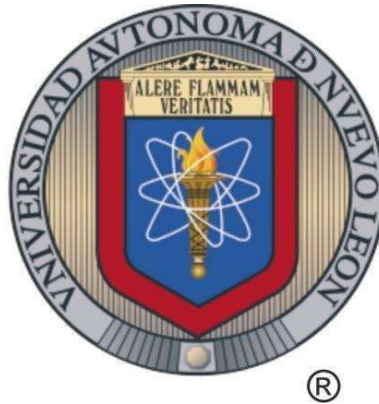


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE AGRONOMÍA



REGENERACIÓN *IN VITRO* DE CULTIVARES DE HIGUERA (*Ficus carica* L.)

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS EN PRODUCCIÓN AGRÍCOLA

PRESENTA

ING. VIASNEY OSORIA PICHARDO

General Escobedo, N. L.

Agosto de 2023

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE AGRONOMÍA



REGENERACIÓN *IN VITRO* DE CULTIVARES DE HIGUERA (*Ficus carica* L.)

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS EN PRODUCCIÓN AGRÍCOLA

PRESENTA

ING. VIASNEY OSORIA PICHARDO

General Escobedo, N.L.

Agosto del 2023

**ESTA TESIS FUE REVISADA Y APROBADA POR EL
COMITÉ PARTICULAR COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS EN PRODUCCIÓN AGRÍCOLA**

COMITÉ PARTICULAR

**Dra. Ma del Carmen Ojeda Zacarías
Directora**

**PhD. Emilio Olivares Sáenz
Codirector**

**Dr. José Elías Treviño Ramírez
Asesor**

**Dr. Alejandro Ibarra López
Asesor**

**M.C Jaime Manuel Cavazos Galindo
Asesor**

**Dra. Juanita Guadalupe Gutiérrez Soto
Subdirectora de Posgrado e Investigación**

DEDICATORIA

A Dios, por cuidarme en esta difícil travesía.

A mis queridos hijos Osmir Alejandro Costilla Osoria y Reinaldo Odlanier Pantoja Osoria gracias por su infinito apoyo, comprensión y amor.

A mi familia que siempre ha estado conmigo a pesar de la distancia.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencia y Tecnología (CONAHCYT), por el financiamiento brindado para la ejecución de mis estudios de posgrado.

A la Dra. Ma. Del Carmen Ojeda Zacarías por haberme aceptado en su equipo de trabajo. Y por el financiamiento de esta investigación que sin su apoyo no hubiera sido posible realizarla.

Al Dr. Alejandro Ibarra López, por brindarme todo el apoyo para el progreso de esta investigación, su amistad, confianza y en especial por su paciencia.

Al PhD. Emilio Olivares Sáenz, Dr. José Elías Treviño Ramírez y al M.C. Jaime Manuel Cavazos Galindo por ser miembros de mi comité de tesis.

A todos los maestros de Posgrado de la Facultad de Agronomía de la UANL, por sus enseñanzas brindadas a mi formación como Maestro en Ciencias.

A la Dra. Sandra Loruhamá Castillo Hernández de la Facultad de Ciencias Biológicas UNAL, a la Dra. Cynthia Torres Álvarez y a la Dra. Beatriz Adriana Rodríguez Romero por sus valiosos consejos.

A mi madre María Pichardo Ramírez y a mi hermana Sarai Yanitce Osoria Pichardo por su gran apoyo durante todo este tiempo.

A toda mi familia, mis amigos y compañeros en Cuba que siempre han estado al pendiente de mí y del desarrollo de mi investigación.

ÍNDICE DE CONTENIDO

ÍNDICE DE CUADROS	xi
ÍNDICE DE FIGURAS	xii
ABREVIATURAS	xiv
RESUMEN	xvi
ABSTRACT	xviii
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Hipótesis	3
1.1.1 Hipótesis General	3
1.1.2 Hipótesis Específicas	3
1.2 Objetivos	4
1.2.1 Objetivo General	4
1.2.2 Objetivos Específicos	4
2. REVISIÓN DE LITERATURA	5
2.1 Orígenes de la Higuera	5
2.1.1 Historia	5
2.1.2 Distribución	6
2.2 Clasificación Taxonómica	6

2.3	Descripción Botánica	7
2.3.1	Tallo	8
2.3.2	Hojas	8
2.3.3	Flor.....	9
2.3.4	Fruto	9
2.4	Requerimientos Abióticos de la Higuera	10
2.4.1	Temperatura.....	10
2.4.2	Suelo	10
2.4.3	Agua.....	10
2.4.4	Luminosidad	11
2.4.5	Fertilización.....	11
2.5	Tipos de Higueras	11
2.5.1	Higueras Comunes	11
2.5.2	Higuera Tipo San Pedro	12
2.5.3	Higueras Tipo Smyrna	12
2.5.4	Higueras Caprifig o Capri Fig.....	12
2.6	Cultivares de la Higuera	13
2.6.1	Cultivar Brown Turkey	13
2.6.2	Cultivar Black Mission	14
2.6.3	Cultivar LSU Tiger	15

2.7	Importancia de la Higuera	16
2.7.1	Importancia Económica	16
2.7.2	Usos Medicinales	16
2.8	Producción de la Higuera	17
2.8.1	Mundial	17
2.8.2	Nacional.....	18
2.8.3	Estatal.....	18
2.9	Propagación Tradicional	19
2.10	Propagación por Cultivo de Tejidos vegetales	19
2.11	Propagación de la Higuera por Cultivo de Tejidos	20
2.11.1	Explante.....	21
2.11.2	Asepsia de los Explantes	21
2.11.3	Medio de Cultivo.....	22
2.11.4	Multiplicación.....	25
2.11.5	Oxidación	26
3.	MATERIALES Y MÉTODOS	28
3.1	Localización del Estudio	28
3.2	Material Vegetal.....	29
3.3	Preparación del Material.....	29
3.4	Técnica de Pre-desinfección.....	30

3.5	Técnica de Desinfección	31
3.6	Establecimiento <i>in vitro</i> de Microestacas	31
3.6.1	Aislamiento de Microorganismos	33
3.6.2	Efecto de Antibióticos	35
3.7	Multiplicación <i>in vitro</i> de Brotes	36
3.8	Diseño Experimental	36
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	38
4.1	Establecimiento Aséptico	38
4.1.1	Desinfección	38
4.1.2	Aislamiento de Microorganismos	39
4.1.3	Efecto de los Antibióticos	42
4.1.4	Establecimiento <i>in vitro</i>	44
4.2	Multiplicación <i>in vitro</i>	45
5.	CONCLUSIONES	49
6.	BIBLIOGRAFÍA	50

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Contenido	Página
1	Tratamientos de desinfección de los explantes de higuera (<i>Ficus carica</i> L.).....	31
2	Concentraciones de BAP utilizadas en la etapa de multiplicación de higuera (<i>Ficus carica</i> L.).....	36
3	Porcentaje de contaminación y viabilidad de microestacas de higuera, después de dos semanas del establecimiento.....	39
4	Halos de inhibición mediante antibiograma a diferentes temperaturas.....	41
5	Porcentaje de explantes contaminados y necróticos por antibiótico.....	43
6	Porcentaje de supervivencia de microestacas de los cultivares de higuera, después de dos semanas del establecimiento.....	45
7	Comportamiento de las variables en los cultivares de higuera durante la multiplicación <i>in vitro</i> , después de cuatro semanas del subcultivo.....	47
8	Efecto de las concentraciones BAP en la multiplicación <i>in vitro</i> de higuera, después de cuatro semanas del subcultivo.....	48

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Características morfológicas de la higuera (<i>Ficus carica</i> L.). A) Tallo; B) Hojas; C) Infrutescencia o fruto compuesto (sicono).....	7
2	Cultivar Brown Turkey con frutos.....	14
3	Cultivar Black Mission con frutos.....	15
4	Cultivar LSU Tiger con frutos.....	16
5	Laboratorio de Cultivo de Tejidos de la FAUANL.....	28
6	Cultivares donantes de varetas. A) Brown Turkey; B) Black Mission; C) LSU Tiger D) White Kadota.....	29
7	Estacas de higuera empleadas para la siembra. A) cv. Black Mission; B) cv. Brown Turkey; C) cv. White Kadota; D) cv. LSU Tiger.....	30
8	Metodología para el establecimiento de microestacas de higuera. A) Lavado y cepillado manual de las estacas con jabón y agua potables; B) Lavados con jabón líquido y agua potable en agitación; C) Solución fungicida-bactericida, D) Enjuague del material; E) Inmersión en alcohol etílico al 70 %; F) Tratamiento en campana con NaClO más Tween-20, G) Microestacas para la siembra, H) Explantes sembrados en el medio de cultivo.....	33

9	Material vegetal utilizado para el aislamiento de los microorganismos.....	34
10	Procedimiento para la identificación de la bacteria. A) Siembra de la bacteria; B) Vista desde el microscopio; C) Montaje de los discos de antibióticos.....	35
11	Crecimiento e inhibición del microorganismo. A) Crecimiento bacteriano a 24 °C; B) Crecimiento bacteriano a 37 °C; C) Inhibición del crecimiento de la bacteria.....	41
12	Comportamiento de los explantes en los medios con antibióticos. A) Explantes necrosados con Gentamicina; B) Explantes viables en medio con Ceftriaxona.....	43
13	Explantes obtenidos en la fase de establecimiento para la multiplicación. A) Black Mission; B) LSU Tiger; C) Brown Turkey...	46
14	Explantes en medio de multiplicación. A) LSU Tiger; B) Black Mission; C) Brown Turkey.....	48

ABREVIATURAS

MS	Murashige y Skoog, 1962
WPM	Woody Plant Medium, Lloyd y McCown, 1980
ANA	Ácido 1-naftalenacético
AIB	Ácido indol-3-butírico
AIA	Ácido indolacético
AG ₃	Ácido giberélico
BAP	6-bencilaminopurina
NaClO	Hipoclorito de sodio
Tween-20	Polisorbato 20
mL	Mililitro
cv	Cultivar
h	Hora
L	Litro
mg	Miligramo
g	Gramo
min	Minuto
mL L ⁻¹	Mililitro por litro
mg L ⁻¹	Miligramo por litro
°C	Grados Celsius

%	Porcentaje
SPSS	Statistical Package for the Social Sciences
g L ⁻¹	Gramo por litro
m	Metro
RCV	Regulador de crecimiento vegetal
CFX	Cefotaxima
CTX	Ceftriaxona
Cl	Cloranfenicol
Nf	Nitrofurantoina
AK	Amikacina
GE	Gentamicina
NET	Netilmicina

RESUMEN

El cultivo de la higuera (*Ficus carica* L.) en México es de reciente introducción, sin embargo, las condiciones en algunas regiones del país permitirían lograr que el cultivo de higo llegue a ser de gran importancia económica, unidas a las crecientes demandas, tanto norteamericanas como europeas.

La higuera ha sido propagada tradicionalmente por injertos y estacas, con la desventaja que estos métodos solo generan una sola planta por estaca. Por otro lado, la propagación vegetativa *in vitro* o micropropagación puede ser una alternativa ya que se pueden producir plantas sanas, en corto plazo y con características homogéneas.

El objetivo de este trabajo fue desarrollar la regeneración *in vitro* de cultivares de higuera (*Ficus carica* L.) que permita su propagación.

Para el establecimiento *in vitro* se utilizaron microestacas como explante, las cuales se desinfectaron en una solución fungicida-bactericida durante 60 min. Con el uso de un antibiograma se obtuvo la identificación de antibióticos que se utilizaron para la desinfección de los explantes. En campana de flujo laminar se evaluaron dos concentraciones de Cloralex® 20 y 30% a 20 y 30 minutos y se procedió a la siembra. Se inocularon en el medio MS al 50%, adicionado con ceftriaxona y BAP. En el establecimiento se obtuvo un 87% en promedio de supervivencia y asepsia del material vegetal, mientras que, en la multiplicación *in vitro*, los brotes de los cultivares respondieron de manera uniforme a las concentraciones de BAP, en las variables evaluadas número de hojas, longitud y número de brotes, después de cuatro semanas.

Palabras clave: Moraceae, organogénesis, recalcitrancia, endógeno.

ABSTRACT

Fig tree (*Ficus carica* L.) cultivation in Mexico is a recent introduction, however, conditions in some regions of the country would allow fig cultivation to become of great economic importance, together with the growing demands of both North America and Europe.

The fig tree has traditionally been propagated by grafting and cutting, with the disadvantage that these methods only generate a single plant per cutting. On the other hand, *in vitro* vegetative propagation or micropropagation can be an alternative since healthy plants can be produced in a short period of time and with homogeneous characteristics.

The objective of this work was to develop *in vitro* regeneration of fig tree (*Ficus carica* L.) cultivars to allow their propagation.

For the *in vitro* establishment, microcuttings were used as explants, which were disinfected in a fungicide-bactericide solution for 60 min. The antibiotics used for the disinfection of the explants were identified using an antibiogram. In a laminar flow hood, two concentrations of Cloralex[®] 20 and 30% were evaluated at 20 and 30 minutes and the sowing was carried out. They were inoculated in 50% MS medium, added with ceftriaxone and BAP. In establishment, an average of 87% survival and asepsis of the plant material was obtained, while, in *in vitro* multiplication, the shoots of the cultivars responded uniformly to the concentrations of BAP, in the evaluated variables number of leaves, length and number of shoots, after four weeks.

Keywords: Moraceae, organogenesis, recalcitrance, endogenous.

1. INTRODUCCIÓN

Originaria del oeste de Asia, la higuera (*Ficus carica* L.), ha sido cultivada desde la antigüedad, junto con la vid, la palma datilera y el olivo, es considerada dentro de los cultivos más representativos de las civilizaciones mediterráneas (Kislev *et al.*, 2006; Mendoza, 2018). El higo ha sido considerado durante mucho tiempo como un fruto exquisito, en algunas culturas incluso se ha utilizado en ceremonias sacramentales (Khadari *et al.*, 2005).

La higuera es una planta muy extendida capaz de adaptarse a diferentes climas, encontrándose tanto en climas templados, cálidos y subtropicales. Asimismo, los higos en los últimos tiempos están ganando cada vez más interés en el mercado debido a su alto valor nutricional en azúcares, minerales y antioxidantes (Barolo *et al.*, 2014).

En comparación con otros cultivos más conocidos, cuya productividad y cifras económicas distan mucho del cultivo en cuestión, en México el higo tiene importancia media. No obstante, dadas las condiciones ambientales en algunas partes del país y la creciente demanda de higos tanto de América del Norte como en Europa, la producción de higos mexicanos podría aumentar en los próximos años (Aradillas, 2015). Para ello, es preciso mejorar en las técnicas agronómicas, así como en otros aspectos relacionados tales como la investigación, la inversión y difusión, entre otros. Por lo que toda acción encaminada a acelerar este proceso permite una adopción más rápida del material necesario para constituir una plantación (Flores-Mora *et al.*, 2009).

