SEP

POLIBOTÁNICA

ISSN 1405-2768 ISSN 2395-9525

Núm. 61 Enero 2026

Ciencia y Tecnología
Secretaría de Ciencia, Humanidades, Tecnología e Innovación

POLIBOTÁNICA Núm. 61 Enero 2026

SEP
SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA
Instituto Politécnico Nacional
"La Técnica al Servicio de la Patria"
DIRECCIÓN DE PUBLICACIONES

PÁG. CONTENIDO

1 La familia *Buxaceae* en México
The *Buxaceae* family in Mexico
Rafael Fernández N. | María de la Luz Arreguín Sánchez

23 Riqueza de epífitas vasculares en la reserva El Peñón, municipio de Valle de Bravo, Estado de México, México
Vascular epiphyte richness in The Peñón reserve, municipality of Valle de Bravo, Estado de México, Mexico
Ivonne Gomez | Bruno Téllez | Adolfo Espejo-Serna | Ana Rosa López-Ferrari

55 Variación de umbrales dnbr y rbr en la detección de incendios forestales en el área Iztaccíhuatl-Popocatépetl México
Variation of dnbr and rbr thresholds in forest fire detection in the Iztaccihuatl-Popocatepetl area, Mexico
Ederson Steven Cobo Muelas | Pablito Marcelo López Serrano | Daniel José Vega Nieva | Jose Javier Corral Rivas | José López García | Lilia de Lourdes Manzo Delgado

75 Revisión de los estudios sobre bosques de galería en México: enfoques, clasificación, géneros arbóreos asociados e importancia ecológic
Review of studies on gallery forests in Mexico: research approaches, classification, associated arboreal genera, and ecological importance
Cynthia Judith Carranza Ojeda | Juan Antonio Reyes Agüero | Carlos Alfonso Muñoz Robles | Anuschka Van't Hooft | Jorge Alberto Flores Cano | José Villanueva Díaz

101 Servicios ecosistémicos de provisión en comunidades de pueblos Otomí y Matlazincas del Estado de México, México
Provision of ecosystem services in indigenous communities in the State of Mexico, Mexico
Laura White-Olascoaga | David García-Mondragón | Carmen Zepeda-Gómez

115 Comparación de tasas de respiración del suelo en ecosistemas agrícola, agostadero y urbano en una zona semiárida en Juárez, Chihuahua, México
Comparison of soil respiration rates in agricultural, rangeland, and urban ecosystems at semiarid areas in Juárez, Chihuahua, Mexico
Juan Pedro Flores Margez | Alejandra Valles Rodriguez | Pedro Osuna Avila | Dolores Adilene Garcia Gonzalez

133 Caracterización ecológica de la zona de proliferación del hongo blanco de pino (*Tricholoma mesoamericanum*) en "El Guajolote" Hidalgo, México
Ecological characterization of the fruiting area of the pine white mushroom (*Tricholoma mesoamericanum*) in "El Guajolote" Hidalgo, Mexico
Alvaro Alfonso Reyes Grimaldo | Ramón Razo Zárate | Oscar Arce Cervantes | Magdalena Martínez Reyes | Jesús Pérez Moreno | Rodrigo Rodríguez Laguna

145 Influencia de la variabilidad climática y del fenómeno ENOS en el crecimiento radial de *Pinus rzedowskii* y *P. martinezii* en Michoacán, México
Influence of climate variability and the ENSO phenomenon on the radial growth of *Pinus rzedowskii* and *P. martinezii* in Michoacán, Mexico
Ulises Manzanilla Quiñones | Patricia Delgado Valerio | Teodoro Carlón Allende

165 Caracteres morfométricos y patrones de germinación de semillas de *Pinus pseudostrobus* Lindl. de diferentes procedencias
Morphometric characteristics and germination patterns of *Pinus pseudostrobus* Lindl. seeds from different sources
Daniel Madrigal González | Nahum Modesto Sánchez-Vargas | Mariela Gómez-Romero | María Dolores Uribe-Salas | Alejandro Martínez-Palacios | Selene Ramos-Ortiz

181 Germinación de *Ormosia macrocalyx* Ducke (Fabaceae), árbol nativo en peligro de extinción
Germination of *Ormosia macrocalyx* Ducke (Fabaceae), an endangered native tree
Brenda Karina Pozo Gómez | Carolina Orantes García | Dulce María Pozo Gómez | Alma Gabriela Verdugo Valdez | María Silvia Sánchez Cortés | Rubén Antonio Moreno Moreno

193 Propagación in vitro de callos de morera (*Morus alba* L.) como alternativa alimenticia para larvas de gusanos de seda (*Bombyx mori*)
In vitro propagation of *Morus alba* L. calli as an alternative feed for silkworm (*Bombyx mori*) larvae
Alma Rosa Hernández Rojas | José Luis Rodríguez-de la O | Alejandro Rodríguez-Ortega | Elvis García-López | Manuel Hernández-Hernández | Jessica Lizbeth Sebastián-Nicolás | Rosita Deny Romero-Santos

205 Mejoras en un método comercial de extracción de ADN para obtener extractos de ácido nucleico de alta calidad a partir de yemas vegetativas de *Populus tremuloides* Michx.
Improvements to a commercial DNA extraction method for high-quality nucleic acid extractions from *Populus tremuloides* Michx. vegetative buds
Cecilia Gutierrez | Marcelo Barraza Salas | Ilga Mercedes Porth | Christian Wehenkel

221 Crecimiento de plántulas de *Laelia autumnalis* y *Encyclia cordigera* en función de la concentración de sacarosa y carbón activado.
Growth of *Laelia autumnalis* and *Encyclia cordigera* seedlings as a function of sucrose and activated charcoal concentration
Marcela Cabañas Rodríguez | María Andrade Rodríguez | Oscar Gabriel Villegas Torres | Iran Alia Tejacal | Porfirio Juarez López | José Antonio Chávez García

235 Dinámica fenologica mensual de especies de bosque mixto
Montly phenological dynamics of mixed forest species
Andrea Cecilia Acosta-Hernández | Eduardo Daniel Vivar Vivar | Marin Pompa-García

PÁG. CONTENIDO

259 Efecto de hongos micorrízicos arbusculares sobre la supervivencia y el crecimiento de plantas de *Dalbergia congestiflora* propagadas in vitro y por semilla en condiciones de invernadero
Effect of arbuscular mycorrhizal fungi on the survival and growth of *Dalbergia congestiflora* plants propagated in vitro and from seed under greenhouse conditions
Enrique Ambriz | Carlos Juan Alvarado López | Yoshira López Antonio | Hebert Jair Barrales Cureño | Rafael Salgado Garciglia | Alejandra Hernández García

273 Crioconservación de explantes florales encapsulados de cacao (*Theobroma cacao* L.) mediante deshidratación y vitrificación
Cryopreservation of encapsulated floral explants of cacao (*Theobroma cacao* L.) by dehydration and vitrification
Eliud Rodríguez Olivera | Leobardo Iracheta Donjuan | José Luis Rodríguez de la O | Carlos Hugo Avendaño Arrazate

295 Análisis de la diversidad genética en cacao (*Theobroma cacao* L.) y pataxte (*T. bicolor* Humb. & Bonpl.) de los estados de Tabasco y Chiapas, México
Genetic diversity analysis in cocoa (Theobroma cacao L.) and pataxte (*T. bicolor* Humb. & Bonpl.) from Tabasco and Chiapas, Mexico
Fernanda Sarahi Hernández Montes | Guadalupe Concepción Rodríguez Castillejos | Guillermo Castañón Nájera | Octelina Ruiz Castillo | Christian Asur Christian Asur | Hernán Wenceslao Araujo Torres | Régulo Ruíz Salazar

311 Respuesta morfogenética de *Agave angustifolia* al gradiente auxina-citocinina durante el desarrollo de embriones somáticos indirectos
Morphogenetic response of *Agave angustifolia* to the auxin-cytokinin gradient during the development of indirect somatic embryos
Jesús-Ignacio Reyes-Díaz | Rosa María Nava-Becerril | Amaury-Martín Arzate-Fernández

329 Efecto del ácido salicílico en el incremento de biomasa y azúcares reductores en *Agave cupreata* y *Agave salmiana*
Effect of salicylic acid on increase of biomass and reducing sugars in *Agave cupreata* and *Agave salmiana*
Hilda Guadalupe GARCÍA NÚÑEZ | Amaury Martín Arzate-Fernández | Ana María Roque-Otero | Martín Rubí-Arriaga | Aurelio Domínguez-López

