante fungicida en bomba de vacío + 70% Etanol + 1.25% NaClO + 0.83% NaClO + Solución antioxidante— en medio de cultivo con PPM no presentaron contaminación.

El tratamiento 10 —*M. deliciosa* + segundo protocolo de desinfección + medio MS (A + PVP)— presentó una baja respuesta (5%). Los tratamientos 9 y 12 —explantes de *M. deliciosa* en medio MS testigo, pero desinfectados con diferentes protocolos— presentaron porcentajes de contaminación inferiores a 30% y fueron significativamente diferentes al tratamiento 4 —*M. acuminata* + segundo protocolo de desinfección + medio MS (A + PVP)— con 55% y al tratamiento 6 —*M. acuminata* + segundo protocolo de desinfección + medio MS testigo— con 75%; mientras que en el resto de los tratamientos más de la mitad de los explantes presentaron niveles de contaminación entre 50 y 55%).

La oxidación en los explantes se presentó a partir del tercer día después de la siembra. El análisis mostró efectos independientes por factor, siendo altamente significativos ( $P < 0.005$ ) los efectos de la especie y del medio de cultivo ( $P < 0.0001$ ) y significativo ( $P < 0.02$ ) para el protocolo de desinfección.

#### **Inducción de la organogénesis en *M. acuminata***

Treinta y cinco días después de la siembra la sobrevivencia de los explantes en los tratamientos 1 y 3 —BAP (1 mg/l) + AIA (0.5 mg/l) + ANA (0.1 mg/l)— fue mayor que 80%, mientras que en los tratamientos 2 y 4 —BAP (2 mg/l) + AIA (1 mg/l) + ANA (0.5 mg/l)— fue menor.

El porcentaje de oxidación en los discos de tallo fue mayor en el tratamiento 4 compuesto por el segundo protocolo de desinfección — Tween 20 + Etanol al 20 % + NaClO al 2.08 % + Solución benomil + cisteína) y BAP (2 mg/l) + AIA (1 mg/l) + ANA (0.5 mg/l)— seguido de los tratamientos 2 —primer protocolo de desinfección (Jabón al 3% + Etanol al 70% + NaClO al 1.25 % + Solución antioxidante) + BAP (2 mg/l) + AIA (1 mg/l) + ANA (0.5 mg/l)— y por el tratamiento 3 —segundo protocolo de desinfección + BAP (1 mg/l) + AIA (0.5 mg/l) + ANA (0.1 mg/l)— mientras que en el tratamiento 1 —primer protocolo + BAP (1 mg/l) + AIA (0.5 mg/l) + ANA (0.1 mg/l)— fue menor que 60%.

Los discos de tallo presentaron contaminación bacteriana con mayor frecuencia en los explantes basales. Los explantes de los tratamiento 3 y 4 que fueron desinfectados por el segundo protocolo de

desinfección —Tween-20 + Etanol al 20% + NaClO al 2.08% + Solución benomil + cisteína— presentaron porcentajes inferiores de 10 %, mientras que los explantes de los tratamientos 1 y 2 desinfectados con el primer protocolo —Jabón al 3% + Etanol al 70 % + NaClO al 1.25% + solución antioxidante— mostraron porcentajes superiores a 30%, indicando que el segundo protocolo de desinfección fue más eficiente que el primero (Tabla 3).

Los tratamientos 2 y 3 presentaron porcentajes de actividad celular superiores a 80%. El tratamiento 3 presentó mayor número de explantes con brotes nuevos, seguido de los tratamientos 1 y 4; mientras que los explantes del tratamiento 2 formaron callo friable en mayor número que los demás tratamientos (Tabla 3).

Tabla 3. Efectos de especie, protocolo de desinfección y medio de cultivo, en los porcentajes de oxidación de los segmentos de hoja madura 49 días después de la siembra. Promedios de veinte repeticiones por tratamiento. CERI-INIFAP. Chiapas, México.