Tradicionalmente las estacas, los injertos y los acodos son los métodos más utilizados para la propagación de las higueras. Estos métodos producen individuos

genotípicamente similares a la planta madre que le dio origen y con un bajo precio, pero tienen el inconveniente de ser portadores de la enfermedad del mosaico de la higuera (FMV), la cual afecta a muchas plantaciones en el mundo (Hartmann *et al.*, 2002).

Para poder desarrollar estas técnicas de propagación, se requiere que las plantas que se van a utilizar se encuentren en fase vegetativa por lo que, debido a esto, solo se produce una planta por estaca, por lo que estos métodos no permiten cumplir con las exigencias del mercado, restringiendo la posibilidad de la propagación masiva del cultivo (Rojas *et al.*, 2004).

Con la ayuda de la micropropagación ahora es posible obtener material con mejores cualidades agronómicas en cualquier época del año en menor tiempo y espacio y con un aprovechamiento máximo del propágulo. Dado que se puede producir una gran cantidad de material vegetal rápidamente con un excelente control sanitario y en un período de tiempo más corto que los métodos tradicionales, el cultivo *in vitro* podría llegar a ser una alternativa económicamente ventajosa (Ramos-Amaya, 2012; Rodríguez, 2018), y al mismo tiempo lograr propagar cultivares de los que se tienen pocos especímenes.

Por lo anterior, el objetivo de la presente investigación es desarrollar un protocolo que permita la regeneración *in vitro* de diferentes cultivares de higuera (*Ficus carica* L.).

1.1 Hipótesis

1.1.1 Hipótesis General

La regeneración *in vitro* en cultivares de higuera (*Ficus carica* L.), se puede obtener mediante la aplicación de diferentes combinaciones y concentraciones de reguladores de crecimiento en los medios de cultivo.

1.1.2 Hipótesis Específicas

1. La concentración y el tiempo de exposición del agente desinfectante permitirán el establecimiento aséptico en los explantes de cultivares de higuera (*Ficus carica* L.).
2. La inducción y multiplicación de brotes en la higuera (*Ficus carica* L.), se puede lograr mediante la combinación de reguladores de crecimiento y suplementos adicionados al medio de cultivo.

1.2 Objetivos

1.2.1 Objetivo General

Desarrollar la regeneración *in vitro* de cultivares de higuera (*Ficus carica* L.) que permita su propagación.

1.2.2 Objetivos Específicos

1. Evaluar la composición de agentes desinfectantes que permitan el establecimiento aséptico, en explantes de cultivares de higuera (*Ficus carica* L.).
2. Definir la combinación de reguladores de crecimiento vegetal que permitan la inducción y multiplicación de brotes en cultivares de higuera (*Ficus carica* L.).

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Orígenes de la Higuera

La higuera común (*Ficus carica* L.) se conoce así por ser originaria de Caria, al sudoeste de Anatolia en Turquía, es un frutal el cual fue domesticado en la antigüedad en el occidente de Asia (Condit, 1969); consecutivamente, se extendió por completo por el Mediterráneo, y en la Grecia clásica eran considerados manjares. Actualmente los países más importantes en la producción de higos se encuentran en la cuenca Mediterránea, aunque también se han introducido con éxito en países lejanos como Estados Unidos, Brasil, Sudáfrica, China, Japón y México (Melgarejo, 2019).

2.1.1 Historia

La higuera es un árbol que constantemente ha estado asociado a la región del Mediterráneo y su fruto es considerado como uno de los primeros en ser cultivado por los humanos. Los fósiles más antiguos se han encontrado en el Valle de Jordán y estos datan del año 12 000 a.C (Khadari *et al.*, 2005).

En la Biblia se menciona que la higuera fue el primer árbol del Edén. Para la cultura Mesopotámica representa el árbol del conocimiento, además se indica que el higo contiene numerosos granos que simbolizan la universalidad y la unidad del conocimiento humano (Gariglio *et al.*, 2013).

Esta fruta es un símbolo de buena fortuna, iniciación sexual, fertilidad y abundancia. Por ejemplo, en África las mujeres confeccionan un ungüento con la savia blanca del

higo para prevenir la esterilidad y estimular la lactancia. El fruto de la higuera evoca la generosidad y fertilidad de la naturaleza que sostiene al hombre con sus frutos espontáneos incluso antes de que el hombre domesticara y cultivara árboles frutales (Melgarejo, 2000).

2.1.2 Distribución

Originario de Asia, Europa, África y el Pacífico, todas las especies del género *Ficus* se encuentran en climas subtropicales y tropicales. Aunque la higuera puede crecer en una variedad de lugares y climas, su mejor crecimiento ocurre en regiones templadas. Se reservan grandes extensiones de tierra para su cultivo en naciones como Turquía, Brasil, Portugal y España. Como resultado del aumento del valor económico de la higuera numerosos países cada vez están sembrando mayores extensiones de tierra para el cultivo de dicho frutal (Chávez, 1996).

2.2 Clasificación Taxonómica

El género *Ficus* cuenta actualmente con más de 750 especies diferentes identificadas en todo el mundo, pero la más cultivada ha sido la higuera (*Ficus carica* L.), alrededor de 300 higueras se cultivan para el consumo del ser humano. El número somático de esta especie es $2n = 26$, con $n = 13$ como número básico de cromosomas y es diploide (Melgarejo, 2019). Su clasificación es la siguiente según publicación en el Integrated Taxonomic Information System (ITIS, 2022).

Reino: Plantae

Subreino: Viridiplantae

Superdivisión: Embryophyta

División: Magnoliophyta

Subdivisión: Spermatophytina

Clase: Magnoliopsida

Orden: Rosales

Familia: Moraceae

Género: *Ficus*

Especie: *Ficus carica* L., 1753

2.3 Descripción Botánica

La planta de higuera (*Ficus carica* L.), se caracteriza por tener un crecimiento extremadamente rápido, alcanzando una altura que va de 3 a 6 m y alcanzando un ancho de copa de hasta 9 a 10 m (Catraro, 2014).

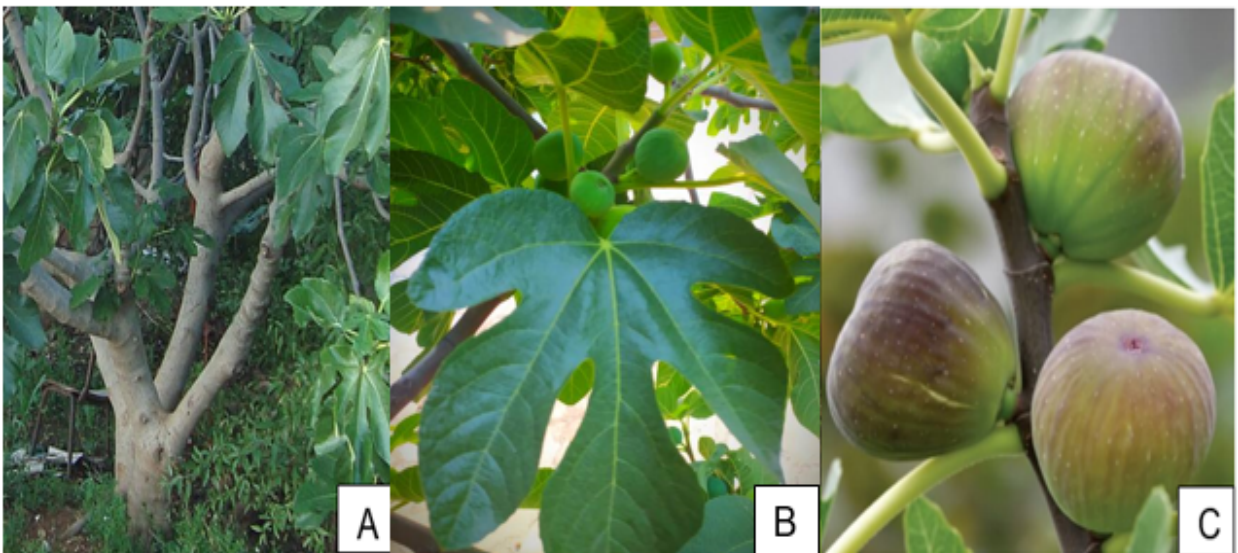


Figura 1. Características morfológicas de la higuera (*Ficus carica* L.). A) Tallo; B) Hojas; C) Infrutescencia o fruto compuesto (sicono).

2.3.1 Tallo

Las higueras muestran un tallo robusto y grueso (Fig. 1A), de corteza de color gris y lisa la cual suele agrietarse con facilidad ya que es suave y muy delgada, lo cual provoca debilidad en la planta. El tallo presenta entrenudos abultados y en cada yema axilar se desarrollan hojas e infrutescencias. Presenta ramas grandes y de estilo colgante, que son capaces de enraizar fácilmente al entrar en acercamiento con la tierra (Gariglio *et al.*, 2013). En condiciones de ambiente favorables para la planta, los tallos se presentan globosos y vigorosos, llegando alcanzar hasta 10 m de altura. Al contrario, cuando hay presencia de situaciones desfavorables como sequías o heladas, los tallos se muestran pequeños y compactos. Las ramas son fáciles de enraizar y se utilizan como medio de propagación de la especie (García, 2014; Pucha, 2016; Lucero, 2018).

2.3.2 Hojas

Las hojas de la higuera son grandes, ásperas al tacto y tienen una superficie superior de color verde brillante y una parte inferior pálida (Contreras-Saavedra, 2019). Son simples, alternas y palmeadas y presentan de tres a siete lóbulos de acuerdo con la variedad (Fig. 1B). Tiene como característica la producción de un látex áspero, lechoso y gomoso, en hojas y en toda la totalidad de las partes verdes de la planta, el cual es altamente venenoso y tóxico, y es aprovechado por la planta como un mecanismo de

defensa causándole la muerte a insectos y microorganismos (Melgarejo, 2000; Pucha, 2016; Lucero, 2018).

2.3.3 Flor

Las flores de la higuera se ubican dentro del llamado fruto sicono (Fig. 1C), dentro del cual se pueden encontrar pequeñas flores unisexuales y que tienen como única salida al exterior por el ostiolo. El ovario, un estilo largo y un estigma bífido conforman las flores femeninas. Tres sépalos y cuatro estambres constituyen las flores masculinas (Flaishman *et al.*, 2008). La higuera que originalmente es monoica, por presentar flores femeninas y masculinas en el mismo tallo, ahora ha cambiado a ginodioica, porque durante el proceso de domesticación el grupo de flores masculinas desaparecieron y las flores femeninas se adaptaron a los himenópteros *Blastophaga psenes* con el que forman una relación simbiótica (González y Grajal, 2011; Pucha, 2016; Lucero, 2018).

2.3.4 Fruto

El fruto es llamado sicono (Fig. 1C), cual es el receptáculo floral fecundado que se engrosa y se vuelve carnosos, desarrollando infrutescencias denominadas breva o higos, los cuales se diferencian por su desarrollo temporal y por su maduración (Solomon *et al.*, 2006). Las infrutescencias son blandas de un sabor dulce protegidos por un delgado exocarpio que presenta varios tonos como café, verde, amarillo, morado o rojo según el cultivar, que en su interior contiene pequeños aquenios parecidos a una semilla pero que en realidad son los verdaderos frutos (Melgarejo, 2000; Pucha, 2016; Lucero, 2018).

2.4 Requerimientos Abióticos de la Higuera

2.4.1 Temperatura

La higuera es un cultivo para climas templados y puede soportar temperaturas tan bajas como -7°C y tan altas como 40°C ; si las temperaturas se comportan por encima de estos valores pueden llegar a estresarse. Se dice que el rango de temperatura óptimo para el buen crecimiento del cultivo esta entre 18°C a 21°C y demanda de 100 a 400 horas de frio (Bravo, 2009; Anima, 2019).

2.4.2 Suelo

La higuera para su buen desarrollo necesita de un suelo con una ligera pendiente preferentemente de estructura franco arcilloso, con un elevado grado de fertilidad y buena capa superficial (Mendoza, 2019). Tomalá y Ulloa (2015) expresan que los suelos bien drenados y permeables son los más recomendables para el cultivo de la higuera, ya que presentan una alta susceptibilidad a las enfermedades que atacan a la raíz, no obstante, es capaz de adaptarse fácilmente a suelos semiáridos y pedregosos. Gómez (2014) por su parte afirma, que la higuera se desarrolla bien en suelos con pH 6.0 y 7.8, que presenten textura franco arenoso y que sean profundos, además con alto contenido de calcio y boro y baja humedad para producir un cultivo de alta calidad.

2.4.3 Agua

La higuera necesita poca dosis de riego, pero si debe ser constante, sobre todo en la época de verano, requiriendo aproximadamente entre de 600 y 700 litros anuales. El

agua es muy necesaria en la fructificación del cultivo donde se deben realizar riegos cortos y frecuentes (Grau y Vera, 2016; Mendoza, 2019).

2.4.4 Luminosidad

El cultivo de higo demanda una gran iluminación, necesitando al menos ocho horas de sol directo, pero deben evitarse las exposiciones prolongadas en el verano. La iluminación intensa garantiza la calidad del fruto ya que incide en el contenido de azúcares y en el desarrollo de la planta (Mendoza, 2019).

2.4.5 Fertilización

La higuera logra desarrollar excelentes cosechas en suelos que presentan baja fertilidad, sin embargo, con el uso de fertilizantes, se puede llegar a aumentar la fructificación y el vigor de la planta. Prácticamente, las higueras deben ser fertilizadas como otros frutales, pero con la diferencia de que en muy pocas ocasiones la higuera presenta deficiencia de hierro y zinc, pero si presentan deficiencias de nitrógeno. Por lo que se exhorta la aplicación de 0.45 a 0.65 kg de nitrógeno por planta al año (Fernández, 2016).

2.5 Tipos de Higueras

Según el número de cosechas obtenidas en el año y la forma de la polinización se han definido cuatro tipos de higueras (Melgarejo, 2000; García, 2014).

2.5.1 Higueras Comunes

Son plantas que presentan flores hermafroditas. Sus frutos son partenocárpicos, se pueden autopolinizar por lo que no sucede la fecundación, el fruto se desarrolla por la incitación que promueve el grano de polen sobre el estigma, no forman semillas y se obtienen dos cosechas anuales y solo producen higos (Aguilera-Ortíz *et al.*, 2009). Son cultivadas en España, México y Estados Unidos. La Black Mission es un ejemplo de variedades pertenecientes a este tipo de higuera (Rosianzkey *et al.*, 2016).

2.5.2 Higuera Tipo San Pedro

Las plantas de este tipo muestran flores dióicas, frutos partenocárpicos que se presentan en la primera y segunda cosecha y necesitan de la polinización. La mayor producción de este tipo de higuera se concentra en España, al igual que en los Estados Unidos. Ejemplos de variedades están la Dauphine, San Pedro y King (Melgarejo, 2000).

2.5.3 Higueras Tipo Smyrna

Estas plantas precisan de la polinización y solo producen flores femeninas. Son cultivados fundamentalmente en el continente Europeo y Africano, presentan flores dióicas, los frutos producen semillas y solo se cosecha una vez al año. Como ejemplo se pueden mencionar a las variedades Sarylop, Zidi y Marabout (Melgarejo, 2000; García, 2014; Juárez, 2019).