343 Contribución al conocimiento tradicional sobre el uso y manejo de los recursos vegetales en el municipio de Malinalco, Estado de México, México.
Contribution to traditional knowledge of plant resource use and management in Malinalco, State of Mexico, Mexico
Margarita Micaela Avila Uribe | Blanca Margarita Berdeja-Martínez | Ana María Mora-Rocha | Yajaira Cerón-Reyes | Karla Mariela Hernández-Sánchez | María Eugenia Ordorica Vargas | Lidia Cevallos-Villanueva

365 La agrobiodiversidad del agroecosistema traspatio como estrategia contra la pobreza extrema en Platón Sánchez, Veracruz, México
Agrobiodiversity in the backyard agroecosystem as a strategy against extreme poverty in Platon Sanchez, Veracruz, Mexico
Rubén Purroy-Vásquez | Gregorio Hernández-Salinas | Jorge Armida-Lozano | Alejandro Llaguno-Aguiñaga | Karla Lissete Silva-Martinez | Nicolás Francisco Mateo-Díaz

385 Quelites entre cocineras tradicionales nahuas y totonacas de la Sierra Norte de Puebla, México
Quelites among nahua and totonac traditional cooks from the Northern Sierra of Puebla, Mexico
Victoria Ortiz-Trápala | Heike Vibrans | María Edelmira Linares-Mazari | Diego Flores-Sánchez

409 *Litsea glaucescens* y *Clinopodium macrostemum* recursos forestales no maderables en mercados tradicionales de los Valles Centrales de Oaxaca
Litsea glaucescens and *Clinopodium macrostemum* non-timber forest resources in traditional markets of the Central Valleys of Oaxaca
Domitila Jarquín-Rosales | Gisela Virginia Campos Angeles | Valentín José Reyes-Hernández | Salvador Lozano-Trejo | Juan José Alpuche-Osorno | Gerardo Rodriguez-Ortiz

427 Sistemas verticales rústicos para la producción de alimentos en espacios limitados: un aporte a la seguridad alimentaria familiar
Rustic vertical home gardens for food production in limited spaces: a contribution to household food security
Pablo Yax-Lopez | Kevin Manolo Noriega Elías | Jorge Rubén Sosof Vásquez

443 Orquídeas silvestres comercializadas en cinco mercados tradicionales de Oaxaca, México
Wild orchids sold in five traditional markets in Oaxaca, Mexico
María Hipolita Santos Escamilla | Gisela Virginia Campos Angeles | José Cruz Carrillo Rodríguez | Nancy Gabriela Molina Luna

457 Proceso artesanal de elaboración de jabón de corozo (*Attalea butyracea* (Mutis ex L.F.) Wess. Boer) en la región de la Chontalpa, Tabasco, México
Artisanal process of making corozo soap (*Attalea butyracea* (Mutis ex L.F.) Wess. Boer) in the Chontalpa region, Tabasco, Mexico
Elsa Chávez García

479 La comercialización de plantas del bosque tropical caducifolio y su importancia cultural en el centro de México
The commercialization of tropical deciduous forest plants and their cultural importance in central Mexico
Ofelia Sotelo Caro | Alejandro Flores Palacios | Susana Valencia Diaz | David Osvaldo Salinas Sánchez | Rodolfo Figueroa Brito

POLIBOTÁNICA

Núm. 61 ISSN electrónico: 2395-9525 Enero 2026

Portada

Sistema de cultivo vertical integrado por módulos contenedores uniformes que albergan diversas especies herbáceas y foliares. La disposición estratificada optimiza el uso del espacio y favorece la eficiencia en la captación de luz, mientras que la heterogeneidad morfológica de las plantas evidencia la plasticidad fenotípica asociada a condiciones de cultivo intensivo en ambientes urbanos. Este sistema representa una forma de infraestructura verde orientada a la producción vegetal sustentable y a la mejora microclimática en entornos metropolitanos.

BA vertical cultivation system composed of uniform container modules housing a variety of herbaceous and foliage plant species. The stratified arrangement optimizes space use and enhances light capture efficiency, while the morphological heterogeneity of the plants reflects phenotypic plasticity under intensive cultivation conditions in urban environments. This system represents a form of green infrastructure aimed at sustainable plant production and microclimate improvement in metropolitan settings.

por/by
Rafael Fernández Nava

REVISTA BOTÁNICA INTERNACIONAL DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

EDITOR EN JEFE
Rafael Fernández Nava

EDITORA ASOCIADA
María de la Luz Arreguín Sánchez

COMITÉ EDITORIAL INTERNACIONAL

Christiane Anderson
University of Michigan
Ann Arbor. Michigan, US

Heike Vibrans
Colegio de Postgraduados
Estado de México, México

Hugo Cota Sánchez
University of Saskatchewan
Saskatoon, Saskatchewan, Canada

Fernando Chiang Cabrera
Universidad Nacional Autónoma de México
Ciudad de México, México

Thomas F. Daniel
California Academy of Sciences
San Francisco, California, US

Francisco de Asis Dos Santos
Universidad Estadual de Feira de Santana
Feira de Santana, Brasil

Carlos Fabián Vargas Mendoza
Instituto Politécnico Nacional
Ciudad de México, México

José Luis Godínez Ortega
Universidad Nacional Autónoma de México
Ciudad de México, México

José Manuel Rico Ordaz
Universidad de Oviedo
Oviedo, España

Edith V. Gómez Sosa
Instituto de Botánica Darwinion
Buenos Aires, Argentina

Jorge Llorente Bousquets
Universidad Nacional Autónoma de México
Ciudad de México, México

Delia Fernández González
Universidad de León
León, España

José Angel Villarreal Quintanilla
Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro
Saltillo, Coahuila, México

Luis Gerardo Zepeda Vallejo
Instituto Politécnico Nacional
Ciudad de México, México

Claude Sastre
Muséum National d´Histoire Naturelle
París, Francia

Mauricio Velayos Rodríguez
Real Jardín Botánico
Madrid, España

Noemí Waksman de Torres
Universidad Autónoma de Nuevo León
Monterrey, NL, México

Julieta Carranza Velázquez
Universidad de Costa Rica
San Pedro, Costa Rica

Tom Wendt
University of Texas
Austin, Texas, US

Edith V. Gómez Sosa
Instituto de Botánica Darwinion
Buenos Aires, Argentina

Dr. Juan Ramón Zapata Morales
Universidad de Guanajuato
Guanajuato. México

DISEÑO Y FORMACIÓN ELECTRÓNICA
Luz Elena Tejeda Hernández

OPEN JOURNAL SYSTEM Y TECNOLOGÍAS DE LA INFORMACIÓN
Pedro Aráoz Palomino

POLIBOTÁNICA**,** revista botánica internacional del Instituto Politécnico Nacional, incluye exclusivamente artículos que representen los resultados de investigaciones originales en el área. Tiene una periodicidad de dos números al año, con distribución y Comité Editorial Internacional.

Todos los artículos enviados a la revista para su posible publicación son sometidos por lo menos a un par de árbitros, reconocidos especialistas nacionales o internacionales que los revisan y evalúan y son los que finalmente recomiendan la pertinencia o no de la publicación del artículo, cabe destacar que este es el medio con que contamos para cuidar el nivel y la calidad de los trabajos publicados.

INSTRUCCIONES A LOS AUTORES PARA LA PUBLICACIÓN DE TRABAJOS

Se aceptarán aquellos originales que se ajusten a las prescripciones siguientes:

POLIBOTÁNICA incluye exclusivamente artículos que representen los resultados de investigaciones originales que no hayan sido publicados.

1. El autor deberá anexar una carta membretada y firmada dirigida al Editor, donde se presente el manuscrito, así como la indicación de que el trabajo es original e inédito, ya que no se aceptan trabajos publicados o presentados anterior o simultáneamente en otra revista, circunstancia que el autor(es) deberá declarar expresamente en la carta de presentación de su artículo.

2. Al quedar aceptado un trabajo, su autor no podrá ya enviarlo a ninguna otra revista nacional o extranjera.

3. Los artículos deberán estar escritos en español, inglés, francés o portugués. En el caso de estar escritos en otros idiomas diferentes al español, deberá incluirse un amplio resumen en este idioma.