Variable	Oxidación (%)
<b>Especie</b>	
<i>Monstera acuminata</i> K. Koch.	73.36 ± 26.78 <sup>†</sup> a*
<i>Monstera deliciosa</i> Liebm.	42.64 ± 18.54 <sup>†</sup> b
<b>Protocolo de desinfección</b>	
SB + 2.5 % NaClO	56.12 ± 26.59 <sup>†</sup> a
CB + 1.25 % + 0.83 % NaClO	59.88 ± 28.62 <sup>†</sup> b
<b>Medio de cultivo</b>	
MS 50 % + BAP / 2,4-D + Amistar / PVP	63.85 ± 25.02 <sup>†</sup> a
MS 50 % + BAP / 2,4-D	57.62 ± 29.86 <sup>†</sup> b
MS 50 % + BAP / 2,4-D + PPM	52.53 ± 26.80 <sup>†</sup> c

<sup>†</sup> Desviación estándar. SB= desinfección sin bomba de vacío, CB= desinfección con bomba de vacío, NaClO= hipoclorito de sodio, MS 50 %= medio de cultivo Murashige y Skoog (1962) al 50 %, BAP= Bencilaminopurina, 2,4-D= Ácido 2,4-diclorofenolacético, PPM= *Preservative for Plant Tissue Culture*, PVP= *P Polivinilpirrolidona*, Amistar= Fungicida sistémico.

\*Valores con letras iguales no son estadísticamente diferentes (Corrección de Bonferroni, 0.05).

## Discusión

### **Establecimiento in vitro de *M. acuminata* y *M. deliciosa***

El genotipo y el estado fenológico del material vegetal influyeron en la supervivencia y la actividad celular de los explantes establecidos. Los segmentos de hoja que se establecieron provenían de tejido maduro. Las láminas foliares de *M. acuminata*, a diferencia de las de *M. deliciosa*, presentaron las perforaciones naturales de la especie. Estas perforaciones en las láminas foliares de especies *Monstera* están asociadas con la senescencia temprana del tejido (Gunawardena et al., 2005). Según estos autores a nivel molecular la formación de las perforaciones en las hojas de *M. obliqua* se originan del proceso de muerte celular programada (PCD) temprana en el desarrollo foliar. Este interesante comportamiento en la morfología de las hojas de *Monstera*, explica por qué los explantes de *M. acuminata* sobrevivieron menos tiempo y presentaron porcentajes más altos de oxidación y menores de actividad celular que los de *M. deliciosa*. Por otro lado, Carvajal-Guillén (2018) encontró que las hojas maduras de *M. deliciosa* presentan mayor longevidad foliar, menor amarillamiento y ausencia de daño mecánico, debido al mayor contenido de carbohidratos, proteínas y lípidos en las paredes celulares, que se asocia con una mayor rigidez y persistencia.

La contaminación de los explantes depende de las defensas biológicas de las especies y el contenido de microorganismos endófitos. Pérez et al. (2009) señalan que la densidad poblacional de bacterias endófitas es altamente variable en plantas hemiepífitas (*M. deliciosa* y *M. acuminata*) y regularmente se incrementa en plantas adultas bajo condiciones de clima cálido, en hábitat con alta diversidad y baja altitud.

El primer protocolo de desinfección resultó menos agresivo para los tejidos sin pretratamiento en bomba de vacío, por lo que sólo se realizó una inmersión en hipoclorito de sodio al 2.5% (Tabla 4), esto difiere de los resultados de Donini et al. (2005), quienes encontraron 80% de tejidos de *M. deliciosa* con una desinfección de cloro activo al 1.5%.

Tabla 4. Porcentajes de supervivencia, contaminación, actividad celular, oxidación, formación de callo y el número de brotes nuevos por tratamiento de los discos de tallo en *M. acuminata* K. a los 35 días después de la siembra. Media de mínimo 15 repeticiones. CERI-INIFAP. Chiapas, México.

Tratamiento	Super (%)	Cont (%)	A.C. (%)	Oxi (%)	Callo (%)	NBT
1. P1 + MS + BAP (1 mgL <sup>-1</sup> ) + AIA (0.5 mgL <sup>-1</sup> ) + ANA (0.1 mgL <sup>-1</sup> )	84.91	39.68	65.87	58.49	65.87	2
2. P1 + MS + BAP (2 mgL <sup>-1</sup> ) + AIA (1 mgL <sup>-1</sup> ) + ANA (0.5 mgL <sup>-1</sup> )	68.88	42.22	81.11	73.44	75.55	0
3. P2 + MS + BAP (1 mgL <sup>-1</sup> ) + AIA (0.5 mgL <sup>-1</sup> ) + ANA (0.1 mgL <sup>-1</sup> )	87.5	7.87	95.23	77.97	65.87	7
4. P2 + MS + BAP (2 mgL <sup>-1</sup> ) + AIA (1 mgL <sup>-1</sup> ) + ANA (0.5 mgL <sup>-1</sup> )	69.83	4.76	78.30	82.30	34.52	2

P1= Jabón Antibenzil al 3% + Etanol al 70 % + NaClO al 1.25% + Sol. antioxidante, P2= Tween-20 + Etanol al 20% + NaClO al 2.08% + Solución benomil + cisteína, Super= supervivencia, Cont= contaminación, A.C.= actividad celular, Oxi= oxidación, Callo = formación de callo, NBT= número de brotes nuevos por tratamiento.