2.5.4 Higueras Caprifig o Capri Fig

Son conocidas como higueras silvestres. Las plantas de este tipo de higueras producen flores dioicas, se obtienen tres cosechas por año, pero con la diferencia de

que los frutos resultantes no se pueden consumir, únicamente se pueden utilizar como fuente de polen. Estos frutos son utilizados como hospederos para la avispa (*Blastophaga senes*) polinizadora de la higuera, por tal razón se cultiva en todas las zonas productoras de higos del tipo Smyrna y San Pedro (Flaishman, 2008; Gonzales y Grajal, 2011).

2.6 Cultivares de la Higuera

Aunque los cultivares se denominan con frecuencia variedades, es importante entender que el término variedad se refiere a una categoría intraespecífica desarrollada por un grupo de organismos de una especie los cuales son genética y morfológicamente diferentes, habitualmente como consecuencia del aislamiento geográfico. Por otro lado, el cultivar es una población particular de plantas, la cual fue preservada artificialmente por la acción del hombre y no se encuentra en la naturaleza (Hartmann *et al.*, 2002). Existen numerosas variedades de higuera, pero podemos clasificarlas en blancas, negras y coloradas según el color, las blancas cuando maduran presentan un color amarillento, blanquecino e incluso verde destacándose la variedad Kadota, las coloradas se caracterizan por el color pardo azulado de sus higos y las negras presentan higos de color rojo hasta negro púrpura representados por la Brown Turkey y Celestial (Juárez, 2019). Aunque existen numerosas variedades de higos, las más apreciadas en México son Brown Turkey, Black Mission, Sierra y Tiger debido a sus cualidades únicas (Anima, 2019).

2.6.1 Cultivar Brown Turkey

Es una variedad bífera, originaria de Francia e Italia y se produce actualmente en Italia, Israel y California. Forma parte del género de los higos de gran tamaño con peso medio de hasta 90 g (Fig. 2). Estos higos se producen mejor en los meses de abril a enero y maduran desde los finales de julio y hasta los finales de septiembre. Tienen forma de pera, con una piel de color rojo oscuro de muy alta calidad; su tamaño varia de 4 a 6 cm y presentan un sabor dulce (Córdova, 2018).



Figura 2. Cultivar Brown Turkey con frutos.

2.6.2 Cultivar Black Mission

Black Mission conocido también como Mission Figs o Franciscana, fue introducida en México en la época colonial por misioneros franciscanos, es un cultivar bífero y no requiere de otras higueras para ser polinizada (Fig. 3). El árbol presenta larga vida y tiene una alta capacidad de adaptarse a situaciones ambientales desfavorables. La breva es grande y el higo es de tamaño mediano. Es un higo de piel color violeta intenso y el interior es color rojo. La piel de la fruta a menudo se agrieta cuando está madura. El cultivar permite dos cosechas, que comienza en mayo con las brevas y en julio comienza la del higo (Flaishman *et al.*, 2008).



Figura 3. Cultivar Black Mission con frutos.

2.6.3 Cultivar LSU Tiger

LSU Tiger es un cultivar del tipo común unífera, presenta una sola cosecha de higos por temporada (verano-otoño), el fruto tiene buena calidad, con un tamaño grande de 50 g y unos 30 a 40 mm de diámetro. Muestra una epidermis de coloración marrón claro con un color verde alrededor del ostiolo y franjas de color marrón más oscuras que van desde el pedúnculo hasta el ostiolo siendo característico del cultivar. Los frutos son ovalados con un cuello cilíndrico de tamaño mediano, ligeramente redondeados en el extremo distal alrededor del ostiolo con una ligera disminución en la terminación del pedúnculo (Fig. 4). Es autofértil y no requiere la polinización de otras higueras. Un rasgo importante es su maduración temprana para temporadas de crecimiento cortas en zonas frías de Estados Unidos como Florida, Luisiana, Carolina del Sur y Carolina del Norte (Sarkhosh *et al.*, 2020).



Figura 4. Cultivar LSU Tiger con frutos.

2.7 Importancia de la Higuera

2.7.1 Importancia Económica

Es un árbol muy importante porque sus frutos secos se pueden comer durante todo el año y cuando los recursos son escasos. Quizás sea por ello que el árbol apareció en diversas religiones y mitos en la época (Melgarejo, 2000). La loba Luperca cuidaba a Rómulo y Remo en la antigua Roma bajo una higuera y la Biblia hace numerosas referencias a los árboles de higuera (Bernardi *et al.*, 2018). Los higos se pueden comer crudos para aprovechar su frescura y dulzura, también son utilizados en innumerables platos, desde ensaladas hasta aderezos para carnes y pasteles, (Suárez *et al.*, 2022).

2.7.2 Usos Medicinales

Los higos son una fruta rica en fibras, hidratos de carbono, vitaminas (A, B y C), agua y minerales como magnesio, potasio, fósforo y calcio. Su valioso contenido en fibras combate el estreñimiento al facilitar el movimiento intestinal, permitiendo que la digestión se realice con mayor eficiencia y rapidez. Las fibras también apoyan la

eliminación de líquidos del cuerpo. Por su bajo contenido en grasas y proteínas, el fruto es usado para dietas equilibradas (Villalobos, 2015; Fernández, 2016; Salomón *et al.*, 2017). La fruta contiene una alta variedad de minerales, pero su alto contenido de potasio y bajo contenido de sodio, se destaca por ser especialmente beneficiosos para las personas con presión arterial alta y problemas cardiovasculares. Además, por su alto contenido en calcio es la fruta con mayor contenido (162/100) y por su composición en omega 3 y 6 es un alimento adecuado para la prevención de enfermedades coronarias y mantener el sistema óseo en buena forma (Pineda y Yocabet, 2021; Mahesar *et al.*, 2023).

Es una fruta con mucha pectina, la cual ayuda al organismo a expulsar toxinas y colesterol del cuerpo durante la digestión. Tiene propiedades antirreumáticas siendo ventajoso para aquellas personas que practican deporte y desgastan mucho las articulaciones (Bashir *et al.*, 2023). Sus potentes propiedades expectorantes ayudan en la prevención de infecciones como resfriados, bronquitis y mucosidad excesiva. Las infusiones de la hojas se utilizan para reducir las inflamaciones bucales (Mendoza *et al.*, 2013). Los higos son una excelente fuente de compuestos fenólicos como las proantocianidinas, los cuales están en mayor concentración incluso comparándolos con el té verde y el vino tinto. (García, 2014; Debib y Menadi 2023; Meziat y Bachir-bey, 2023).

2.8 Producción de la Higuera

2.8.1 Mundial

En todo el mundo se cultivan más de 299 541 ha de higos. En el año 2006 se logró el máximo histórico de superficie cultivada a nivel mundial con 460,900 ha y más de 1, 200,000 toneladas. Las principales naciones productoras de higos se encuentran en la zona mediterránea; Turquía ocupa el primer lugar, con una producción que alcanza 320,000 ton en el año 2020, Egipto ocupa el segundo con 201,212 ton y Marruecos, Argelia e Irán ocupan el tercero, cuarto y quinto lugar (FAOSTAT, 2021). Debido a que la mayor parte de las superficies en la zona mediterránea se cultivan en secano y en condiciones climáticas adversas como sequias, altas temperaturas, y heladas, la producción ha experimentado importantes oscilaciones (López, 2017).

2.8.2 Nacional

Morelos y BCS, así como Puebla, Veracruz e Hidalgo son los principales productores de higos en México. El área cosechada a nivel nacional en el año 2022 fue de 1,832.08 ha de higuera, con una producción estimada total de 11,504.98 ton y con un valor de cosecha de alrededor de 270,212.26 pesos reportado por el Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquería (SIAP, 2022). En relación a la superficie establecida por estado, en el 2018 el estado con mayor superficie fue Morelos, en segundo lugar, Baja California Sur, seguido por Veracruz y Puebla (SIAP, 2022).

2.8.3 Estatal

El cultivo del higo en el estado de Nuevo León ha incrementado gracias a los impulsos científicos y tecnológicos realizados principalmente en la Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL) la cual se encarga de brindar conocimientos e información a los

productores interesados en el cultivo. El cultivo se efectúa simplemente en uno solo de los 51 municipios que conforman la entidad, siendo el municipio de General Terán con una superficie sembrada de 15 ha (SIAP, 2020).

2.9 Propagación Tradicional

Las estacas, los injertos y los acodos son los métodos tradicionales para la propagación de la higuera, proporcionando buenos resultados en aquellas naciones donde se ejecutan grandes producciones (Flores y Jimenez, 2007; Monreal, 2021). Esto da como resultado la adquisición de individuos que comparten el genotipo de los padres y un bajo costo de producción material. El hecho de que las plantas estén en estado vegetativo facilita el uso de estas técnicas, pero debido a que cada esqueje solo produce una planta, muchas veces no se satisfacen las demandas del mercado, lo que limita la producción en masa del cultivo de la higuera (Rojas *et al.*, 2004).

2.10 Propagación por Cultivo de Tejidos vegetales

La capacidad de las células vegetales para regenerar una planta entera que sea idéntica a la original (totipotencia) es la base para el desarrollo de las diversas vías del cultivo de tejidos (Gomora, 2014).

Un explante o parte separada de la planta, como protoplastos, células, tejidos u órganos, que se cultivan asépticamente en un medio sintético con una composición química específica y se incuban bajo condiciones ambientales controladas es lo que significa cultivo de tejidos vegetales donde se aplican un conjunto de técnicas complejas (Kumar y Loh 2012). Dentro del cultivo de tejidos se encuentra la

micropropagación *in vitro*, la cual es el conjunto de procedimientos para la producción masiva, rápida, eficaz y libres de enfermedades de plantas asexuales (George *et al.*, 2008; Ramos-Amaya, 2012).

Según Salazar (2010) la micropropagación *in vitro* muestra ventajas como:

- ✓ Producción a gran escala y rápida de la propagación vegetativa.
- ✓ Menos tiempo y espacio para la multiplicación de material vegetal.
- ✓ Similitud del material obtenido.
- ✓ Propagación de especies recalcitrantes a las tecnologías convencionales.
- ✓ Más control sobre la salud del material propagado.
- ✓ La rápida introducción de nuevos cultivares.
- ✓ Ambientes seguros para la preservación de germoplasma.
- ✓ Facilidad para el intercambio internacional de material vegetal.

2.11 Propagación de la Higuera por Cultivo de Tejidos

Con el objetivo de poder rebajar y optimizar costos en la producción de plántulas de interés agronómico, las nuevas técnicas de cultivo *in vitro* son objeto de numerosos estudios en el mundo. La higuera (*Ficus carica* L.) ha sido regenerada *in vitro* por medio de microestacas de 3 a 4 cm con dos nudos como máximo para disminuir la variación somaclonal del material y con el uso de meristemas como explante se logra un saneamiento vegetal (Mitrofanova *et al.*, 2016; Mendoza 2019). La micropropagación de la higuera está encaminada a la propagación masiva de un gran número de vitroplantas para el establecimiento de plantaciones de interés comercial y lograr la

erradicación del Virus del Mosaico de la Higuera (FMV) (Pereira *et al.*, 2017). Sin embargo, en comparación con otras especies de frutales, *Ficus carica* tiene menos estudios de micropropagación que puede ser principalmente como resultado de la reciente introducción del cultivo (Aradillas, 2015).

2.11.1 Explante

La fuente de los explantes debe elegirse con cuidado ya que el tipo de explante que se va a utilizar determinará el nivel de éxito de la micropropagación. Se puede utilizar diferentes tipos de explantes para iniciar la propagación *in vitro*, su selección dependerá del nivel de diferenciación del tejido y su tamaño obedecerá al propósito que tenga la micropropagación (Palú, 2011). Los explantes deben tomarse de plantas en crecimiento activo que no hayan experimentado ningún tipo de estrés, como sequía, temperaturas excesivamente bajas o altas, deficiencia de minerales y ataque de plagas o enfermedades (Teixeira *et al.*, 2001). En la micropropagación de la higuera se han utilizados diferentes tipos de explantes como los meristemas para el saneamiento de enfermedades, las hojas para la producción de callos y embriones somáticos, yemas axilares y apicales y los más utilizados son las microestacas para lograr una mayor estabilidad genética (Fraguas *et al.*, 2004; Ferreira, 2006; Aradillas, 2015).

2.11.2 Asepsia de los Explantes

Las bacterias, levaduras y hongos (microorganismos) pueden prosperar en el entorno de incubación del cultivo *in vitro*, estos constituyen un serio problema en el desarrollo del cultivo ya que pueden llegar a dañar o matar al explante (Cassells, 2012). Para establecer un cultivo aséptico se deben realizar prácticas como son: trabajar en sitios

apropiados, esterilizar el medio de cultivo y efectuar una desinfección previa a los explantes a utilizar, con el objetivo de lograr la eliminación de bacterias y hongos exógenos. Si el proceso inicial de desinfección de los explantes falla y los microorganismos no son detectados, estos pueden sobrevivir como una contaminación no observada y solo aparecen cuando las condiciones son propicias para su expresión (Ruiz *et al.*, 2016). Para realizar la desinfección del material vegetal se utilizan numerosos compuestos químicos como son el etanol etílico al 70 %, el hipoclorito de sodio (NaClO), así como también manejar el hipoclorito de calcio Ca (ClO)₂ y el cloruro de mercurio HgCl₂, aunque este compuesto se utiliza en menos frecuencia por ser tóxico y retirarlo del explante suele ser dificultoso. En muchos casos también se utiliza el Tween-20 como agente tensoactivo ya que aumenta la eficacia del agente blanqueador (Smith, 2013; Ibarra-López, 2015).

Por su parte Flores-Mora *et al.* (2009) realizaron la limpieza de las estacas de *Ficus carica* con abundante agua y jabón comercial, utilizando 6 g L⁻¹ Benlate, 6 g L⁻¹ de Agri-mycin y 3.5 g L⁻¹ de Ferbán como bactericidas y fungicidas por un tiempo de 75 minutos y continuando con una desinfección de NaClO al 3.5 %. Mientras que Aradillas (2015) trato los ápices de higuera cultivar Netzahualcóyolt con 2 g L⁻¹ de fungicidas y bactericidas comerciales Captan[®], Promyl[®] y Agri-gent Plus 806[®] durante 15 minutos, luego fueron sumergidos en etanol al 70% y blanqueador comercial al 20 % obteniendo una buena desinfección del material. También Palú *et al.* (2011), utilizaron alcohol etílico al 70% e hipoclorito de sodio al 2.5% y añadió al medio 250 mg L⁻¹ de antibiótico (ampicilina) obteniendo buenos resultados.

2.11.3 Medio de Cultivo

El medio de cultivo más conveniente y eficaz para el cultivo *in vitro* de la higuera depende del tipo de explante a utilizar, así como el cultivar empleado y la fase del cultivo: establecimiento, multiplicación y enraizamiento. El medio MS (Murashige y Skoog, 1962) es el más utilizado en el cultivo *in vitro* de la higuera (Aradillas, 2015; Mitrofanova *et al.*, 2016; Juárez, 2019; Mendoza, 2019), pero también se está utilizando el medio WPM (Woody Plant Medium) (Lloyd y McCown, 1980).