4. Como parte de los requisitos del CONACYT, POLIBOTÁNICA ahora usa la plataforma del Open Journal System (OJS); para la gestión de los artículos sometidos a la misma.Así que le solicitamos de la manera más atenta sea tan amable de registrarse y enviar su artículo en la siguiente liga: www.polibotanica.mx/ojs/index.php/polibotanica

a) cargar el trabajo en archivo electrónico de office-word, no hay un máximo de páginas con las siguientes características:
b) en páginas tamaño carta, letra times new roman 12 puntos a doble espacio y 2 cm por margen

5. Las figuras, imágenes, gráficas del trabajo deben estar incluidas en el documento de Word original:

a) en formato jpg
b) con una resolución mínima de 300 dpi y un tamaño mínimo de 140 mm de ancho
c) las letras deben estar perfectamente legibles y contrastadas

6. Todo trabajo deberá ir encabezado por:

a) Un título tanto en español como en inglés que exprese claramente el problema a que se refiere. El formato para el título es: negritas, tamaño 14 y centrado;

b) El nombre del autor o autores, con sus iniciales correspondientes, sin expresión de títulos o grados académicos. El formato para los autores es: alineados a la izquierda, cada uno en un párrafo distinto y tamaño 12. Cada autor debe tener un número en formato superíndice indicando a qué afiliación pertenece;
c) La designación del laboratorio e institución donde se realizó el trabajo.La(s) afiliación(es) debe(n) estar abajo del grupo de autores. Cada afiliacióndeberá estar en un párrafo y tamaño

12. Al inicio de cada afiliaciónestará el número en superíndice que lo relaciona con uno o más autor/es.

d) El autor para correspondencia deberá estar en el siguiente párrafo, alineado a la izquierda, tamaño 12.

7. Todo trabajo deberá estar formado por los siguientes capítulos:

a) RESUMEN y ABSTRACT. Palabras clave y Key Words. El resumen debe venir después de la afiliación de los autores, alineado a la izquierda, tamaño 12. La palabra "Resumen: / Abstract:" debe venir en negritas y con dos puntos. El texto del resumen debe empezar en el párrafo siguiente, tamaño 12 y justificado. El texto "Palabras clave / Key Words:" debe venir en negritas seguido de dos puntos. Cada una de las palabras clave deben estar separadas por coma o punto y coma, finalizadas por punto.

b) INTRODUCCIÓN y MÉTODOS empleados. Cuando se trate de técnicas o métodos ya conocidos, solamente se les mencionará por la cita de la publicación original en la que se dieron a conocer. El formato para todas las secciones en esta lista es: negritas, tamaño 16 y centrado.

c) RESULTADOS obtenidos. Presentación acompañada del número necesario de gráficas, tablas, figuras o diagramas de tamaño muy cercano al que tendrá su reproducción impresa (19 x 14 cm).

d) DISCUSIÓN concisa de los resultados obtenidos, limitada a lo que sea original y a otros datos relacionados directamente y que se consideren nuevos.

e) CONCLUSIONES.

ESPECIFICACIONES DE FORMATO PARA EL CUERPO DEL TRABAJO

1. Secciones/Subtítulos de párrafo: Fuente tamaño 16, centrado, en negritas, con la primera letra en mayúscula.
2. Subsecciones/Subtítulos de párrafo secundarios : Fuente tamaño 14, centrado, en negritas, con la primera letra en mayúscula. Cuando existan subsecciones de subsección formatear en tamaño 13 negrita y centrado.
3. Cuerpo del texto: Fuente tamaño 12, justificado. NO debe haber saltos de línea entre párrafos.
4. Las notas de pie de página deben estar al final de cada página, fuente tamaño 12 justificadas.
5. Cita textual con más de tres líneas: Fuente tamaño 12, margen izquierdo de 4 cm.
6. Título de imágenes: Fuente tamaño 12, centrado y en negritas, separado por dos puntos de su descripción. Descripción de las imágenes: tamaño 12.
7. Notas al pie de las imágenes: Fuente tamaño 12 y centradas con respecto a la imagen, la primera letra debe estar en mayúsculas.
8. Imágenes: deben estar en el cuerpo del texto, insertadas en formato png o jpg, a por lo menos 300 dpi de resolución y centradas. Las imágenes deben estar en línea con el texto. Se consideran imágenes: gráficos, cuadros, fotografías, diagramas y, en algunos casos, tablas y ecuaciones.
9. Tablas de tipo texto: El título de las columnas de las tablas debe estar en negritas y los datos del cuerpo de la tabla con fuente normal. Los nombres científicos deben estar en itálicas. Se recomienda utilizar las Tablas como imágenes, estas deberán de ir centradas (a por lo menos 300 dpi de resolución).
10. Notas al pie de la tabla: Fuente tamaño 12 y centradas con respecto a la tabla, la primera letra debe estar en mayúsculas.
11. Ecuaciones pueden estar en Mathtype 1 o en imagen. En este último caso, seguir instrucciones del punto 8.
12. Citas del tipo autor y año deben estar entre paréntesis, con el apellido del autor seguido por el año (Souza, 2007), primera letra en mayúscula.

8. LITERATURA CITADA, Se tomara como base el Estilo APA para las Referencias Bibliográficas, formada por las referencias mencionadas en el texto del trabajo y en orden alfabético. Es obligatorio utilizar Mendeley® (software bibliográfico). El propósito de utilizar este tipo de software es asegurar que los datos contenidos en las referencias están correctamente estructurados y corresponden a las citas del cuerpo del texto.

ESTRUCTURA Y FORMATO DE LOS AGRADECIMIENTOS Y REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Los Agradecimientos deberán estar después de la última sección del cuerpo del texto. Esta información debe tener como título la palabra "Agradecimientos", o su equivalente en otro idioma, en negritas, tamaño 12 y centrado. El texto de esta información debe estar en tamaño 12 justificado.
2. Las Referencias bibliográficas deben estar en orden alfabético sin salto de línea de párrafo, alineados a la izquierda, en tamaño 12.
3. Apéndices, anexos, glosarios y otros materiales deben incluirse después de las referencias bibliográficas. En caso de que estos materiales sean extensos deberán ser creados como archivos PDF.

9. REVISIÓN Y PUBLICACIÓN

Todos los artículos enviados a la revista para su posible publicación serán sometidos a una revisión "doble ciego", se enviaran por lo menos a un par de árbitros, reconocidos especialistas nacionales o internacionales que los revisarán y evaluarán y serán los que finalmente recomienden la pertinencia o no de la publicación del artículo, cabe destacar que este es el medio con que contamos para cuidar el nivel y la calidad de los trabajos publicados.

Una vez aceptado el trabajo, se cobrarán al autor(es) $299 por página más IVA, independientemente del número de fotografías que contenga.

PUBLICATION GUIDELINES

POLIBOTÁNICA, an international botanical journal supported by the National Polytechnic Institute, only publishes material resulting of original research in the botanic area. It has a periodicity of two issues per year with international distribution and an international Editorial Committee.

All articles submitted to POLIBOTÁNICA for publication are reviewed by at least a couple of referees. National or international recognized experts will evaluate all submitted materials in order to recommend the appropriateness or otherwise of a publication. Therefore, the quality of published papers in POLIBOTÁNICA is of the highest international standards.

FOR PUBLICATION OF ARTICLES

Originals that comply with the following requirements will be accepted:

1. POLIBOTÁNICA includes only items that represent the results of original research which have not been published.The author should attach an official and signed letter to Editor stating that the work is original and unpublished. We do not accept articles published or presented before or simultaneously in another journal, a fact that the author (s) must expressly declare in the letter.

2. When an article has been accepted, the author can no longer send it to a different national or foreign journal.
3. Articles should be written in Spanish, English, French or Portuguese. In the case of be written in

languages other than Spanish, it should include an abstract in English.

4. The article ought to be sent to the POLIBOTÁNICA's Open Journal System http://www.polibotanica.mx/ojs in an office-word file without a maximum number of pages with the following features:

   a) on letter-size pages, Times New Roman font type, 12-point font size, double-spaced and 2 cm margin

5. The figures, images, graphics in the article must be attached as follows:

   a) in jpg format
   b) with a minimum resolution of 300 dpi and a minimum size of 140 mm wide
   c) all characters must be legible and contrasted

6. All articles must include:

   a) a title in both Spanish and English that clearly express the problem referred to. The format for this section is: bold, font size 14 and centered.;

   b) the name of the author or authors, with their initials, no titles and no academic degrees. The format for this section is: font size 12, aligned to the left, each name in a different paragraph but without spaces in-between and a superscript number indicating the affiliation;

   c) complete affiliations of all authors (including laboratory or research institution). The format for this section is: font size 12, aligned to the left, each name in a different paragraph but without spaces in-between and a superscript number at the beginning of the affiliation;

   d) correspondence author should be in the next paragraph, font size 12 and aligned to the left.