El medio con el conservador PPM a 1 ml/l presentó los niveles más bajos de oxidación. En este sentido, Rihan et al. (2012) determinaron que el PPM de 1 ml/l es un agente que no solo inhibe el crecimiento microbiano, sino que también mejora el desarrollo y la calidad de brotes in vitro. Por el contrario, el uso moderado de PVP es necesario para mejorar los porcentajes de supervivencia en explantes de hojas de caña de azúcar; Shimelis (2015) recomienda aplicar 0.2 g/l para micropropagación in vitro de este cultivo.

El establecimiento aseptico de los explantes de hoja fue favorable para *M. deliciosa* a diferencia de los explantes de *M. acuminata*; sin embargo, las condiciones de oscuridad fueron ideales para inducir respuestas morfogénicas (doblamiento y alargamiento) en ambas especies, comportamiento similar al encontrado in vivo.

#### **Inducción de organogénesis en *M. acuminata***

La actividad celular en los discos de tallo consistió en turgencia, alargamiento y formación de callo friable. La capacidad organogénica (caulogénesis) posiblemente estuvo asociada con la edad fenológica y el estado fisiológico de los brotes seleccionados, ya que estos provinieron de plantas jóvenes en estado de prefloración (< 1 m de altura), lo que coincide con los resultados de los trabajos de Valderrama-Alfaro et al. (2011), quienes encontraron que la plasticidad y edad temprana del

explante mejora la división celular e influye en la mayor formación de brotes.

El balance hormonal fue diferente en cada explante, ya que dependió del brote original y de la sección determinada (apical, media, basal). Chesha Desai et al. (2015) afirma que en aráceas los explantes de las partes vegetativas contienen distintos niveles endógenos de reguladores de crecimiento, según su localización en la planta, lo cual explica las distintas respuestas in vitro, incluso en el mismo tratamiento.

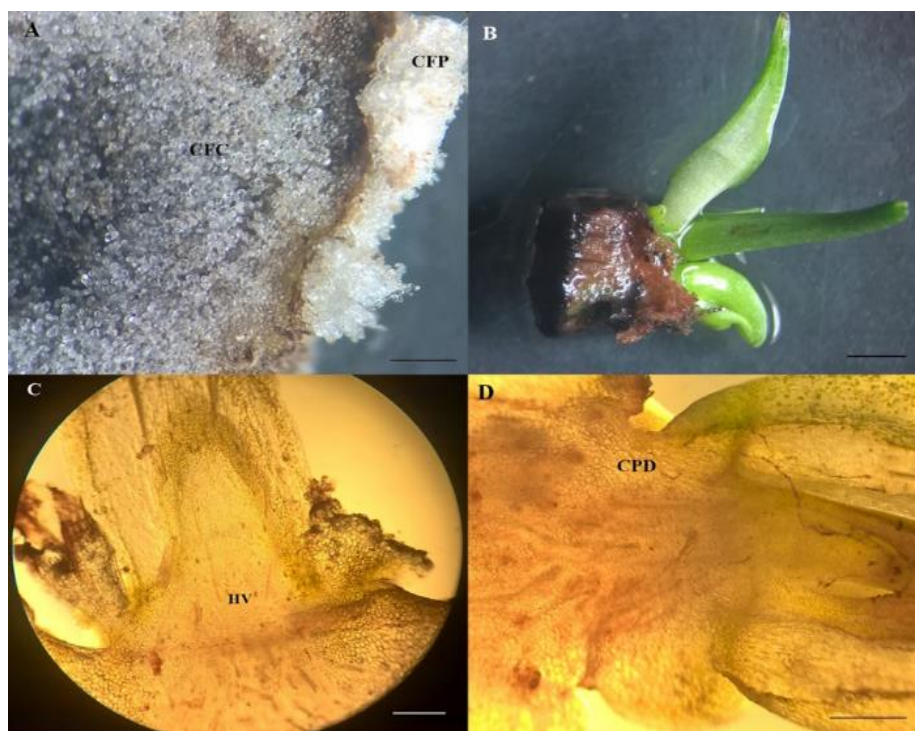
La concentración exógena de reguladores del crecimiento que favoreció la formación de brotes a partir de los discos de tallo fue: BAP (1 mg/l) + AIA (0.5 mg/l) + ANA (0.1 mg/l). Lo anterior coincide con los hallazgos de Blanco y Valverde (2004), Valderrama-Alfaro et al. (2011) y Murillo-Gómez et al. (2014), quienes recomiendan el uso de BAP a 0.8 y 1 mg/l para inducir las mejores tasas de multiplicación de brotes en *Philodendron corcovadense* y en especies de *Anthurium*, respectivamente.