El cultivo de tejidos emplea ampliamente el medio de cultivo de MS, ya que sus concentraciones de sales son responsables de aumentos significativos en los tejidos y crecimiento celular. El WPM es el segundo medio más usado para el desarrollo de la técnica *in vitro* (Lloyd y McCown, 1980). Fue desarrollado para cultivar brotes de plantas leñosas y ha encontrado un amplio uso en la propagación de arbustos y árboles. Contiene $\frac{1}{4}$ de las concentraciones de NO_3^- y NH_4^+ del medio MS, además de tener más potasio y un alto nivel de iones sulfato (Ferreira, 2006; Pasqual y Ferreira 2007).

Brum (2001) probó varios medios de cultivo para la micropropagación del cultivar de higuera Roxo de Valinhos, incluidos el MS, el Knudson (1946), el WPM, el White (1932) y el B5 (Gamborg *et al.*, 1968). Los resultados indicaron un elevado número de brotes y un excelente crecimiento de raíces y partes aéreas para el medio WPM complementado con 20 g de sacarosa, por lo que se considera recomendable para la micropropagación de la higuera. Por su parte Flores-Mora *et al.* (2009), en su trabajo utilizan el medio MS a la mitad de sus sales minerales.

El uso de reguladores de crecimiento vegetal (RCV) es un importante elemento para el cultivo de tejidos vegetales. De estos, los más utilizados son las auxinas y las citoquininas, que inducen el crecimiento de la parte aérea y formación de brotes

(Fraguas *et al.*, 2004). Sin embargo, no siempre es favorable utilizar reguladores de crecimiento después del aislamiento del explante de la planta madre, ya que se pueden estimular respuestas no deseadas como la formación de callos y accidentalmente intoxicar los tejidos (Zigiotta, 2007). En la fase de establecimiento, que puede durar de una a dos semanas, se detecta la contaminación y se puede observar el comportamiento que desarrollan los explantes y así seleccionar aquellos explantes que resisten mejor la desinfección o que son más vigorosos (Ferreira, 2006). No obstante la utilización de RCV en el establecimiento es viable. Entre los reguladores de crecimiento utilizados en la fase de multiplicación, se destacan las citoquininas, (Taiz y Zeiger, 2009). Según Zigiotta (2007) las citoquininas son indispensables para que ocurra la ruptura de la dominancia apical y después la inducción y proliferación de yemas axilares. El tipo de citoquinina y su concentración son los componentes que más intervienen en el éxito de la multiplicación *in vitro*.

Dentro del grupo de las citoquininas encontramos a la 6-bencilaminopurina (BAP) la cual ha sido muy efectiva para promover la multiplicación en varias especies y parece ser la citoquinina por excelencia para la multiplicación de segmentos aéreos e inducción de yemas adventicias, además de tener un bajo costo. La razón de la mayor eficiencia del BAP, seguida en orden descendente por la kinetina (KIN) y la 2-isopenteniladenina (2iP), puede radicar en la capacidad de los tejidos vegetales para metabolizar las hormonas naturales más rápidamente que los reguladores sintéticos (Palú, 2011).

Las auxinas es otro de los grupos utilizados en el cultivo de tejidos vegetales, como el ácido indolacético (AIA), ácido 1-naftalenoacético (ANA) y ácido indol-3-butírico (AIB), donde las concentraciones utilizadas son frecuentemente bajas en comparación con

las citoquininas, para mantener un balance auxina/citoquinina inferior a 1. Concentraciones excesivas de auxina pueden inhibir la multiplicación o favorecer excesivamente el enraizamiento o la formación de callos (Garay *et al.*, 2014). El ANA y AIB suelen adicionarse en concentraciones por debajo de 0.5 mg L^{-1} , mientras que el AIA al ser menos estable en cultivo, se puede adicionar en concentraciones mayores (Hartmann *et al.*, 2002). El uso de 2,4 D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético), que también es una auxina, se evita, ya que promueve la formación de callosidades y también puede causar variación genética en cultivos de células o tejidos (George, 2008).

2.11.4 Multiplicación *in vitro*

La fase de multiplicación tiene como principal objetivo producir una alta densidad de plantas en el menor tiempo posible. Lo importante en la fase es obtener una tasa satisfactoria de plantas, con una variación mínima de los explantes. También es importante la calidad y homogeneidad de las partes aéreas producidas, ya que de ellas dependerá el éxito en la siguiente fase de enraizamiento (Almeida *et al.*, 2002). Para favorecer la división y diferenciación celular durante esta etapa se debe aplicar el control adecuado de los reguladores de crecimiento (Olmos *et al.*, 2010).

Pasqual y Ferreira (2007), obtuvieron brotes largos del cultivar Kalamon después de ocho semanas en medio con 0.5 mg L^{-1} de BAP. Para la multiplicación del cultivar Roxo de Valinhos, Brum (2001) utilizó el medio de cultivo WPM suplementado con 0.5 mg L^{-1} de BAP o 0.5 mg L^{-1} de kinetina obteniendo un gran número de brotes. Para la proliferación *in vitro* de cultivares Brown Turkey y Smyrna y su posterior uso en transformación genética, Yancheva *et al.* (2005), utilizaron medio MS suplementado con 0.25 mg L^{-1} de BAP, 0.05 mg L^{-1} de AIB y 0.05 mg L^{-1} de AG₃. Por su parte

Aradillas (2015), obtuvo una alta tasa de regeneración de brotes en el medio MS suplementado con 1 mg L⁻¹ de tiamina, 4% de sacarosa, 2 mg L⁻¹ de tidiazurón (TDZ) y 2 mg L⁻¹ de AIB.

La tasa de proliferación o multiplicación de brotes dependerá de la concentración de citoquininas aplicada (George, 2008). Generalmente, altas concentraciones inducen muchos brotes, pero pueden afectar su calidad, produciendo brotes pequeños e incapaces de alargarse, dificultando la separación (Hartmann *et al.*, 2002). Los brotes producidos aún pueden tener dificultades para enraizar, mayor susceptibilidad a la hiperhidricidad y se pueden inducir brotes adventicios. Sin embargo, bajas concentraciones de las citoquininas solo pueden estimular el crecimiento de brotes axilares o laterales (Hartmann *et al.*, 2002; George, 2008).

Según Günver y Ertan (1997), en ensayos realizados con el cultivar Bursa Siyahi donde se cultivaron meristemas tomados de plantas adultas en medio MS que contenía 1 mg L⁻¹ de BAP y 1 mg L⁻¹ de ANA, no hubo desarrollo de brotes. Por su parte, Kumar *et al.* (1998), verificaron la inducción múltiple de brotes y plántulas mediante el desarrollo de yemas apicales recolectadas de plantas adultas del cultivar Gula, utilizando medio MS suplementado con 2 mg L⁻¹ de BAP y 0.2 mg L⁻¹ de ANA.

Otra clase de reguladores del crecimiento, las giberelinas, se utilizan generalmente para inducir el alargamiento de los brotes durante la multiplicación o antes del enraizamiento. El principal representante de esta clase es el ácido giberélico (AG₃), el cual frecuentemente tiene efectos similares a los de las auxinas cuando se agrega al medio de cultivo (Pasqual y Ferreira, 2007).

2.11.5 Oxidación

Cuando se realiza la micropropagación *in vitro* de la higuera, el oscurecimiento del medio de cultivo es muy común y es causado por compuestos fenólicos en su proceso de oxidación (Azofeifa, 2009). Esto se puede reducir con la aplicación de algunas prácticas de prevención, como la remoción o dispersión de estas sustancias a medida que se forman. Un método eficaz de control puede ser el lavado, en el cual los explantes se dejan reposar en agua esterilizada luego de ser aislados de la planta donadora y antes de ser sembrados. Además, se recomienda realizar un enjuague cuidadoso para eliminar las sustancias químicas utilizadas para la desinfección, ya que los vestigios de químicos producen la síntesis de sustancias fenólicas. Pasqual *et al.*; (2007), recomiendan subcultivos frecuentes (1 a 7 días) del explante, cuando el medio de cultivo alrededor del explante se oscurece o se descolora. Es importante resaltar que la oxidación depende de la especie con la que se trabaja y que ningún método es efectivo para todas las especies, por lo que cuando el problema es más severo se recomienda combinar tratamientos.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Localización del Estudio

La presente investigación se llevó a cabo durante el período agosto 2021 a junio 2023 en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos (Fig. 5), que se ubica en el Campus de Ciencias Agropecuarias de la Facultad de Agronomía de la Universidad Autónoma de Nuevo León, en el municipio de Gral. Escobedo, N. L., México.



Figura 5. Laboratorio de Cultivo de Tejidos de la FAUANL.

3.2 Material Vegetal

Se utilizaron varetas de 20-25 cm de longitud, poco lignificadas, provenientes de plantas adultas localizadas en el invernadero Gótico, Brown Turkey (BT) (Fig. 6A) y Español Black Mission (BM) y LSU Tiger (LSU) (Fig. 6B y 6C) del Campus de Ciencias Agropecuarias de la Facultad de Agronomía y plantas jóvenes (vivero) White Kadota (Fig. 6D) de la Unidad Marín, Facultad de Agronomía, UANL, localizado en la carretera Zuazua-Marín km 17.5, Marín, N. L.

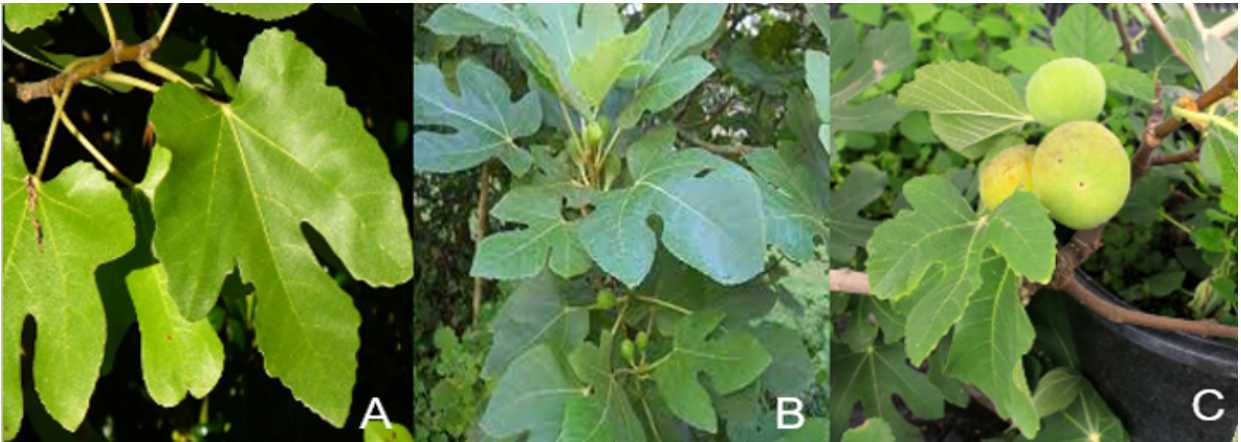


Figura 6. Cultivares donantes de varetas. A) Brown Turkey; B) Black Mission; C) LSU Tiger.

3.3 Preparación del Material

Después de recolectadas las varetas, se retiraron las hojas y peciolo de todo el material recolectado, quedando solo los brotes destinados a la siembra y el material listo para la realización de la pre-desinfección (Fig. 7).

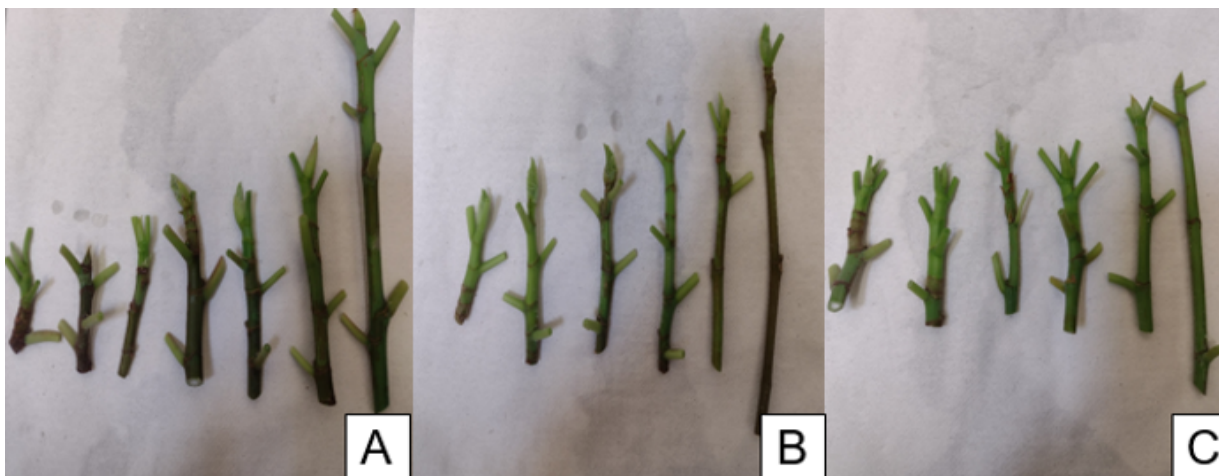


Figura 7. Estacas de higuera empleados para la siembra. A) cv. Black Mission; B) cv. Brown Turkey; C) cv. LSU Tiger.

3.4 Técnica de Pre-desinfección

Las varetas de los cultivares de *Ficus carica* L. fueron lavadas con detergente comercial líquido (Axion®) y blanqueador comercial (Cloralex®) y se enjuagaron con abundante agua potable. Posteriormente, se cortaron en secciones más pequeñas de aproximadamente 4-5 cm de longitud y se colocaron en agitación en una solución de detergente comercial líquido 5 mL L⁻¹, blanqueador comercial 5 mL L⁻¹, bactericida vegetal (Microdyn®) 5 mL L⁻¹ y agua potable, durante tres períodos de cinco minutos cada uno. Después se realizaron enjuagues con agua potable e inmediatamente fueron sumergidos en una solución bactericida-fungicida que contenía 6.0 g L⁻¹ Agry-Gent Plus 800® (sulfato de gentamicina al 2.0 %; clorhidrato de oxitetraciclina al 6.0 %) (Gowan® Mexican), 6.0 g L⁻¹ de Amistar® Gold (Azoxystrobin 18 %) (Syngenta®), 500 mg L⁻¹ de ácido ascórbico, 500 mg L⁻¹ de ácido cítrico y 20 mL L⁻¹ de bactericida vegetal y se mantuvieron en agitación durante 60 min. Concluido el tiempo, los explantes se enjuagaron tres veces con agua bidestilada hasta que se eliminaron los residuos de la

solución y se procedió a llevarlos a la campana de flujo laminar para iniciar el proceso de desinfección, en condiciones asépticas. (Fig.8 A, B, C)

3.5 Técnica de Desinfección

Una vez finalizada la fase de pre-desinfección el material fue llevado a la campana de flujo laminar para operar en condiciones asépticas. Los explantes fueron sumergidos en alcohol etílico al 70 % durante 30 s (Fig. 8C), seguidamente se sumergieron en dos soluciones a base de hipoclorito de sodio (NaClO) (Cloralex 5.0 %) más 0.2 % de Tween-20 (Fig. 8D), en dos períodos de tiempo en agitación continua (Cuadro 1). Culminado el período, los explantes fueron enjuagados tres veces con agua bidestilada esterilizada y se procedió a la siembra de estos (Fig. 8E, D). Los explantes sembrados fueron segmentos nodales con yemas axilares o apicales (microestacas).