7. All work should be composed of the following chapters:

   a) RESUMEN and ABSTRACT. Palabras clave y Key Words. The format for this section is: bold, font size 12 and centered. Both words (RESUMEN: and ABSTRACT:)must include a colon, be in bold and aligned to the left. The body of the abstract must be justified and in font size 12. Both palabras clave: and keywords:must include a colon, be in bold and aligned to the left. Keywords must be separated by a comma or semicolon, must be justified and in font size 12.

   b) INTRODUCTION y METHODS. In the case of techniques or methods that are already known, they were mentioned only by appointment of the original publication in which they were released.

   c) RESULTS. Accompanied with presentation of the required number of graphs, tables, figures or diagrams very close to the size which will be printed (19 x 14 cm).

   d) DISCUSSION. A concise discussion of the results obtained, limited to what is original and other related directly and considered new data.

   e) CONCLUSIONS. The format for sections Introduction, Results, Discussion and Conclusionsis: bold, font size 16 and centered.

FORMAT SPECIFICATIONS FOR THE BODY OF WORK

1. Sections: Font size 16, centered, bold, with the first letter capitalized.
2. Subsections / Secondary Subtitles: Font size 14, centered, bold, with the first letter capitalized. When there are second grade subsections format in size 13 bold and centered.
3. Body: Font size 12, justified. There should NOT be line breaks between paragraphs.
4. Footnotes should be at the bottom of each page, font size 12 and justified.
5. Textual quotation with more than three lines: Source size 12, left margin of 4 cm.
6. Image Title: Font size 12, centered and bold, separated by two points from its description. Description of the images: size 12.
7. Images Footnotes: Font size 12 and centered with respect to the image, the first letter must be in capital letters.
8. Images: must be in the body of the text, inserted in png or jpg format, at least 300 dpi resolution and centered. Images should be in line with the text. Graphs, charts, photographs, diagrams and, in some cases, tables and equations are considered images.
9. Text Tables: Only The title of the columns of the tables must be in bold. Scientific names must be in italics. It is recommended to use the Tables as images, they should be centered (at least 300 dpi resolution).
10. Footnotes: Font size 12 and centered with respect to the table, the first letter must be in upper case.
11. Equations can be in Mathtype 1 or in image. In the latter case, follow the instructions in point 8.
12. Quotations of the author and year type must be in parentheses, with the author's last name followed by the year (Souza, 2007), first letter in capital letters.

8. LITERATURE CITED. All references must be cited using the APA stile. POLIBOTÁNICA requires the use of Mendeley® (free reference manager) for the entire bibliography.

STRUCTURE AND FORMAT OF ACKNOWLEDGMENTS AND BIBLIOGRAPHICAL REFERENCES

1. Acknowledgments must be after the last section of the body of the text. This information should be titled the word "Acknowledgments", or its equivalent in another language, in bold, size 12 and centered. The text of this information must be in size 12 justified.
2. Bibliographical references should be in alphabetical order without paragraph line jump, aligned to the left, in size 12.
3. Appendices, annexes, glossaries and other materials should be included after the bibliographic references. If these materials are extensive they should be created as PDF files.

9. REVIEW AND PUBLICATION

All articles submitted to the journal for publication will undergo a review "double-blind", they will be sent at least a couple of referees, recognized national or international experts that reviewed and evaluated and will be finally recommended the relevance or the publication of the article, it is noteworthy that this is the means that we have to take care of the level and quality of published articles.

Once accepted the article, the author will be charged $15 USD per text page, regardless of how many pictures it contains.

Toda correspondencia relacionada con la revista deberá ser dirigida a:

Dr. Rafael Fernández Nava
Editor en Jefe de

POLIBOTÁNICA

Departamento de Botánica
Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional
Apdo. Postal 17-564, CP 11410, Ciudad de México

Correo electrónico:
polibotanica@gmail.com
rfernan@ipn.mx

Dirección Web
http://www.polibotanica.mx

POLIBOTÁNICA es una revista indexada en:

CRMCYT - Sistema de Clasificación de Revistas Mexicanas de Ciencia y Tecnología

SciELO - Scientific Electronic Library Online.

Google Académico - Google Scholar.

DOAJ, Directorio de Revistas de Acceso Público.

Dialnet portal de difusión de la producción científica hispana.

REDIB Red Iberoamericana de Innovación y Conocimiento Científico.

LATINDEX, Sistema regional de información en línea para revistas científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal.

PERIODICA, Indice de Revistas Latinoamericanas en Ciencias.

ESTADOS UNIDOS MEXICANOS

Ciencia y Tecnología
Secretaría de Ciencia, Humanidades, Tecnología e Innovación

INSTITUTO **P**OLITÉCNICO **N**ACIONAL

Director General: *Dr. Arturo Reyes Sandoval*
Secretario General: *M. en C. Ismael Jaidar Monter*
Secretario Académico: *M. en E.N.A. María Isabel Rojas Ruíz*
Secretario de Innovación e Integración Social: *M.C.E. Yessica Gasca Castillo*
Secretario de Investigación y Posgrado: *Dra. Martha Leticia Vázquez González*
Secretario de Servicios Educativos: *Dr. Marco Antonio Sosa Palacios*
Secretario de Administración: *M. en C. Javier Tapia Santoyo*
Director de Educación Superior: *Lic. Tomás Huerta Hernández*

ESCUELA **N**ACIONAL DE **C**IENCIAS **B**IOLÓGICAS

Director:
Dr. Isaac Juan Luna Romero
Subdirectora Académica:
Biol. Elizabeth Guarneros Banuelos
Jefe de la Sección de Estudios de Posgrado e Investigación:
Lic. Edgar Gregorio Cárcamo Villalobos
Subdirector de Servicios Educativos e Integración Social:
Biól. Gonzalo Galindo BecerriL

POLIBOTÁNICA, Año 30, No. 61, enero 2026, es una publicación semestral editada por el Instituto Politécnico Nacional, a través de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. Unidad Profesional Lázaro Cárdenas, Prolongación de Carpio y Plan de Ayala s/n, Col. Santo Tomas C.P. 11340 Delegación Miguel Hidalgo México, D.F. Teléfono 57296000 ext. 62331. http://www.herbario.encb.ipn.mx/, Editor responsable: Rafael Fernández Nava. Reserva de Derechos al Uso Exclusivo del Título No. 04-2015-011309001300-203. ISSN impreso: 1405-2768, ISSN digital: 2395-9525, ambos otorgados por el Instituto Nacional del Derecho de Autor. Responsable de la última actualización de este número, Unidad de informática de la ENCB del IPN, Rafael Fernández Nava, Unidad Profesional Lázaro Cárdenas, Prolongación de Carpio y Plan de Ayala s/n, Col. Santo Tomas CP 11340 Delegación Miguel Hidalgo México, D.F.

Las opiniones expresadas por los autores no necesariamente reflejan la postura del editor de la publicación.

POLIBOTÁNICA

Polibotánica
ISSN electrónico: 2395-9525
polibotanica@gmail.com
Instituto Politécnico Nacional
México
http://www.polibotanica.mx

CRIOCONSERVACIÓN DE EXPLANTES FLORALES ENCAPSULADOS DE CACAO (*Theobroma cacao* L.) MEDIANTE DESHIDRATACIÓN Y VITRIFICACIÓN

CRYOPRESERVATION OF ENCAPSULATED FLORAL EXPLANTS OF CACAO (*Theobroma cacao* L.) BY DEHYDRATION AND VITRIFICATION

E. Rodr²guez Olivera, L. Iracheta Donjuan, J.L. Rodr²guez de la O, Avendaño Arrazate, C.H.

CRIOCONSERVACIÓN DE EXPLANTES FLORALES ENCAPSULADOS DE CACAO (*Theobroma cacao* L.) MEDIANTE DESHIDRATACIÓN Y VITRIFICACIÓN
CRYOPRESERVATION OF ENCAPSULATED FLORAL EXPLANTS OF CACAO (*Theobroma cacao* L.) BY DEHYDRATION AND VITRIFICATION

POLIBOTÁNICA
Instituto Politécnico Nacional

Núm. **61**: 273-293 México. Enero 2026
DOI: 10.18387/polibotanica.61.16

Este es un artículo de acceso abierto bajo la licencia Creative Commons 4.0 Atribución-No Comercial (CC BY-NC 4.0 Internacional).