El mantenimiento de los discos de tallos en condiciones de oscuridad hasta 14 días favoreció la inducción de brotes en los tratamientos 1, 3 y 4, resultado similar al obtenido por Wang et al. (2015) trabajando en cultivo de fresa (95%), después de 14 días en condiciones de oscuridad.

La formación de callo tipo friable se presentó en todos los explantes de la sección apical de los tratamientos 1 y 2 y en la mayoría del tratamiento 4. En el tratamiento 3 todos los explantes de la sección basal (100 %) media (83.33%) y apical (14.29%) presentaron esta respuesta. Estos resultados fueron similares a los encontrados por Valle-Sandoval et al. (2008), quienes en crisantemo obtuvieron el menor porcentaje de regeneración de brotes en la zona apical, y mayor en la zona media del disco de tallo de 1 mm de grosor.

Se observaron diferencias entre el callo friable que se originó en la parte central y en la periferia del disco del tallo (Figura 2A). Los brotes inducidos presentaron características de origen axilar 45 días después de la siembra (Figuras 2B y 2C) y de origen adventicio, ya que se

observaron células parénquimas con alta actividad meristémica formando parte del brote lateral (Figura 2D).



**Figura 2.** Discos de tallo de explantes del tratamiento 3 a 35 días de edad. CERI-INIFAP. Chiapas, México. A. El callo friable central (CFC) y el callo friable periférico (CFP) en un explante, barra= 1 mm. B) Brotes inducidos a los 45 días después de la siembra, barra= 2 mm. C) Corte histológico del brote principal, barra= 2 mm. D) Corte histológico de brote lateral, barra= 2.5 mm. HV= Haces vasculares CPD= células parénquimas del disco del tallo.

### Conclusiones

En este trabajo se logró el establecimiento aséptico de *M. acuminata* Koch y *M. deliciosa* Liebm. El mejor protocolo de desinfección para los explantes foliares fue el de una sola inmersión en NaClO al 2.5%, en el cual sobrevivieron todos los explantes del tratamiento 8 (*M. deliciosa* + MS (1 mg/l de BAP y 0.2 mg/l de 2,4-D) +1 ml/l de PPM).

El protocolo de desinfección de brotes de *M. acuminata* más eficiente para la inducción de brotes fue: Tween-20 + Etanol al 20 % + NaClO al 2.08 % + Solución benomil + cisteína, siendo el tratamiento 3 (sembrado en medio MS adicionados con 1 mg/l de BAP, 0.5 mg/l de AIA



y 0.1 mg/l de ANA) en el que se obtuvieron los explantes con mayor brotación.

En el caso de la inducción de organogénesis a partir de discos de tallo se logró identificar condiciones y tratamientos hormonales que propiciaron inducción de brotes; no obstante, falta comprobar el origen de los mismos y desarrollar protocolos eficientes para la inducción de brotes adventicios con totipotencia celular, los cuales son ideales para la propagación *in vitro* y posteriormente en la conservación *ex situ*.

### Agradecimientos

Este trabajo fue posible gracias al apoyo del Proyecto Diseño, Equipamiento y Puesta en Marcha de un Centro Estatal de Innovación y Transferencia Tecnológica para el Desarrollo de la Caficultura Chiapaneca (FOMIX#249930) del Instituto del Café del estado de Chiapas, México, y al Proyecto Multidisciplinario y Transversal Innovación Socio-ambiental en Zonas Cafetaleras para la Reducción de la Vulnerabilidad (MT#1106311262) del Colegio de la Frontera Sur, México.