Cuadro 1. Tratamientos de desinfección de los explantes de higuera (*Ficus carica* L.).

Tratamiento	Desinfectante	Exposición (min)
T1	Solución de hipoclorito de sodio al 20 %	30
T2	Solución de hipoclorito de sodio al 30 %	20

3.6 Establecimiento *in vitro* de Microestacas

Las microestacas se sembraron en condiciones asépticas en el medio de cultivo que estuvo compuesto por las sales basales del medio MS (Murashige y Skoog, 1962) al 50%, y adicionado con 50 mg L⁻¹ de myo-inositol, 15 g L⁻¹ de sacarosa y solidificado

con 4.4 g L^{-1} de Phytigel™. Con el uso de KOH o HCl 1.0 N el pH del medio de cultivo se ajustó a 5.7 ± 0.02 . El medio de cultivo se esterilizó a una presión de 1.2 kg cm^{-2} a $121 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 15 min. Después de la esterilización del medio y con una temperatura de $\sim 30 \text{ }^\circ\text{C}$, se le adicionaron los antibióticos Gentamicina y Ceftriaxona 1 mL L^{-1} , para luego dispensarlo en cajas dentro de la cámara de flujo laminar. Las microestacas se mantuvieron durante dos semanas en condiciones controladas de fotoperíodo de 16 h luz y 8 h de oscuridad y una temperatura de $24 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$. Transcurrido este período los explantes se subcultivaron a un medio con la misma composición, pero sin el antibiótico, por un período de cuatro semanas, bajo condiciones similares de incubación.

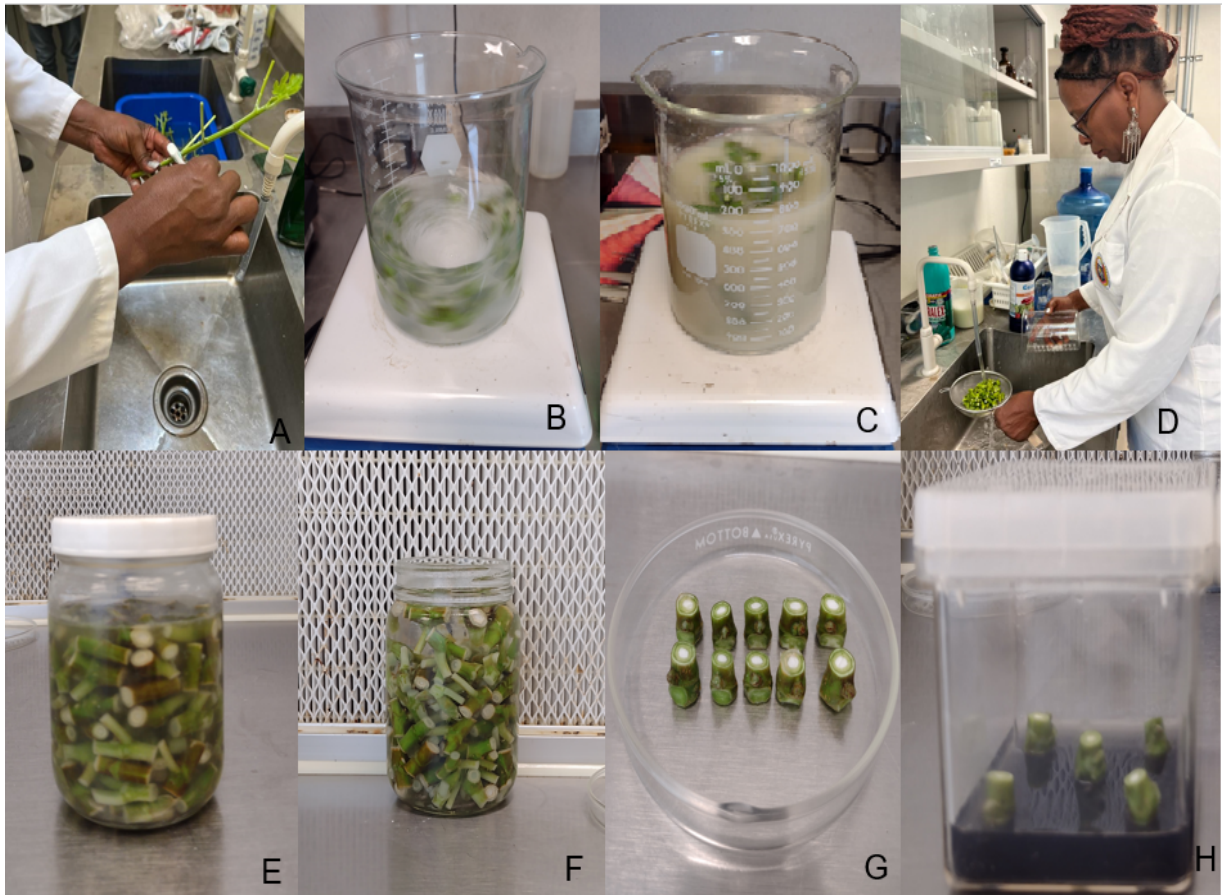


Figura 8. Metodología para el establecimiento de microestacas de higuera. A) Lavado y cepillado manual de las estacas con jabón y agua potables; B) Lavados con jabón líquido y agua potable en agitación; C) Solución fungicida-bactericida, D) Enjuague del material; E) Inmersión en alcohol etílico al 70 %; F) Tratamiento en campana con NaClO más Tween-20, G) Microestacas para la siembra, H) Explantes sembrados en el medio de cultivo.

3.6.1 Aislamiento de Microorganismos

En los explantes de higuera se realizó un aislamiento de colonias bacterianas en la etapa de establecimiento, las cuales tenían una consistencia lechosa y de color blanco alrededor de las microestacas (Fig.9). Se realizaron aislamientos en placas Petri con

medio Agar Infusión Cerebro Corazón (Agar ICC) (Fig.10A), para lograr la activación del microorganismo. Las placas se incubaron a diferentes temperaturas de 24 °C y 37 °C durante 24 horas para permitir su crecimiento. las características de las colonias se observaron en el microscopio y se realizaron preparaciones frescas y teñidas para poder examinar los caracteres morfológicos (forma, motilidad, agrupación y respuesta a la tinción de Gram) (Fig.10B).

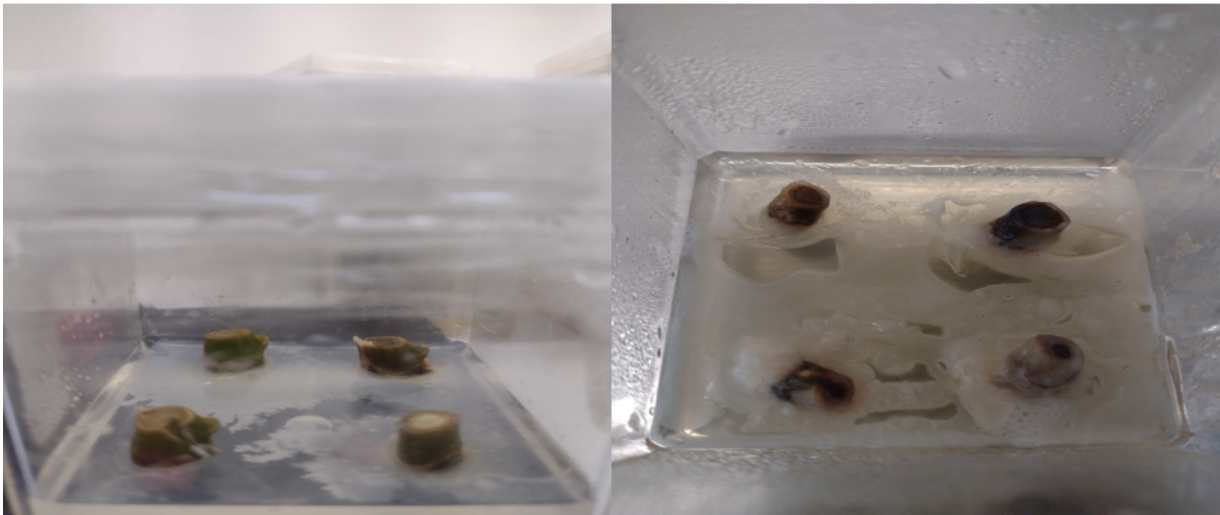


Figura 9. Material vegetal utilizado para el aislamiento de los microorganismos.

En los aislamientos realizados se les practicó un antibiograma mediante el método de Kirby-Bauer con discos de doce antibióticos: Cefotaxima (CFX), Ceftriaxona (CTX), Cloranfenicol (Cl), Nitrofurantoina (Nf), Amikacina (AK), Gentamicina (GE), Netilmicina (NET), Ampicilina (AM), Cefalotina (CF), Dicloxacilina (DC), Penicilina (PE) y Sulfametoxazol/Trimetoprima (STX) para determinar la sensibilidad de la bacteria y así lograr disponer de un antibiótico para agregar al medio (Fig. 10C).

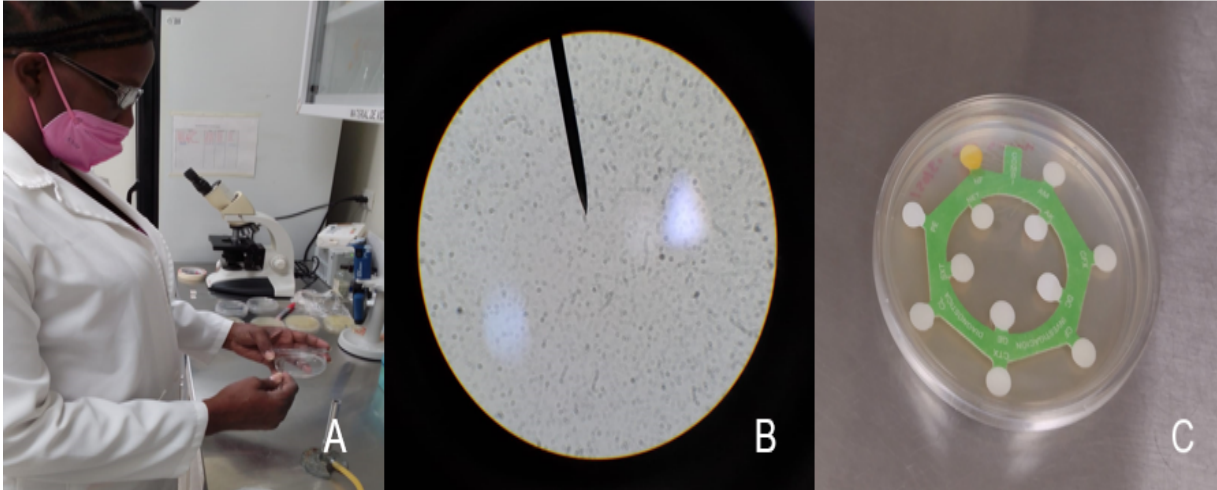


Figura 10. Procedimiento para la identificación de la bacteria. A) Siembra de la bacteria; B) Vista desde el microscopio; C) Montaje de los discos de antibióticos.

3.6.2 Efecto de Antibióticos

Los dos antibióticos elegidos previamente (Ceftriaxona y Gentamicina) se emplearon por separado para evaluar la efectividad de los antibióticos contra los contaminantes bacterianos. Al medio de cultivo se le adicionó una concentración de 1.0 mL L^{-1} de cada uno sirviendo de control el medio de cultivo desprovisto de antibiótico. Los recipientes se colocaron dentro de la cámara de incubación en donde las microestacas permanecieron por un período de dos semanas en condiciones controladas de fotoperíodo de 16 h luz y 8 de oscuridad y una temperatura de $24 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$.

Se tuvo en cuenta tanto la cantidad de explantes con necrosis, así como aquellos contaminados con bacterias. Se eligió el antibiótico y la concentración que no produjo necrosis en los explantes y donde se obtuvo el menor porcentaje de contaminación. Luego, se continuó la propagación de las plantas en un medio de cultivo desprovisto de antibiótico para continuar con la etapa de multiplicación.

3.7 Multiplicación *in vitro* de Brotes

Después de dos semanas de establecimiento, los brotes viables fueron trasladados a una etapa de multiplicación, los cuales se subcultivaron en el medio de cultivo MS al 50 % de sus componentes y adicionado con 15 g L⁻¹ de sacarosa, 50 mg L⁻¹ de myo-inositol y con tres dosis de BAP como se refleja en el Cuadro 2 y solidificado con 4.4 g L⁻¹ de Phytigel™, el pH del medio de cultivo se ajustó a 5.7 ± 0.02, y se colocaron bajo las mismas condiciones controladas que se emplearon en el establecimiento *in vitro*, con fotoperíodo de 16 h luz y 8 de oscuridad y una temperatura de 24 ± 2 °C.

Cuadro 2. Concentraciones de BAP utilizadas en la etapa de multiplicación de higuera (*Ficus carica* L.).

Tratamientos	BAP (mg L ⁻¹)
T1	0.00
T2	0.25
T3	0.50
T4	0.70

3.8 Diseño Experimental

En la etapa de establecimiento *in vitro* de microestacas de higuera, se utilizó un diseño completamente al azar considerando dos tratamientos de desinfección (Cuadro 1) con siete repeticiones. Después de dos semanas se evaluó el porcentaje de contaminación y viabilidad de los explantes y posteriormente a las seis semanas del establecimiento se evaluó el porcentaje de supervivencia.

Para la multiplicación de brotes, el experimento se estableció en un diseño completamente al azar con arreglo factorial 3x3 y un grupo control, siendo el factor A los cultivares de higuera y el factor B, las concentraciones de BAP, brindando un total de nueve tratamientos cada uno con tres repeticiones y un testigo. Después de cuatro semanas del subcultivo las variables medidas fueron la longitud y número de brotes, así como el número de hojas.

La unidad experimental para ambas etapas, fue una caja Magenta de 7 x 9 cm. En el establecimiento *in vitro* se colocaron cinco microestacas por unidad experimental, frente a dos microestacas por repetición en la multiplicación.

Los resultados del establecimiento *in vitro* se evaluaron mediante un análisis de varianza de un factor y los efectos principales en la multiplicación se evaluaron mediante un modelo lineal multivariante. Los datos se analizaron con el software estadístico Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) versión 23, la comparación de medias se realizó mediante la prueba de Tukey con $p \leq 0.05$.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Establecimiento Aséptico

4.1.1 Desinfección

El óptimo desarrollo de los explantes establecidos bajo el cultivo *in vitro*, depende de la presencia o ausencia de contaminantes que pueden ser externos o internos al explante, siendo necesario el uso de técnicas de desinfección que permitan eliminar los microorganismos asociados al explante (Suárez *et al.*, 2006).