POLIBOTÁNICA

Núm. 61: 273-293 Enero 2026 ISSN electrónico: 2395-9525

Crioconservación de explantes florales encapsulados de cacao (*Theobroma cacao* L.) mediante deshidratación y vitrificación

Cryopreservation of encapsulated floral explants of cacao (*Theobroma cacao* L.) by dehydration and vitrification

Eliud Rodríguez Olivera / eldolivera7@gmail.com
https://orcid.org/0000-0001-8764-7736
Campo Experimental Rosario Izapa del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Km 18, Carretera Tapachula-Cacahoatán, Tuxtla Chico, Chiapas México C.P. 30870.
Departamento de Fitotecnia. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, Texcoco, Estado de México. C.P. 56230.

Leobardo Iracheta Donjuan https://orcid.org/0000-0003-2908-4183
Campo Experimental Rosario Izapa del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Km 18, Carretera Tapachula-Cacahoatán, Tuxtla Chico, Chiapas México C.P. 30870.

José Luis Rodríguez de la O https://orcid.org/0000-0002-2331-9984
Departamento de Fitotecnia. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, Texcoco, Estado de México. C.P. 56230.

Carlos Hugo Avendaño Arrazate https://orcid.org/0000-0003-3591-2280
Campo Experimental Rosario Izapa del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Km 18, Carretera Tapachula-Cacahoatán, Tuxtla Chico, Chiapas México C.P. 30870

Eliud Rodríguez Olivera, Leobardo Iracheta Donjuan Jose Luis Rodríguez de la O Carlos Hugo Avendaño Arrazate

CRIOCONSERVACIÓN DE EXPLANTES FLORALES ENCAPSULADOS DE CACAO (*Theobroma cacao* L.) MEDIANTE DESHIDRATACIÓN Y VITRIFICACIÓN

CRYOPRESERVATION OF ENCAPSULATED FLORAL EXPLANTS OF CACAO (*Theobroma cacao* L.) BY DEHYDRATION AND VITRIFICATION

POLIBOTÁNICA
Instituto Politécnico Nacional

Núm. 61: 273-293. Enero 2026

DOI: 10.18387/polibotanica.61.16

RESUMEN: La aplicación de la técnica de embriogénesis somática en cacao (*Theobroma cacao* L.), dependiente de tejidos florales, enfrenta limitaciones debido a la restringida disponibilidad de flores. En este contexto, la crioconservación de tejidos florales se plantea como una alternativa para conservar y mantener disponible el material necesario para la regeneración *in vitro*, contribuyendo además a la conservación de la diversidad genética de la especie. El objetivo de este estudio fue evaluar la viabilidad de explantes florales sometidos a crioconservación en dos genotipos experimentales de cacao (F9P6 y F19P3), comparando la influencia del tipo de explante y las variantes en las técnicas criogénicas de encapsulación–deshidratación y encapsulación–vitrificación. Se realizaron dos experimentos en los que se evaluaron pétalos, estaminodios y anteras como explantes. En el primer experimento se aplicó la técnica de encapsulación–deshidratación, donde los explantes se precultivaron en medio DKW modificado por un día y se sometieron a dos métodos de deshidratación (flujo laminar y gel de sílice) y dos tiempos de deshidratación (3 y 5 h). En el segundo experimento se utilizó la técnica de encapsulación–vitrificación, en la cual los explantes de ambos genotipos se precultivaron durante cinco días en medio DKW modificado con dos condiciones de sacarosa (sin sacarosa y 0.75 M) y se expusieron a dos soluciones vitrificadoras (PVS2 y PVS4). En ambos experimentos se evaluaron el necrosamiento de tejidos, el incremento de volumen, la formación de callo hasta los 28 días y la viabilidad a los 35 días. Los pétalos presentaron la mayor viabilidad. En encapsulación–deshidratación, los pétalos del genotipo F9P6 mantuvieron el 100% de viabilidad tras 5 h con gel de sílice, mientras que F19P3 lo logró con 5 h en flujo laminar o 3 h con gel de sílice. En encapsulación–vitrificación, los pétalos del genotipo F9P6 conservaron el 100% de viabilidad en medio sin sacarosa con ambos vitrificantes, así como con 0.75 M de sacarosa y PVS4; mientras

que F19P3 presentó 100% de viabilidad con PVS4 sin sacarosa. No se observó incremento de volumen ni formación de callo en los explantes crioconservados; sin embargo, la conservación de su viabilidad confirma la factibilidad del uso de explantes florales encapsulados como material base para estrategias de crioconservación.
Palabras clave: *in vitro*, encapsulación–deshidratación, encapsulación–vitrificación, soluciones PVS.
ABSTRACT: The application of the somatic embryogenesis technique in cacao (*Theobroma cacao* L.), which relies on floral tissues, faces limitations due to the restricted availability of flowers. In this context, the cryopreservation of floral tissues is proposed as an alternative to preserve and maintain the availability of material required for *in vitro* regeneration, while also contributing to the conservation of the species' genetic diversity. The aim of this study was to evaluate the viability of floral explants subjected to cryopreservation in two experimental cacao genotypes (F9P6 and F19P3), comparing the influence of explant type and variations in the cryogenic techniques of encapsulation–dehydration and encapsulation–vitrification. Two experiments were carried out using petals, staminodes, and anthers as explants. In the first experiment, the encapsulation–dehydration technique was applied; explants were precultured for one day in modified DKW medium and dehydrated either by laminar airflow or with silica gel for 3 or 5 hours. In the second experiment, the encapsulation–vitrification technique was used; explants from both genotypes were precultured for five days in modified DKW medium under two sucrose conditions (0 and 0.75 M) and exposed to two vitrification solutions (PVS2 and PVS4). In both experiments, tissue necrosis, volume increase, callus formation up to 28 days, and viability at 35 days were evaluated. Petals exhibited the highest viability. In encapsulation–dehydration, petals of genotype F9P6 maintained 100% viability after 5 hours of dehydration with silica gel, whereas F19P3 achieved the same result after 5 hours by laminar airflow or 3 hours with silica gel. In encapsulation–vitrification, petals of F9P6 retained 100% viability in sucrose-free medium with both vitrification solutions, as well as with 0.75 M sucrose and PVS4; F19P3 showed 100% viability with PVS4 in sucrose-free medium. No increase in volume or callus formation was observed in cryopreserved explants; however, the preservation of viability confirms the feasibility of using encapsulated floral explants as base material for cryopreservation strategies.
Key words: *in vitro*, encapsulation-dehydration, encapsulation-vitrification, PVS solutions.

INTRODUCCIÓN

En las últimas décadas el cultivo de cacao se ha visto en crisis debido a un decrecimiento en la producción desde que iniciaron los brotes de enfermedades severas como la moniliasis, la mancha negra de la mazorca y la escoba de bruja (Aguirre-Medina *et al*., 2010; Hernández-Gómez *et al*., 2015). Estas enfermedades ocasionan del 10 al 25% de pérdidas de la producción mundial de cacao; esto conlleva a que los productores cambien sus plantaciones de cacao por otras alternativas, poniendo en riesgo las variedades genéticas criollas asociada con su cultivo (Aguirre-Medina *et al*., 2010).

Ante esta problemática, el Campo Experimental Rosario Izapa (CERI) del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), en Chiapas, inició un programa de mejoramiento genético en 2004, dirigido a la obtención de clones resistentes a la moniliasis. El resultado fue más de 600 híbridos evaluados en la región del Soconusco Chiapas (Aguirre-Medina *et al*., 2010), de los cuales ha sido posible el registro de nuevas variedades por métodos convencionales de mejoramiento y por selección participativa (Avendaño-Arrazate *et al*., 2018; Solís *et al*., 2015).

Durante el mejoramiento genético convencional, la disponibilidad de flores en campo y la asincronía entre genotipos de interés representa una limitante en un programa de cruzamientos y los enfoques *in vitro*, donde diversas estructuras florales —como pétalos, estaminodios y

anteras— son utilizadas como explantes para inducir embriogénesis somática o establecer líneas embriogénicas haploides (Robles, 2015; Silva *et al*., 2005).

Si bien la crioconservación de polen podría beneficiar directamente los cruzamientos convencionales, durante los programas de mejoramiento genético, la conservación de estructuras florales somáticas tiene un enfoque distinto: preservar material genético de alto valor con la capacidad de regenerar plantas completas a través de procesos biotecnológicos (Ballesteros *et al*., 2024). Por ello, la crioconservación de pétalos, estaminodios y anteras puede convertirse en una herramienta estratégica para la propagación clonal futura de materiales élite, así como para la generación de nuevas variantes genéticas vía embriogénesis somática o transformación genética (Guan *et al*., 2016; Mohammadi *et al*., 2023).