### Referencias

- Atak, C. y Celik, O. 2009. Micropropagation of *Anthurium andraeanum* from leaf explants. *Pakistan. J. Bot.* 41(3):115-1161.
- Blanco, M. y Valverde, R. 2004. Micropropagación de *Philodendron* sp. posiblemente *P. corcovadense*. *Agronomía Costarricense* 28:34-46.
- Carvajal-Guillén, M. J. 2018. Determinación del estado de desarrollo óptimo para la cosecha de *Monstera deliciosa*, *Philodendron* sp. cv. Xanadú y *Philodendron* sp. cv. Xantal. Universidad de Costa Rica. Tesis licenciatura. Costa Rica. 55 p.
- Chesha Desai, Rajashekhar Inghalihalli, R. Krishnamurthy. 2015. Micropropagation of *Anthurium andraeanum* An- important tool in floriculture. *J. Pharmacognosy and Phytochemistry*, 4(3):112-117.
- Donini, L.P.; Ferreira-Moura, I.; Guisso, A. P.; De Souza, J. A. y Viégas, J. 2005. Preparo de lâminas foliares de aráceas ornamentais:desinfestação com diferentes concentrações de hipoclorito de sódio. *Arquivos Do Instituto Biológico de Sao Paulo* 72:517-522.
- Gamborg, O. L., Miller, R. A. y Ojima, K. 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Experimental Cell Research* 50:151-158.
- Gunawardena, A. H. L. A. N.; Sault, K.; Donnelly, P. y Dengler, N. G. 2005. Programmed cell death and leaf morphogenesis in *Monstera obliqua* Araceae. *Planta* 221:607-618.
- Materán-Oviedo, M. E, Vega-Castro, M. C.; Sánchez-Olate, M. E.; Sáez, C. K. L.; Rodríguez-Fernández, R. y Ríos-Leal, D.G. 2008. Reactivación del material vegetal élite de *Pinus radiata* D. Don. Mediante microinjerto *in vitro*. *Interciencia*, 33 (1):66-70.
- Montes, S.; Morales, C. y Bell, E. 2004. Regeneración de plantas de *Anthurium andreanum* Lind mediante el empleo del cultivo *in vitro*. *Cultivos Tropicales* 25 (3):5-7.
- Murashige, T. y Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum* 5:473 - 497.
- Murillo-Gómez, P. A.; Naranjo, E.; Callejas, R.; Atehortúa, L. y Urrea, A. 2014. Micropropagation of the native species *Anthurium antioquiense* Engl. for conservation purposes. *Agronomía Colombiana* 32:334-340.

- Pérez, C.A.; Rojas, J.S. y Vale, M.H. 2009. Biología y perspectiva de microorganismos endófitos asociados a plantas. *Revista Colombiana de Ciencia Animal* 1:286-301.
- R Core Team 2017. R:A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing. Vienna, Austria. <https://www.R-project.org/> Junio 2017.
- Reed, B.M.; Gupta, S. y Uchendu, E. 2013. *In Vitro* Genebanks for Preserving Tropical Biodiversity. En: *Conservation of Tropical Plant Species*. Springer New York. New York 77 - 106.
- Rihan, H.Z.; Al-Issawi, M.; Al-Swedi, F. y Fuller, M.P. 2012. The effect of using PPM plant preservative mixture) on the development of cauliflower microshoots and the quality or artificial seed produced. *Scientia Horticulturae* 141:47-52.
- Shimelis, D. 2015. Effects of polyvinylpyrrolidone and activated charcoal to control effect of phenolic oxidation on *in vitro* culture Establishment Stage of Micropropagation of Sugarcane *Saccharum Officinarum* L. *Journal of Applied Sciences Research* 2:52-57.
- Valle-Sandoval, M.R.; Mascorro-Gallardo, J.O. y Gil-Vázquez, I.G. 2008. Regeneración directa *in vitro* de Crisantemo, *Dendranthema X. grandiforum* kitam, a partir de segmentos de tallo. *Ecosistemas y Recursos Agropecuarios* 24:219-227.
- Valderrama-Alfaro, S.; Chico-Ruíz, J.; Quispe-Chávez, J.; y Sánchez-Marín, R. 2011. Regeneración *in vitro* de plantas de *Solanum pimpinellifolium* L. a partir de explantes foliares. *Biotecnología Vegetal* 11(1):15-25.
- Villaseñor, J.L. 2016. Checklist of the native vascular plants of México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*. México. <http://dx.doi.org/10.1016/j.rmb.2016.06.017>
- Wang, H.; Li, M.; Yang, Y.; Dong, J. y Jin, W. 2015. Histological and endogenous plant growth regulators changes associated with adventitious shoot regeneration from *in vitro* leaf explants of strawberry *Fragaria 3 ananassa* cv. 'Honeye'. *Plant Cell Tissue And Organ Culture* 123:479-488.