El origen y manejo del explante son factores que inciden en la tasa de contaminación descubierta en el establecimiento de cultivo, ya que bacterias y hongos son las principales fuentes de contaminación en condiciones *in vitro* (Ramírez *et al.*, 2012). Los explantes obtenidos directamente del campo con frecuencia suelen estar más contaminados con organismos epifitos y endófitos, por lo que requieren de fuertes desinfectantes a concentraciones altas y de prolongados tiempos a la exposición. Por lo tanto, el uso de plántulas establecidas bajo condiciones de ambientes controlados, permiten la utilización de bajas concentraciones de desinfectantes y un breve período de exposición (Levitus *et al.*, 2004).

En este estudio se utilizaron soluciones de hipoclorito de sodio al 20 y 30 % para la desinfección, junto con alcohol etílico al 70 % durante 30 s. Transcurridas dos semanas se evaluó la viabilidad y los niveles de contaminación de los explantes. Dependiendo de los tratamientos no se presentaron variaciones significativas en el porcentaje de

contaminación y viabilidad (Cuadro 3). Los diferentes tratamientos utilizados mostraron pocas diferencias en la contaminación, pero al observar el porcentaje de contaminación se observa una disminución al aumentar la concentración de NaClO, pero los explantes en cambio, demostraron menor viabilidad y signos de oxidación. Sin embargo, la concentración de estos químicos y los tiempos de exposición utilizados, son factores cruciales para establecer explantes libres de microorganismos sin signos de clorosis o necrosis, tal como lo reportan Salas *et al.* (2004), en el cultivo de mora (*Morus alba* L.). El uso de alcohol etílico y blanqueador comercial al 20 % provocó una buena desinfección en explantes de higuera según investigaciones de Aradillas (2015) y según Palú *et al.* (2011), los brotes apicales se comportaron mejor cuando se sumergieron en una solución que contenía 70 % de alcohol etílico, 25 % de blanqueador comercial y 250 mg L⁻¹ de ampicilina sódica. El etanol y el hipoclorito de sodio son uno de los métodos de desinfección que proporcionan bajos porcentajes de contaminación en los explantes inoculados en el establecimiento del cultivo *in vitro* (Aradillas, 2015).

Cuadro 3. Porcentaje de contaminación y viabilidad de microestacas de higuera, después de dos semanas del establecimiento.

Tratamiento	% NaClO	% Contaminación	% Viabilidad
T1	20	52.2 a	34.5 a
T2	30	46.8 a	25.6 a

Medias con letras iguales no son estadísticamente diferentes (Turkey sig. $p \leq 0.05$).

4.1.2 Aislamiento de Microorganismos

En las primeras pruebas realizadas en el establecimiento de las microestacas de higuera se observó la aparición de una bacteria la cual se mostraba normalmente a los seis días de inoculado el material, por lo que el porcentaje de contaminación por bacterias fue de un 100 %, no así la fúngica que solo apareció en un 10 %. Se determinó realizar estudios microbiológicos después de observar el crecimiento del microorganismo en las placas a diferentes temperaturas (Fig. 11A, B), con el objetivo de identificar la bacteria o bacterias que afectaban el establecimiento de los explantes. A partir de la ejecución de la Tinción de Gram fue posible la identificación morfológica de un *Bacillus* gramnegativo. Según Alvarado (2016), esta bacteria es endófito de la higuera y no parece causar síntomas notorios, ni enfermedad en las plantas. Debido a que fomentan el crecimiento y ayudan a las plantas a sobrellevar el estrés, las bacterias endófitas les resultan ventajosas (Zinniel *et al.*, 2002; Rosenblueth y Martínez, 2006; Munif *et al.*, 2012; Nair y Padmavathy, 2014). Para manejar adecuadamente la contaminación en los próximos establecimientos se realizó el antibiograma, en cual la bacteria resultó sensible a la mayoría de los antibióticos en estudio (Fig.11C; Cuadro 4). Los resultados fueron excelentes ya que de un total de 12 antibióticos en estudio, solo cinco mostraron resistencia a la bacteria. Algunos antibióticos como gentamicina en caña de azúcar (Niubó *et al.*, 2004) y la cefotaxima en *Agave fourcroydes* (Abreu *et al.*, 2016), se han utilizado para desinfectar en cultivos de tejidos. Comprender el comportamiento de las bacterias endógenas presente en el establecimiento y su reacción a los antibióticos nos permitió realizar un saneamiento para continuar con el establecimiento de explantes libres de contaminación de la higuera.

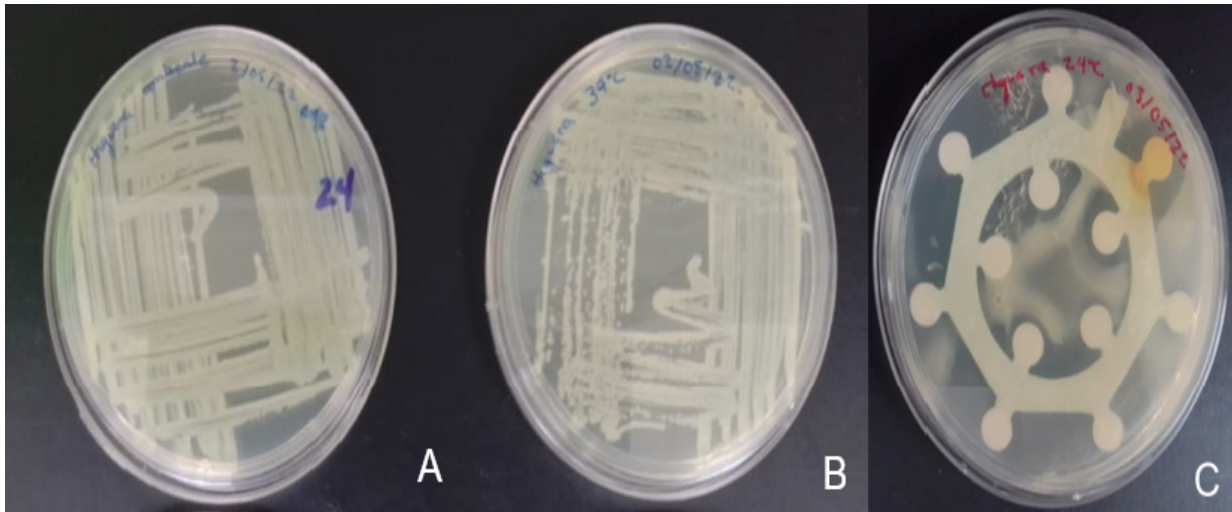


Figura 11. Crecimiento e inhibición del microorganismo. A) Crecimiento bacteriano a 24 °C; B) Crecimiento bacteriano a 37 °C; C) Inhibición del crecimiento de la bacteria.

Cuadro 4. Halos de inhibición mediante antibiograma a diferentes temperaturas.

Antibiótico	Temperatura	Halo (cm)
CFX	37 °C	2.5
	24 °C	2.8
CTX	37 °C	2.2
	24 °C	2.8
CL	37 °C	2.5
	24 °C	2.3
NF	37 °C	1.8
	24 °C	1.7
AK	37 °C	2.0
	24 °C	1.2
GE	37 °C	2.0
	24 °C	1.2
NET	37 °C	2.0
	24 °C	1.2

CFX: Cefotaxima, CTX: Ceftriaxona, Cl: Cloranfenicol, Nf: Nitrofurantoina, AK: Amikacina, GE: Gentamicina, NET: Netilmicina.

4.1.3 Efecto de los Antibióticos

Los antibióticos ensayados inhibieron el crecimiento *in vitro* de los contaminantes aislados. A partir de los resultados de inhibición en los aislados Gram negativos, se seleccionaron dos antibióticos Ceftriaxona y Gentamicina los cuales presentaron los mayores halos de inhibición.

Con la cantidad utilizada 1 mL L⁻¹ para ambos antibióticos, el mayor número de explantes contaminados y necrosados se obtuvieron con la Gentamicina, cuyos explantes no sobrevivieron (Fig.12A), a diferencia de la Ceftriaxona (Fig.12B) con la cual todos los explantes presentaron un 90% de supervivencia (Cuadro 5). Según Flores-Cortéz (2001) los antibióticos aminoglicósidos (estreptomina, neomicina, gentamicina, vancomicina, etc.) son bactericidas de amplio espectro para el control de bacterias grampositivas y gramnegativas, pero a pesar de ser efectivos pueden causar diversos grados de toxicidad y llegar a provocar la muerte del explante.

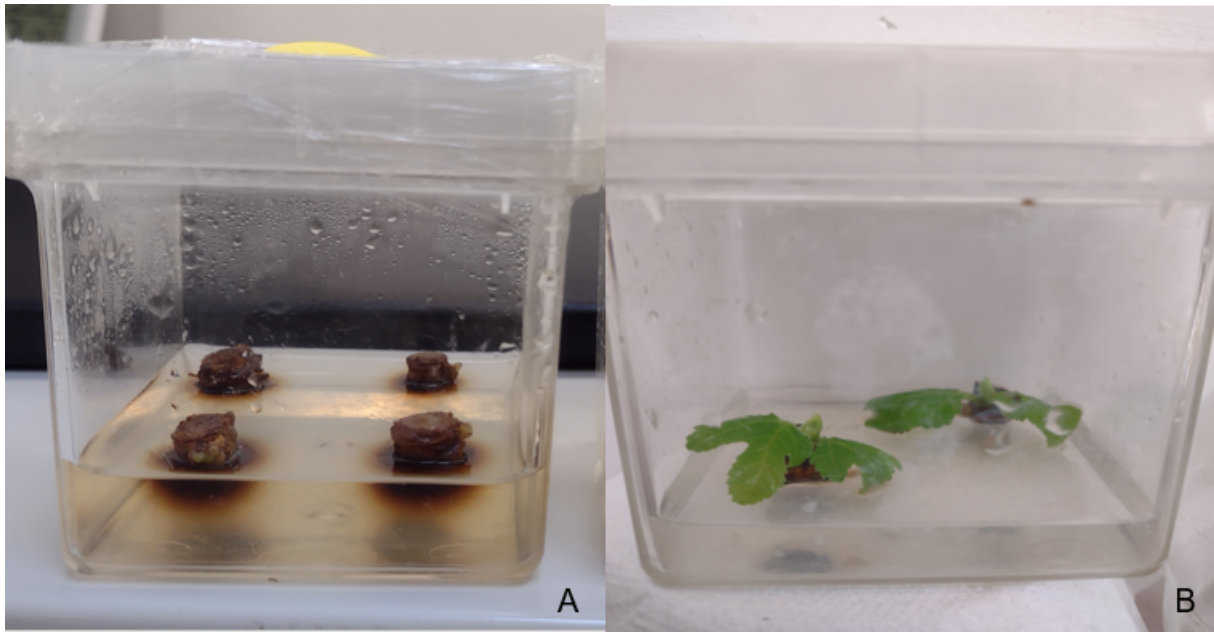


Figura 12. Comportamiento de los explantes en los medios con antibióticos. A) Explantes necrosados con Gerntamicina; B) Explantes viables en medio con Ceftriaxona.

Cuadro 5. Porcentaje de contaminación y necrosis en microestacas de higuera por antibiótico, después de dos semanas del establecimiento.

Antibióticos	% Contaminados	% Necróticos
Gentamicina	100	85
Ceftriaxona	0	10

Varios autores han informado que el uso de ceftriaxona en el cultivo *in vitro* de plantas reduce la contaminación bacteriana y los efectos fitotóxicos producidos son menores que otros antibióticos (Danilova y Dolgikh, 2004; Grewal *et al.*, 2006; Asif *et al.*, 2013; Sabale *et al.*, 2015).

Otros autores han indicado que se requirieron dosis de 0.5 a 0.8 mL L⁻¹ de sulfato de gentamicina para la descontaminación en *Eucalyptus citriodora* cultivadas en medio sólido (Garcia *et al.*, 1998), las cuales son dosis más bajas a las utilizadas en esta investigación, por lo que inferimos que la dosis fue alta y provocó los efectos que se observaron durante el establecimiento.

Coincidiendo con los resultados de este trabajo, Barreto y Zimmermann (2006) informaron que la adición de cefotaxima ayudó en el control de contaminación bacteriana persistente en yuca (*Manihot esculenta*) cultivadas *in vitro* sin afectar el crecimiento y coloración de yemas axilares. Por su parte, Sabale *et al.* (2015) lograron controlar de manera efectiva la contaminación bacteriana en la micropropagación de banano cv. Grande naine (Musa AAA) al agregar 1 mL L⁻¹ de cefotaxima al medio de cultivo sin provocar fitotoxicidad a los explantes.

4.1.4 Establecimiento *in vitro*

El medio MS adicionado con antibiótico y BAP fue utilizado para ver la respuesta de los explantes. Con este medio se obtuvo un alto porcentaje de supervivencia con la adición de antibiótico al medio (Cuadro 6), ya que por las características del producto utilizado se puede controlar la contaminación microbiana en el cultivo de tejidos sin afectar al explante.

Estos resultados están en correlación con los informados por otros autores que refieren un efecto estimulante del antibiótico como la cefotaxima en el cultivo *in vitro* de plantas (Mittal *et al.*, 2009; Asif *et al.*, 2013). En este sentido, Danilova y Dolgikh (2004)

comprobaron que la adición de antibióticos en el medio de cultivo estimulaba la regeneración de plantas de *Zea mays* L.

Los cultivares de higos utilizados en la fase de establecimiento tuvieron una supervivencia superior al 80 % al final de la etapa. Estos fueron los explantes utilizados en la fase de multiplicación.

Cuadro 6. Porcentaje de supervivencia de microestacas de los cultivares de higuera, después de seis semanas del establecimiento.

Cultivares	% de Supervivencia
LSU	90 a
BM	87 a
BT	85 a

Medias con letras iguales no son estadísticamente diferentes (Tukey sig. $p \leq 0.05$).

4.2 Multiplicación *in vitro*

Los explantes obtenidos durante la etapa de establecimiento de los cultivares LSU, BT y BM, (Fig. 13) fueron transferidos a los medios de multiplicación que contenían diferentes concentraciones de BAP a (0, 0.25, 0.50 y 0.75 mg L⁻¹). Al realizar el análisis de varianza de los datos obtenidos sobre el número y longitud de los brotes, así como el número de hojas en todos los tratamientos utilizados durante 30 días, no reveló diferencias significativas entre las distintas dosis empleadas.