Por lo antes expuesto, en un programa de inducción de embriogénesis somática en cacao, con fines de conservación de la diversidad o creación de variabilidad genética, es importante contar con un número adecuado y constante de flores. Sin embargo, los explantes florales de cacao no pueden ser conservados en condiciones ambientales más de dos días, pues tienden a necrosarse rápidamente, por lo que se ha buscado nuevas técnicas de conservación apoyadas en el cultivo *in vitro* de células y tejidos vegetales, que aseguren la viabilidad del material por tiempo prolongado y permitan su disponibilidad independiente de la temporada de floración, para estudios de conservación y propagación *in vitro*.

La crioconservación es un método de conservación a largo plazo, el cual consiste en llevar un material biológico desde su temperatura fisiológicamente normal a temperaturas ultra bajas: a -196 °C sumergido en nitrógeno líquido, o a -150 °C en la fase de vapor de nitrógeno líquido (Engelmann & González-Arnao, 2013; Mosa *et al*., 2023). A esta temperatura la división celular y los procesos metabólicos cesan, por lo que el material puede permanecer almacenado por tiempo indefinido sin presentar deterioro fisiológico ni alteraciones metabólicas significativas. Sin embargo, el éxito del proceso depende del acondicionamiento que se dé al material vegetal para que resista tanto el congelamiento, como el descongelamiento. Tal acondicionamiento consiste en provocar una deshidratación protectora en las células y tejidos de manera que se evite la formación de cristales de hielo que provocan grandes daños en las membranas de la mayoría de las células (Engelmann & González-Arnao, 2013; Gowthami *et al*., 2025).

Las técnicas de crioconservación podrían ser una alternativa para optimizar el uso de estos tejidos en cualquier estación del año (Adu-Gyamfi *et al*., 2016). Hasta el momento hay estudios sobre la crioconservación de embriones somáticos por el método de encapsulación-deshidratación (Pence, 1991), así como de callos por el método de encapsulación-vitrificación (Pineda-Aguilar *et al*., 2016). Sin embargo, es poco lo que se ha explorado sobre el potencial de conservar otros tipos de explantes de cacao, como los florales, los cuales representan el punto de partida en la inducción de embriogénesis somática y su preservación permitiría disponer de material embriogénico durante todo el año, reduciendo la dependencia de la floración natural y asegurando la continuidad de los programas de propagación *in vitro*.

El presente trabajo tiene como objetivo evaluar la influencia del genotipo, tipo de explante floral y variantes en las técnicas criogénicas de encapsulación-vitrificación y encapsulación-deshidratación en la viabilidad de explantes florales de cacao sometidos a crioconservación.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los experimentos se llevaron a cabo en el Laboratorio de Biotecnología del Campo Experimental Rosario Izapa del INIFAP en Tuxtla Chico, Chiapas, México. El material biológico utilizado como explantes fue: pétalos, estaminodios y anteras, de los híbridos interclonales F9P10 y F10P3, producto del cruzamiento de cacaos forasteros resistentes a la moniliasis, con cacaos criollos de calidad (Iracheta-Donjuan *et al*., 2017). Previamente, botones florales sin daños (cerrados), con 5 mm de diámetro y 5 a 7 mm de longitud, fueron etiquetados en árboles en campo y se les asperjó durante tres días con fungicida Amistar®, cuyo ingrediente activo es la azoxistrobina (50%, 1.5 g L^{-1}), un compuesto de acción sistémica y de contacto que inhibe la respiración mitocondrial de los hongos fitopatógenos (Bartlett *et al*., 2002).

Los botones se llevaron al laboratorio en un recipiente con algodón humedecido con una solución antioxidante-fungicida (Ácido cítrico 0.15 g L^{-1} + ácido ascórbico 0.1 g L^{-1} + sacarosa 30 g L^{-1} + Amistar® 1.5 g L^{-1}). Enseguida se procedió a eliminar impurezas superficiales de los botones florales: estos se colocaron en una canastilla metálica y se lavaron con una solución de detergente líquido comercial y agua corriente durante 2 min, seguido de un enjuague con el flujo de agua de grifo por 2 min. Después, los botones en la canastilla se sumergieron en una solución de *Amistar®* (1.5 g L^{-1}) esterilizada en autoclave (120 °C con 1.1 kg cm^{-2} de presión, por 20 min) durante 10 min con agitación constante.
La desinfección se realizó en campana de flujo laminar siguiendo el protocolo de (Iracheta-Donjuan *et al*., 2017), consistente en lavados sucesivos en una solución de hipoclorito de sodio al 2 % (Cloralex®), durante 20 min, seguidos de tres enjuagues con agua destilada esterilizada en autoclave. Finalmente, los botones se transfirieron a una solución antioxidante de ácido cítrico (0.15 g L^{-1}), ácido ascórbico (0.1 g L^{-1}) y sacarosa (30 g L^{-1}), esterilizada en autoclave. Los botones permanecieron en esta solución durante todo el tiempo que duró la obtención de los explantes.
Para el establecimiento y mantenimiento se utilizó el medio de cultivo de inducción de callo embriogénico DKW (Driver & Kuniyuki, 1984) modificado por Iracheta-Donjuan *et al*. (2019), con la adición de 0.25 mg L^{-1} de Kinetina, 1.0 mg L^{-1} de ácido 2,4-diclorofenoxiacético, suplementado con 30 g L^{-1} de glucosa, con pH de 5.7 y gelificado con 3.0 g L^{-1} de Gelrite (Sigma-Aldric®).

Experimento 1: Crioconservación por el método de encapsulación-deshidratación
Los explantes se precultivaron en medio DKW modificado durante un día, bajo condiciones asépticas, previo a la aplicación de los tratamientos de crioconservación. Este paso permitió disponer oportunamente del material vegetal para su posterior encapsulación y tratamiento criogénico.

Metodología (Figura 1): Para la encapsulación, los explantes previamente cultivados se colocaron dentro de una campana de flujo laminar en láminas de aluminio esterilizados en autoclave, de 10 × 40 mm con cinco cavidades a manera de crioplacas. En cada cavidad se adicionaron de 6 a 10 µL de alginato de sodio al 3 % (esterilizado), según Marassi *et al*. (2006), y los explantes se recubrieron con un volumen similar de la misma solución. Posteriormente, se agregaron 6 µL de cloruro de calcio (100 mM, esterilizado) para inducir la gelificación del alginato, y las crioplacas se dejaron reposar dentro de la campana de flujo laminar durante 15 min para completar la encapsulación. Después, las crioplacas (conteniendo los tejidos encapsulados), se sumergieron en una solución de carga SC (sacarosa 0.4 M + glicerol 2 M) durante 30 min, de acuerdo con Matsumoto & Niino (2017) (Figura 1B). En total se llenaron 48 crioplacas, con cinco explantes cada una (ocho crioplacas de cada tipo de explante por genotipo).
Posteriormente, las crioplacas se extrajeron y escurrieron sobre cajas Petri con doble papel filtro esterilizado. Luego, las crioplacas fueron sometidas a diferentes métodos y tiempos de deshidratación: 24 crioplacas (4 crioplacas de cada explante por genotipo) se colocaron sobre cajas Petri dentro de un desecador con gel de sílice, 12 crioplacas (2 crioplacas de cada explante por genotipo) se dejaron por 3 h y las otras 12 por 5 h (Zhang *et al*., 2017) (Figura 1C); mientras que las 24 crioplacas restantes se dejaron directamente expuestas al flujo de la campana, 12 crioplacas (2 crioplacas de cada explante por genotipo) se dejaron expuesta por 3 h y las otras 12 crioplacas por 5 h) (Figura 1D). Una vez completada la deshidratación, las crioplacas se colocaron individualmente dentro de crioviales (Figura 1E), estos se fijaron cerrados en las criocañas y se sumergieron en nitrógeno líquido durante 1 h (Figura 1F). Al término del tiempo, las crioplacas se rescataron de los crioviales sumergidos en nitrógeno líquido y se pasaron a crioviales con 2 mL de solución de calentamiento (sacarosa 1.0 M, a temperatura ambiente), se taparon y se dejaron en temperatura ambiente a 25 °C durante 15 min (Figura 1G). Nuevamente, las crioplacas se escurrieron en cajas Petri con doble papel filtro.
Para la recuperación y establecimiento de los explantes, las crioplacas se colocaron en caja Petri se extrajeron los explantes encapsulados de las crioplacas y luego se rescataron de las cápsulas

Núm. 61: 273-293 Enero 2026 ISSN electrónico: 2395-9525

(Figura 1H), para enseguida sembrarlos en medio DKW modificado, se establecieron 10 explantes por tratamiento.