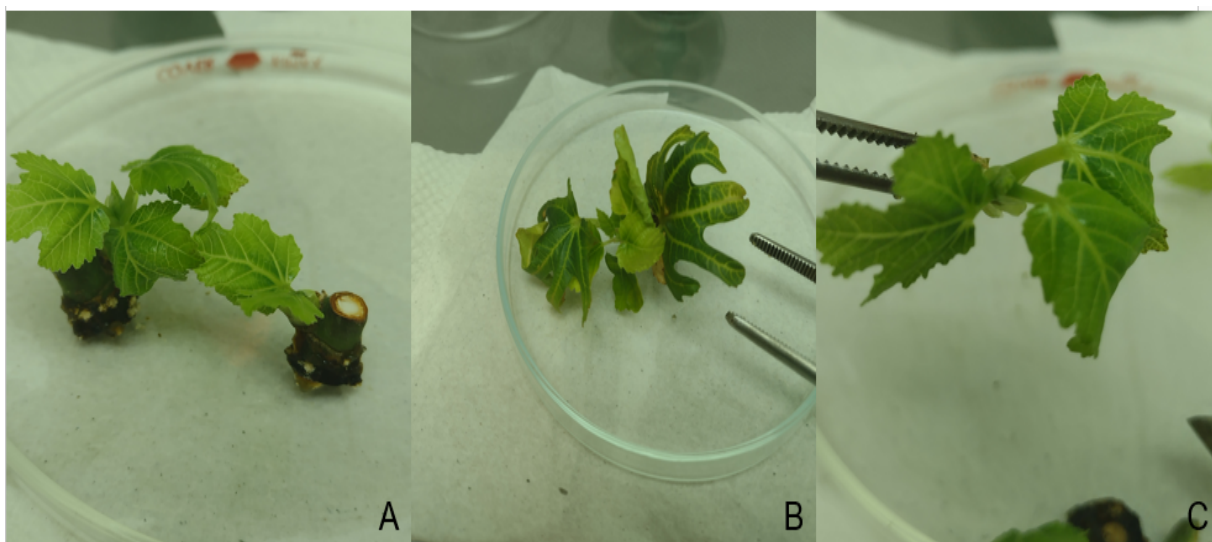


Figura 13. Explantes obtenidos en la fase de establecimiento para la multiplicación. A) Black Mission; B) LSU Tiger; C) Brown Turkey.

Sin embargo, al comparar los resultados independientes, se aprecian diferencias entre los cultivares en función a las variables que se consideraron en el ensayo. En cuanto a la cantidad de brotes, la longitud del brote y el número de hojas, el cultivar LSU exhibió los valores más altos de proliferación, seguido de la BT y BM (Cuadro 7), sin embargo, las diferencias no fueron significativas. Por otro lado, se pudo observar que, en el medio de multiplicación, las variables número de brotes y hojas, fueron mayores cuando no se utiliza BAP, sin embargo, en el medio con (0.25 mg L^{-1}) de la citoquinina, la longitud de los brotes se vió beneficiada (Cuadro 8). Resultados similares han sido reportados por Hepaksoy y Aksoy (2006) y Mustafa y Taha (2012), para la regeneración de vitroplantas de higuera a partir de yemas apicales en medios que contenían 2.5 mg L^{-1} BAP. Frente a esto, Aradillas (2015) reportó que con la aplicación de $2 \mu\text{g L}^{-1}$ de triancantanol, 0.1 mg L^{-1} de BAP y 0.01 mg L^{-1} de ANA se aumentó la tasa de multiplicación a dos brotes por explante, cuatro hojas y 2.3 cm de tamaño en la variedad Netzahualcóyotl, en un total de seis meses con siete subcultivos.

Por otro lado, Corredoira *et al.* (2011), encontraron que el mejor tratamiento para la multiplicación de *Alnus glutinosa* fue de 2 mg L⁻¹ de BAP y 0.5 mg L⁻¹ de AIA, estabilizándose entre 5 y 12 meses. El efecto que tiene el BAP en el crecimiento y desarrollo de las plantas de higo depende de la variedad que se utilice, según Burm *et al.* (2002).

En todos los medios, los brotes estaban bien desarrollados, viables y de coloración homogénea (Fig.14). El BAP ha permitido una eficiente proliferación y estimulación en la formación de múltiples brotes en diferentes especies (Saidi *et al.*, 2007; Singh *et al.*, 2010; Karimpour *et al.*, 2013; Zuraida *et al.*, 2014), sin embargo, en los resultados obtenidos, el efecto de este no fue significativo.

Cuadro 7. Comportamiento de las variables en los cultivares de higuera durante la multiplicación *in vitro*, después de cuatro semanas del subcultivo.

Cultivares	Número de brotes	Longitud de Brotes	Número de hojas
LSU	0.9058 a	1.8492 a	1.1667 a
BT	0.5950 a	1.7583 a	0.5625 a
BM	0.4583 a	1.4100 a	0.6875 a

Medias con letras iguales no son estadísticamente diferentes (Tukey sig. $p \leq 0.05$).

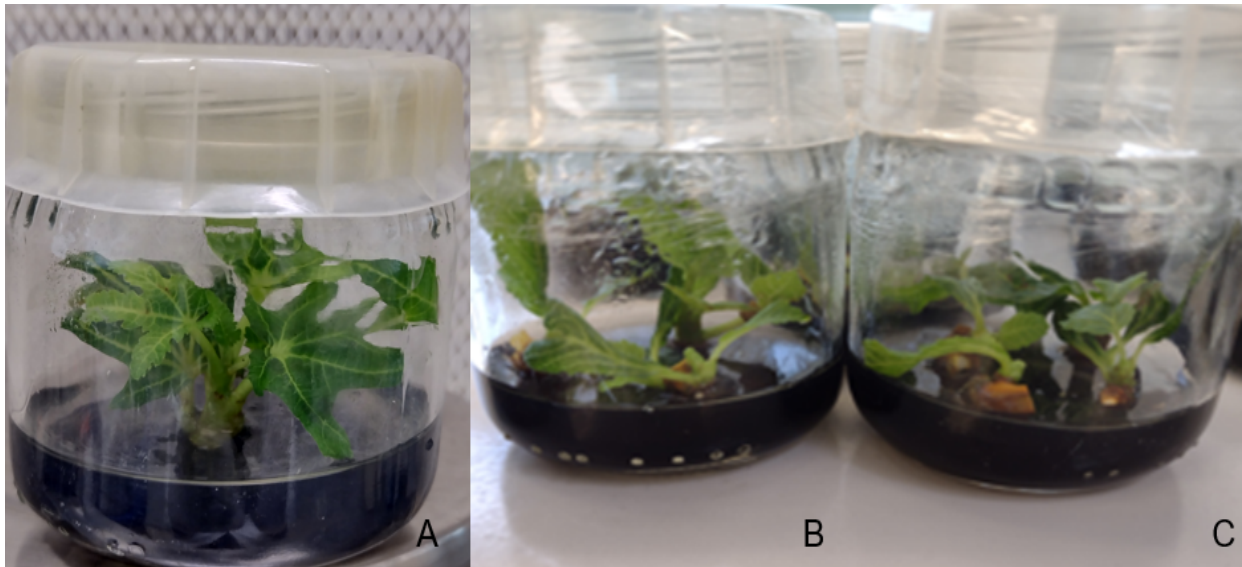


Figura 14. Explantes en medio de multiplicación. A) LSU Tiger; B) Black Mission; C) Brown Turkey.

Cuadro 8. Efecto de las concentraciones BAP en la multiplicación *in vitro* de higuera, después de cuatro semanas del subcultivo.

Tratamientos	Número de brotes	Longitud del brote	Número de hojas
T1(0.00 mL L ⁻¹)	0.9633 a	1.7878 a	0.9078 a
T2(0.25 mL L ⁻¹)	0.5933 a	1.9444 a	0.7500 a
T3 (0.50 mL L ⁻¹)	0.5778 a	1.7989 a	0.8889 a
T4 (0.75 mL L ⁻¹)	0.4778 a	1.1589 a	0.6756 a

Medias con letras iguales no son estadísticamente diferentes (Tukey sig. $p \leq 0.05$).

5. CONCLUSIONES

La regeneración *in vitro* de microestacas de higuera (*Ficus carica* L.), y su posterior uso en la multiplicación de brotes se logró mediante el uso de citoquininas.

En la etapa de establecimiento *in vitro*, las microestacas de higuera presentaron menor contaminación cuando se utilizó NaClO 30% por 20 min. Además, el uso de Ceftriaxona en el establecimiento permitió la reducción de contaminantes bacterianos logrando la supervivencia de los explantes.

El análisis bacteriano del material permitió reconocer los antibióticos adecuados para la disminución y eliminación de contaminantes y su posterior sanidad.

En la multiplicación *in vitro*, los brotes de higuera respondieron homogéneamente a las concentraciones de BAP e independientemente del tipo de cultivar.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Abreu, E., del Castillo, M. S., del Sol, G. A., & González, G. 2016. Efecto de antibióticos en la propagación *in vitro* de *Agave fourcroydes* Lem. Biotecnología vegetal, 16(1). pp. 31-36.
- Aguilera-Ortíz, M., Alanis-Guzmán, M. G., García-Díaz, C. L., Hernández-Brenes, C. M. 2009. Caracterización y estabilidad de antocianinas de higo, variedad Mission. Universidad y Ciencia, 25(2), 151-158.
- Alvarado-Marchena, L., Schmidt-Durán, A., Alvarado-Ulloa, C., Chacón-Cerdas, R., & Flores-Mora, D. 2016. Caracterización molecular de las bacterias endófitas encontradas en los cultivos de higuera (*Ficus carica* var. Brown Turkey) en Costa Rica. Revista de Ciencias Agrícolas y Biológicas, 11 (7), 290-297.
- Anima Soto, J. A. 2019. Evaluación de dos variedades de higuera (*Ficus carica* L.) en vareta, en base a la aplicación de productos orgánicos y condiciones ambientales. pp. 5-9.
- Aradillas Tovar, L. Á. 2015. Micropropagación de higuera (*Ficus carica* L. cv Netzahualcóyotl) a partir de yemas en condiciones de inmersión temporal (Tesis de Maestría). 86 p.
- Asif M., Eudes F., Randhawa H., Amundsen E., Yanke J., Spaner D. 2013. Cefotaxime prevents microbial contamination and improves microspore embryogenesis in

wheat and triticale. Plant Cell Rep
32(10):1637-1646.

Azofeifa, Á. 2009. Problemas de oxidación y oscurecimiento de explantes cultivados *in vitro*. Agronomía mesoamericana, 20(1), 153-175.

Barolo, M. I., Nathalie Ruiz Mostacero, Silvia N. Lopez. 2014. *Ficus carica* L. (Moraceae): An ancient source of food and health. Food Chem. 164: 119-127.

Barrueto L.P., Zimmermann M.A. 2006. Contaminação *in vitro* de plantas. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília. 303 p.

Bashir, R., Tabassum, S., Rashid, A., Rehman, S., Adnan, A. 2023. Hojas de Higuera (*Ficus carica*): Composición y Propiedades Funcionales. En: Ramadan, MF (eds) Fig (*Ficus carica*): producción, procesamiento y propiedades. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-031-16493-4_15.

Bravo, M. 2009. Cultivo de la higuera breval. Agente de Extensión Agraria, 1(1), pp. 1-5.

Brum, G.R. 2001. Micropropagação da figueira (*Ficus carica* L.) 'Roxo de Valinhos' Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG. p. 41.

Burm, G.R., A.B. Silva and M. Pasqual. 2002. Effect of different concentration of BAP and NAA in the Fig (*Ficus carica* L.) *in vitro* propagation. Ciencia Agrotecnología, 26: 1403-1409.

- Cassells, A. C. 2012. Pathogen and biological contamination management in plant tissue culture: phytopathogens, vitro pathogens, and vitro pests. En: Loyola Vargas, V. M., N. Ochoa-Alejo (eds.), Plant Cell Culture Protocols, Methods in Molecular Biology, 877: 57-80.
- Catraro, M. A. 2014. El Cultivo de la Higuera: Producción de higos y su deshidratación como método para el agregado de valor del producto. Universidad Nacional del Litoral, Argentina. 45 p.
- Chávez, M. 1996. El mundo del higo. España. Disponible en <http://www.terra.com.ve/especiales/medicinatural/higo.html>
- Condit, I. J. 1969. Ficus: The exotic species. University of California, Division of Agricultural Sciences. 363 p.
- Contreras-Saavedra S. 2019. Actividad antifúngica de un recubrimiento biodegradable para el manejo postcosecha de *Ficus carica*. Tesis de Maestría en Ciencias Centro de Desarrollo de Productos Bióticos, Instituto Politécnico Nacional. Morelos, México. 96 p.
- Córdova, J. 2018. Variedades Higo, *Ficus carica* L. Moraceae. Frutas & Hortalizas, 1(1), pp.1-4.
- Danilova, S. A. & Dolgikh, Y. I. 2004. The stimulatory effect of the antibiotic cefotaxime on plant regeneration in maize tissue culture. Russian Journal of Plant Physiology, 51, 559-562.
- Debib, A., Menadi, S. 2023. Compuestos fenólicos de higos frescos y secos: caracterización y beneficios para la salud. En: Ramadan, MF (eds) Fig (*Ficus*

carica): producción, procesamiento y propiedades. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-031-16493-4_18

FAO/STAT. 2021. Cultivos. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. <https://www.fao.org/statistics/es/> (Citado 10/05/2021).

Fernández, J. 2016. Caracterización química y morfológica de ocho eco tipos de higo (*Ficus carica* L.). Tesis para obtener el título de ingeniero agrónomo Fitotecnista. Universidad autónoma del estado de México. Toluca, México. 62 p.

Ferreira, E. A. 2006. Micropropagação, calogênese e irradiação da figueira “Roxo de Valinhos”. Tese (Doutorado em Fitotecnia) –Departamento de Fitotecnia, Universidade Federal de Lavras, Lavras. 103 p.

Flaishman, M. A.; V. Rodov; E. Stover. 2008. The fig: botany, horticulture, and breeding. Horticultural Reviews. 4: 113-196.

Flores-Cortéz, A. 2001. Establecimiento de las etapas iniciales de la micropropagación de Caoba (*Swietenia macrophylla* King) a partir de microestacas tomadas de plantas de invernadero. Turrialba, Costa Rica. 87 p.

Flores-Mora, D. M. y Jiménez-Bonilla, V. 2007. Desarrollo del cultivo del higo (*Ficus carica*) para consumo fresco y procesado, como una alternativa de diversificación para el sector agrícola. Rev. Escuela de Biología Centro de Investigación en Biotecnología. 93 p.

Flores-Mora, D. M., Jiménez-Bonilla, V., y Chacón-Cerdas, R. 2009. Cultivo de tejidos en *Ficus carica* con miniestacas. Agronomía Mesoamericana. pp. 319-325.