Figura 1. Proceso de encapsulación-deshidratación. Encapsulado (A), inmersión en SC (B), deshidratación con gel de sílice (C), deshidratación con flujo laminar (D), crioplaca con explantes en criovial (E), inmersión en nitrógeno líquido (F), descongelamiento (G) y recuperación de explantes para siembra (H).
Figure 1. Encapsulation (A), immersion in loading solution (B), dehydration with silica gel (C), dehydration under laminar airflow (D), cryoplate containing explants placed in a cryovial (E), immersion in liquid nitrogen (F), thawing (G), and recovery of explants for *in vitro* culture (H).

Diseño experimental
Veinticuatro tratamientos fueron establecidos, con 10 repeticiones cada uno, en los que un explante de pétalo, estaminodio o antera correspondió a una repetición. El total de tratamientos se obtuvo a partir de la interacción de dos genotipos, tres tipos de explantes, dos métodos de deshidratación y dos tiempos de deshidratación. Adicionalmente se establecieron seis blancos, los cuales consistieron en dos genotipos y tres tipos de explantes encapsulados, pero estos solo se sometieron a la SC por 30 min y se establecieron en medio DKW modificado sin pasar por el resto del proceso.

Experimento 2: Crioconservación por el método de encapsulación-vitrificación
Los explantes se precultivaron en medio DKW modificado con dos condiciones de sacarosa (sin sacarosa y 0.75 M) durante cinco días, con el objetivo de evaluar el efecto de la acumulación de carbohidratos sobre la recuperación de los explantes crioconservados

Metodología (Figura 2): Los explantes se encapsularon (Figura 2A) como fue descrito anteriormente, una vez que lo explantes se encontraran en las crioplacas, se sumergieron en la solución de carga SC (Figura 2B) como se especifica anteriormente. En total se llenaron 48 crioplacas con 5 explantes cada una (8 crioplacas de cada tipo de explante por genotipo).
Posteriormente, las crioplacas se extrajeron, escurrieron como se describe anteriormente y 24 crioplacas (dos crioplacas de cada explante por genotipo y condición de sacarosa en precultivo) se sumergieron en el crioprotector PVS2 [Glicerol 30%+ etilenglicol 15% + DMSO (Dimetilsulfóxido) 15% + sacarosa 0.4 M], por 15 min y las 24 crioplacas restantes se sumergieron en PVS4 (Glicerol 35 %+ etilenglicol 20 % + sacarosa 0.6 M), por el mismo tiempo (Pineda-Aguilar *et al*., 2016). Al término del tiempo, las crioplacas se sacaron y se escurrieron nuevamente.

Núm. 61: 273-293 Enero 2026 ISSN electrónico: 2395-9525

Después del tratamiento con el crioprotector, las crioplacas se colocaron en crioviales, estos se fijaron a las criocañas y se sumergieron en nitrógeno líquido 1 h. Luego, las criocañas se sacaron de nitrógeno líquido, y se retiraron los crioviales, las crioplacas se pasaron a crioviales con 2 ml de solución de calentamiento, se taparon y se dejaron reposar 15 min.
Las crioplacas se escurrieron en una caja Petri con doble papel filtro. Finalmente, las crioplacas se colocaron en caja Petri y se recuperaron los explantes de las cápsulas, los cuales se sembraron en medio de cultivo MI (Figura 2). Se colocaron cinco explantes del mismo tipo por caja.

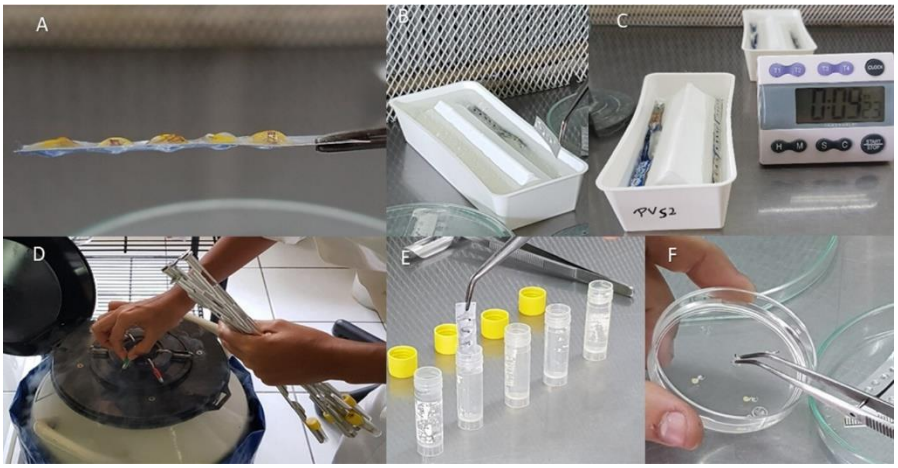

Figura 2. Proceso de encapsulación-vitrificación. Encapsulado (A), Inmersión en SC (B), inmersión en crioprotector PVS2 o PVS4 (C), inmersión en nitrógeno líquido (D), solución de calentamiento (E) y recuperación y establecimiento de explantes (F).
Figure 2. Encapsulation-vitrification process. Encapsulation (A), immersion in loading solution (B), immersion in cryoprotectant solution PVS2 or PVS4 (C), immersion in liquid nitrogen (D), warming solution (E), and recovery and establishment of explants (F).

Diseño Experimental
En total se establecieron veinticuatro tratamientos, con 10 repeticiones cada uno, en los que un explante individual de pétalo, estaminodio o antera correspondió a una repetición. Este número se obtuvo a partir de la interacción entre los factores, dos genotipos, tres tipos de explantes, dos concentraciones de sacarosa en precultivo y dos crioprotectores. Adicionalmente se establecieron seis tratamientos testigos, denominados blancos, los cuales consistieron en los dos genotipos y tres tipos de explantes, estos se extrajeron y sembraron en medio DKW modificado un día antes del establecimiento final y solo se sometieron a la solución SC por 30 minutos y se establecieron en medio DKW modificado sin pasar por el resto del proceso.
Para ambos experimentos, los tratamientos y repeticiones se incubaron de acuerdo con un diseño experimental completamente a alzar con arreglo factorial. Los explantes se mantuvieron en un cuarto de incubación bajo condiciones controladas de temperatura a 25 ± 1 °C y en oscuridad total. El periodo de incubación duró 28 días, con evaluaciones a los 3, 7, 14 y 28 días después del establecimiento.
Las variables respuesta consistieron en: 1) Necrosamiento, determinado visualmente con base en el cambio de coloración de la superficie adaxial del explante; 2) Incremento de volumen, evaluado de forma cualitativa mediante la comparación visual del tamaño o volumen general respecto al tamaño inicial al momento de la siembra, considerándose incremento cuando el explante mostraba expansión evidente de tejidos o abultamiento; 3) Explantes con Callo, se consideraron aquellos explantes que presentaron la formación de un conglomerado amorfo de células no diferenciadas, de textura friable o compacta, visible en cualquier región del explante; 4) Viabilidad, evaluada mediante tinción diferencial con sales de tetrazolio al 1.0 % y azul de Evans

al 0.25 %. Se consideraron viables los explantes que mostraron tinción parcial o total con el reactivo de tetrazolio (coloración rosada o rojiza), mientras que los tejidos muertos se tornaron azulados con el colorante de Evans, la evaluación de esta última variable se realizó a los 35 días después del establecimiento.

Análisis estadísticos

Para ambos experimentos, se realizó un análisis de varianza y comparación de medias, utilizando la prueba de Tukey con un nivel de significancia de 0.05, mediante el paquete estadístico SAS® 9.3. Los datos fueron transformados para darles una distribución normal, para ello se empleó la fórmula "$\sqrt{x+1}$", donde x es el valor observado (Castañeda, 1990).

RESULTADOS

Experimento 1: Crioconservación por el método de encapsulación-deshidratación

Se realizó un ANOVA y comparación de medias para las variables de necrosamiento y viabilidad a los 28 días después del establecimiento (Tabla 1), ya que no se observó incremento de volumen ni explantes con callo en los explantes crioconservados; a diferencia de los blancos (Tabla 2), de quienes se observó que las anteras fueron los explantes más afectados con el cultivo *in vitro*, toda vez que presentaron el mayor grado de necrosamiento (53.5 y 56.5 %), menor incremento de volumen (20 y 30 %) y menor producción de callo (0 y 10 %), respecto al resto de explantes. Y únicamente las anteras del genotipo F9P6 presentaron un 50 % de viabilidad. Por otra parte, si bien los estaminodios de ambos genotipos presentaron menor porcentaje de necrosamiento (0 y 17 %), fueron los explantes de pétalo los que indujeron mayor producción de callo (78 y 90 %).