- Fraguas, C.B., M. Pasqual, L.F. Duutra and J.O. Azetta. 2004. Micropropagation of Fig (*Ficus carica* L.) "Roxo De Valinhos" plants. *In Vitro Cell. Dev. Biol-Plant*, 40: 471-474.
- Garay-Arroyo, A., de la Paz Sánchez, M., García-Ponce, B., Álvarez-Buylla, ER, & Gutiérrez, C. 2014. La homeostasis de las auxinas y su importancia en el desarrollo de *Arabidopsis thaliana*. *Revista de educación bioquímica*, 33 (1), 13-22.
- García E., García C., Sánchez A., Hernández A. y Alvarez M. 1998. Influencia del sulfato de gentamicina sobre el control de contaminantes bacterianos en el cultivo *in vitro* de *Eucalyptus citriodora* Hook. III Encuentro Latinoamericano de Biotecnología Vegetal, La Habana, 162 p.
- García, R. M. T. 2014. Caracterización Morfológica y Genética de Variedades Mexicanas de Higo (*Ficus carica* L.). Tesis de Doctorado. Colegio de Postgraduados. Texcoco, Edo. de México. 142 p.
- Gariglio, N., Favaro, J. C., Forte, R. 2013. "Capítulo 5: Higuera" Material Didáctico Curso: Cultivo de Frutales I. Especialización en Cultivos Intensivos. FCA. UNL. Esperanza, Santa Fe, pp. 65-77.
- George, E. F., M. A. Hall, G. J. De Klerk. 2008. Chapter 9: Somatic Embryogenesis. *Plant propagation by tissue culture*. 3rd edition, XII, pp. 335-354.
- George, E.F., Debergh, P.C. 2008. Micropropagation: Uses and Methods. *Plant propagation by tissue culture* (3), pp. 29-64.

- Gomora, R.J. 2014. Embriogénesis somática de cuatro variedades de crisantemo (*Dendranthema grandiflora* Tzvelev). Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma del Estado de México. 85 p.
- Gonzales, A. y Grajal, M. 2011. Higueras de Canarias, Caracterización morfológica de variedades. Instituto Canario de Investigaciones Agrarias. Gobierno de Canarias. 126 p.
- Grau, B. y Vera, I. 2016. El nivel de competitividad de la empresa Athos, Huacatambo Ancash, para la exportación de higo frescos al mercado francés, período 2016-2017. (Tesis de pregrado). Universidad Tecnológica del Perú, Trujillo. 81 p.
- Günver, G. y Ertan, E. 1997. Un estudio sobre la propagación de higos por las técnicas de cultivo de tejidos. En I Simposio Internacional de Fig. pp. 169-172.
- Hartmann H.T., Kester D.E, Davies Junior F.T. & Geneve R.L. 2002. Plant propagation: principles and practices. 7 ed. New Jersey, Prentice Hall. 880 p.
- Hepaksoy, S. and Aksoy, U. 2006. Propagation of *Ficus carica* L. Clones by *In vitro* Culture. *Biologia Plantarum*, 50: 433-436.
- Ibarra-López, A. 2015. Organogénesis de cuatro cultivares de aguacate *Persea americana* Mill. Magister Scientiae, Universidad Autónoma de Nuevo León pp. 1-91.
- ITIS (Integrated Taxonomic Information System). 2022. *Ficus carica* L. Taxonomic Serial No. 19093. Disponible en: https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=19093#null (Citado 20/06/2022).

- Juárez Martínez, L. 2019. Aplicación de tecnologías emergentes e innovadoras en la propagación vegetativa de cuatro variedades de higo (*Ficus carica* L.) (Master's thesis), 100 p.
- Karimpour, S., Davarynejad, G. H., Bagheri, A. and Tehranifar, A. 2013. *In vitro* Establishment and Clonal Propagation of Sebri Pear Cultivar. J. Agr. Sci. Tech., 15: 1209-1217.
- Khadari, B., Grout, C., Santoni, S., & Kjellberg, F. 2005. Contrasted genetic diversity and differentiation among Mediterranean populations of *Ficus carica* L.: a study using mtDNA RFLP. Genetic resources and crop evolution, 52, 97-109.
- Kislev, M.E., Hartmann, A. & Bar-Yosef, O. 2006. Early domesticated fig in the Jordan Valley. Science, 312(5778), 1372-1374.
- Kumar, P. P., & Loh, C. S. 2012. Plant tissue culture for biotechnology. In Plant biotechnology and agriculture. Academic Press. pp. 131-138.
- Kumar, V., Radha, A. & Kumar Chitta, S. 1998. *In vitro* plant regeneration of fig (*Ficus carica* L. cv. Gular) using apical buds from mature trees. Plant Cell Reports, 17, 717-720.
- Levitus, G., Echenique, V., Rubinstein, C., Hopp, E., & Mroginski, L. 2010. Biotecnología y mejoramiento vegetal II. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Argentina, 258 p.
- Lloyd, G. B., B. H. McCown. 1980. Commercially feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. *Int. Plant Prop. Soc. Com. Proc.*, 30: 421-427.

- López, A. F. C. 2017. La Higuera: el primer árbol cultivado en el entorno mediterráneo mediante reproducción vegetativa. *Revista-Andelma-Magazine*, 13(24), 45-51.
- Lucero Vega, G. 2018. Diseño de un sistema de riego mediante difusores subterráneos y su efecto en la ecofisiología y productividad del agua en higuera (*Ficus carica* L.). (Tesis de Posgrado, Centro de investigaciones biológicas del noroeste, S.C.). 83 p.
- Mahesar, S.A., Shoaib, H., Khaskheli, A.R., Sherazi, S.T.H., Kori, A.H., Malghani, N.A. 2023. Minerales de higo. En: Ramadan, MF (eds) Fig (*Ficus carica*): producción, procesamiento y propiedades. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-031-16493-4_20
- Melgarejo Moreno, P. 2000. Tratado de Fruticultura para zonas áridas y semiáridas Vol. I. 1ra Edición. AMV Ediciones -Mundi-Prensa. Madrid, España. 430 p.
- Melgarejo Moreno, P. 2019. El cultivo de la higuera (*Ficus carica* L.). 118 p.
- Mendoza Bustamante, J. S., Sánchez Rizo L. M., Yance Campoverde E. R. 2012. “Proyecto de Inversión para desarrollo y creación de una Empresa dedicada a la Elaboración y Comercialización de Higos Cristalizados en la ciudad de Guayaquil” Escuela Superior Politécnica Del Litoral. Facultad de Economía y Negocios. Guayaquil, Ecuador. 131 p.
- Mendoza Páez, V. M. 2018. Acumulación y absorción de nutrimentos en el cultivo de la higuera *Ficus carica* L. CV. Netzahualcóyotl en sistemas de producción intensivos (Master's thesis). 82 p.

- Mendoza Ramírez, J. L. 2019. Efecto de tres dosis de root-hor en el enraizamiento de estacas de higo (*Ficus carica* L.) en condiciones de vivero 108 p.
- Mendoza, C. V. M. 2013. Fisiología y Manejo de la Higuera (*Ficus carica* L.) en Producción Forzada bajo Cubierta Plástica. Tesis de Doctorado. Colegio de Postgraduados. Texcoco, Edo de México. 86 p.
- Meziant, L., Bachir-bey, M. 2023. *Ficus carica* L. como fuente de flavonoides bioactivos naturales. En: Ramadan, MF (eds) Fig (*Ficus carica* L): producción, procesamiento y propiedades. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-031-16493-4_19.
- Mitrofanova I.V., Mitrofanova O.V., Lesnikova-Sedoshenko N.P., Chelombit S.V., Shishkina, E.L., Chirkov, S.N. 2016. Phytosanitary status of *Ficus carica* collection orchards in Nikita Botanical Gardens and biotechnology of fig plants regeneration. Acta Horticulturae Volume 1139: 303-309.
- Mittal P., Gosal S.S., Senger A., Kumar P. 2009. Impact of cefotaxime on somatic embryogenesis and shoot regeneration in sugarcane. Physiol Mol Biol Plants 15:257–265.
- Monreal González, M. D. M. 2021. Detección de virus en plantas de vivero de *Ficus carica* L. Universidad Politécnica de Valencia. 38 p.
- Munif A., Hallmann J. y Sikora R. 2012. Aislamiento de bacterias endófitas del tomate y sus actividades de biocontrol contra enfermedades fúngicas. Microbiología Indonesia. 6(4): 148-156.

- Murashige, T., F. Skoog. 1962. A revised médium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiology Plantarum*, 15: 473-497.
- Mustafa, N. S. and Taha, R. A. 2012. Influence of Plant Growth Regulators and Subculturing on *In vitro* Multiplication of Some Fig (*Ficus carica* L.) Cultivars. *J. Appl. Sci. Res.*, 8: 4038-4044.
- Nair D. y Padmavathy S. 2014. Impacto de los microorganismos endófitos en las plantas, el medio ambiente y los seres humanos. *La Revista del Mundo Científico*. 2014. 11 p.
- 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 (3): 55-161.
- Olmos S., G. Luciani y E. Galdeano. 2010. Micropropagación. *In: Levitus G., Echenique, V., Rubinstein, C., Hopp, E. y Mroginski, L. (eds.). Biotecnología y mejoramiento vegetal II. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Buenos Aires, Argentina. pp. 353-362.*
- Palú, E. G. 2011. Micropropagação da figueira (*Ficus carica* L.): estabelecimento, multiplicação e enraizamento *in vitro*. 102 f. Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira, 2011. Disponible en: <http://hdl.handle.net/11449/106150>.
- Pasqual, M. and Ferreira, E. A. 2007. Micropropagation of Fig tree (*Ficus carica* L.). *Protocols for micropropagation of woody trees and fruits*, pp. 409-416.

- Pereira, C., Serradilla, M.J., Pérez- Gragera, F., Martín, A., Villalobos, MC. and López-Corrales, M. 2017. Evaluation of agronomic and fruit quality traits of fig tree varieties (*Ficus carica* L.) grown in Mediterranean conditions. Spanish Journal of Agricultural Research, 15:3. 123-128.
- Pineda, R., Yocabet, N. 2021. Estrategia de gestión para la red de valor-higo (Doctoral dissertation, Universidad Autónoma Chapingo). 95 p.
- Pucha Mora, L. A. 2016. Evaluación de nueve accesiones de higo (*Ficus carica* L.) en la estación experimental del austro del INIAP, cantón Gualaceo provincia del Azuay-Ecuador. 181 p.
- Ramírez, H., Guevara, M. E., y Escobar Pérez, R. H. 2012. Cultivo de tejidos vegetales: conceptos y prácticas. Palmira, Colombia. Universidad Nacional de Colombia. 118 p.
- Ramos-Amaya, J.E. 2012. Avances de la micropropagación *in vitro* de plantas leñosas. Universidad Nacional Abierta y a Distancia. Especialización en Biotecnología Agraria. Bogota. pp. 5-19
- Rodríguez, M. A. 2018. Cultivo *in vitro* alternativa al cultivo tradicional de plantas medicinales. Universidad Complutense. Tesis de Licenciatura. 30 p.
- Rojas, S., García, J., & Alarcón, M. 2004. Propagación asexual de plantas. CORPOICA-PRONATTA. 55 p.
- Rosenblueth M. y Martínez-Romero E. 2006. Bacteriana Wang Y y Dai C. 2011. Endofitos: un recurso potencial para la biosíntesis, la biotransformación y la biodegradación. Anales de Microbiología. 19(8): 827-837.

- Ruiz M.S., Martín, A., Villalobos, M.C., Calle, A., Serradilla, M.J., Córdoba, M.G., Hernández, A. 2016. Yeasts isolated from figs (*Ficus carica* L.) as biocontrol agents of postharvest fruit diseases. *Food Microbiology*. Volume 57: 45-53.
- Sabale S.N., Patil D.M., Gokhale N.B., Sawardekar S.V., Sawant S.S. 2015. Elimination of bacterial contamination by using antibiotics in micropropagation of banana (*Musa* spp.) cv. Grand naine *Journal of Cell and Tissue Research* 15(2): 5111-5115.
- Saidi, R., Lamarti, A. and Badoc, A. 2007. Micropropagation du Caroubier (*Ceratonia siliqua*) par Culture de Bourgeons Axillaires Issus de Jeunes Plantules. *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux*, 146: 113-129.
- Salas, E., Agramonte, D., Barbón, R., Jiménez, T., Collado, L., Pérez, P., Ramírez, A. 2004. Establecimiento *in vitro* de morera. *Biotecnología Vegetal*, 4(2), 15–19.
- Sarkhosh, A., Andersen, P. C., y Herrera, L. J. C. 2020. El higo: HS27S/MG459, 3/2020. EDIS, pp. 5-7.
- SIAP. 2022. Anuario Estadístico de la Producción Agrícola. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. <https://nube.siap.gob.mx/cierreagricola/> (Citado 10/05/2023).
- Singh, J. and Tiwari, K. N. 2010. Highfrequency *In vitro* Multiplication System for Commercial Propagation of Pharmaceutically Important *Clitoria ternatea* L.: A Valuable Medicinal Plant. *Ind. Crop. Prod.*, 32: 534–538.
- Smith, R. H. 2013. *Plant Tissue Culture. Techniques and experiments. 3rd edition.* Elsevier, pp. 45-62.

- Solomon, A., S. Golubowicz, S., Z. Yablowicz, Z., S. Grossman, M. Bergman, H. Gottlieb, A. Altman, Z. Kerem, M. A. Fleishman. 2006. Antioxidant activities and anthocyanin content of fresh fruits of common fig (*Ficus carica* L.). J. Agric. Food Chem. 54 (20): 7717-7723.
- Suarez, I. E., Jarma, A. J., & Avila, M. 2006. Development of an *in vitro* propagation protocol for roble (*Tabebuia rosea* Bertol DC). Temas Agrarios, 11(2), 52-62.
- Suárez, Y. R., Gutiérrez, J. G. G., e Ixta, J. A. R. 2022. Evaluación de recubrimientos comestibles en la vida postcosecha del Higo (*Ficus carica* L.) variedad "Black Mission". Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha, 23(1), 19-25.
- Taiz, L.; Zeiger, E. 2009. Fisiología vegetal. 4. ed. Porto Alegre: Artmed. 848 p.
- Tomalá, G. y Ulloa, D. 2015. Estudio de factibilidad para la creación de un centro de producción y comercialización de un producto hecho a base de Higo (*Ficus carica*) en la ciudad de Guayaquil. Tesis de Licenciatura. Universidad de Guayaquil, Guayaquil, Ecuador. 162 p.
- Villalobos Rivera, M. C. 2015. Estudio para la prolongación de la vida útil de variedades de higos y brevas interesantes para su consumo en fresco y estudio de técnicas alternativas para el secado de higos. Universidad de Extremadura. 126 p.
- Yancheva, S. D., Golubowicz, S., Yablowicz, Z., Perl, A., & Flaishman, M. A. 2005. Efficient Agrobacterium-mediated transformation and recovery of transgenic fig (*Ficus carica* L.) plants. Plant Science, 168(6), 1433-1441.
- Zinniel D., Lambrecht P., Harris NB, Feng Z., Kuczmariski D., Higley P., Ishimaru C., Arunakumari A., Barletta RandVidaver A. 2002. Aislamiento y caracterización

de bacterias colonizadoras endofíticas de cultivos agronómicos y plantas de pradera. *Aplicación Environ Microbiol.* 68(5): 2198-2208.

Zuraida, A. R., Fatin, L. I. K. and Ayu, N. O. 2014. *In vitro* Plant Propagation for Rapid Multiplication of *Melicope lunuankenda*: A Olant Species of High Medicinal Value. *Int. J. Pharm. Bio. Sci.*, 5: 1148- 1156.