Tabla 1. Niveles de Necrosamiento y supervivencia de explantes florales de dos genotipos de cacao crioconservados, sometidos a dos tiempos y métodos de deshidratación. Promedio a los 28 días después del establecimiento

Table 1. Necrosis and survival levels of floral explants from two cryopreserved cacao genotypes subjected to two dehydration methods and durations. Mean values at 28 days after establishment

Tratamientos Genotipo/Explante/Deshidratación/Tiempo	Necrosamiento (%)	Viabilidad† (%)
T1: F9P6/P/Flujo/3h	80.0 ab††	80.0 ab
T2: F9P6/P/Flujo/5h	81.0 ab	0.0 c
T3: F9P6/P/SG/3h	74.0 ab	80.0 ab
T4: F9P6/P/SG/5h	83.0 ab	100.0 a
T5: F9P6/E/Flujo/3h	30.0 cde	0.0 c
T6: F9P6/E/Flujo/5h	21.0 de	0.0 c
T7: F9P6/E/SG/3h	26.5 de	0.0 c
T8: F9P6/E/SG/5h	25.0 de	0.0 c
T9: F9P6/A/ Flujo/3h	45.5 bcde	0.0 c
T10: F9P6/A/ Flujo/5h	30.5 cde	0.0 c
T11: F9P6/A/ SG/3h	21.5 de	0.0 c
T12: F9P6/A/SG/5h	35.0 cde	0.0 c
T13: F19P3/P/ Flujo/3h	71.0 ab	70.0 b
T14: F19P3/P/ Flujo/5h	77.0 ab	100.0 a
T15: F19P3/P/ SG/3h	82.0 ab	100.0 a
T16: F19P3/P/SG/5h	84.0 a	0.0 c
T17: F19P3/E/ Flujo/3h	59.0 abc	0.0 c
T18: F19P3/E/ Flujo/5h	55.0 abcd	0.0 c
T19: F19P3/E/ SG/3h	31.0 cde	0.0 c

T20: F19P3/E/SG/5h	30.5 cde	0.0 c
T21: F19P3/A/ Flujo/3h	32.0 cde	20.0 c
T22: F19P3/A/ Flujo/5h	22.5 e	0.0 c
T23: F19P3/A/ SG/3h	30.5 cde	0.0 c
T24: F19P3/A/SG/5h	33.0 cde	0.0 c
CV	24.86	6.08

C.V.= Coeficiente de variación datos transformados ($\sqrt{x+1}$). † La viabilidad se evaluó a los 35 días. †† Medias por columna y factor de estudio con distintas letras son significativamente diferentes (Tukey ≤0.05). P=Pétalo; E=Estaminodio; A= Anteras; Flujo= Deshidratación por flujo laminar; SG= Deshidratación por gel de sílice; 3h= 3 horas de deshidratación; 5h= 5 horas de deshidratación.

Tabla 2. Niveles de Necrosamiento, incremento de volumen, explantes con callo y supervivencia de explantes florales de dos genotipos de cacao no crioconservados (Blancos). Promedio a los 28 días después del establecimiento.
Table 2. Necrosis levels, volume increase, explants with callus, and survival of floral explants from two non-cryopreserved (Blank) cacao genotypes. Mean values at 28 days after *in vitro* establishment.

Blancos (Genotipo/Explante)	Necrosamiento (%)	Incremento de volumen (%)	Explantes con callo (%)	Viabilidad† (%)
B1: F9P6/P	25.0 abc	89.0 a	78.0 a	100.0 a
B2: F9P6/E	0.0 c	100.0 a	40.0 ab	100.0 a
B3: F9P6/A	53.5 a	20.0 b	0.0 b	50.0 b
B4: F19P3/P	40.0 ab	100.0 a	90.0 a	100.0 a
B5: F19P3/E	17.0 bc	60.0 ab	40.0 ab	100.0 a
B6: F19P3/A	56.5 a	30.0 b	10.0 b	100.0 a
CV	31.20	11.81	13.82	23.73

C.V.= Coeficiente de variación datos transformados ($\sqrt{x+10}$ para Necrosamiento y $\sqrt{x+1}$ para incremento de volumen y explantes con callo). † La viabilidad se evaluó a los 35 días. †† Medias por columna y factor de estudio con distintas letras son significativamente diferentes (Tukey P≤0.05). P=Pétalo; E=estaminodio; A= anteras.

Necrosamiento

En el análisis factorial, la interacción entre los factores no fue significativa para la necrosis, mientras que para la viabilidad si presentó efectos significativos; no obstante, en ambas variables, el efecto simple del factor tipo de explante fue el que contribuyó más a la variabilidad del experimento. Para el factor genotipo, a los 28 días de cultivo, los explantes de ambos genotipos presentaron porcentajes desde 21 a 84%, el material del genotipo F9P6 presentó menos oscurecimiento durante todo el cultivo (Figura 3-A). En cuanto al factor tipo de explante (Figura 3-B), los estaminodios y anteras resistieron mejor el necrosamiento (29.5% y 30.06% respectivamente) que los pétalo (70.15%).

Núm. 61: 273-293 Enero 2026 ISSN electrónico: 2395-9525

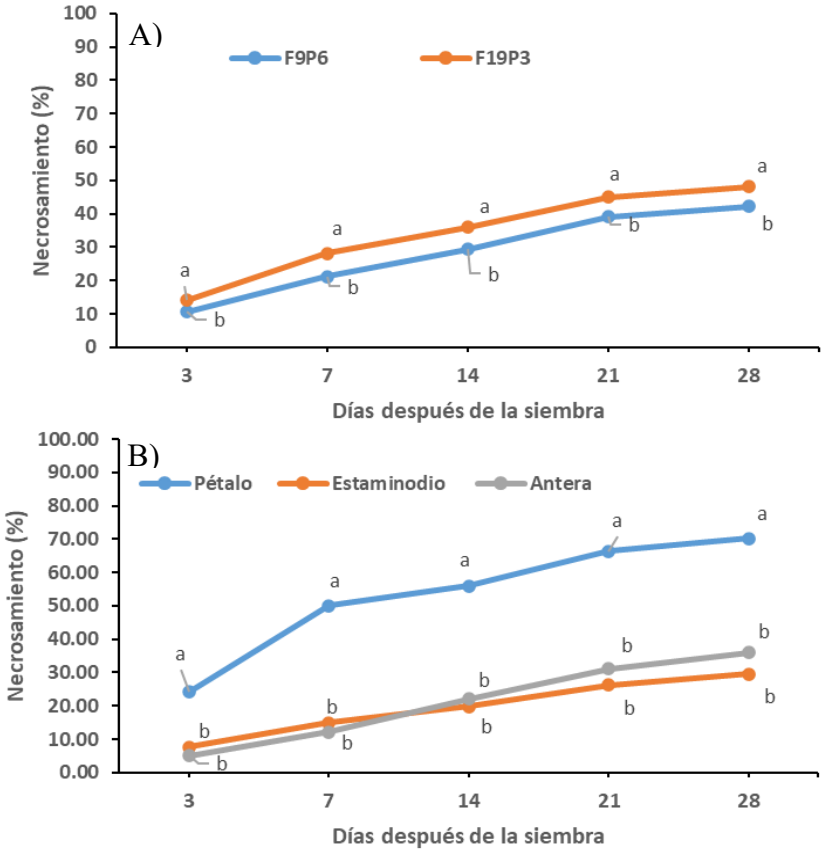

Figura 3. Porcentaje de necrosamiento promedio de los explantes crioconservados, para los dos genotipos de *Theobroma cacao* (A) y los tres tipos de explantes florales (B). Letras distintas por fecha de evaluación indican diferencias significativas (Tukey P≤0.05). Agrupamientos estadísticos de datos promedio a los 28 días con base a la transformación $\sqrt{x+1}$.

Figure 3. Percentage of necrosis in two *Theobroma cacao* genotypes (A) and in three types of floral explants (B) under the best-performing treatments. Different letters for each evaluation date indicate significant differences (Tukey, P ≤ 0.05). Statistical groupings of mean values at 28 days based on $\sqrt{x+1}$ transformation.

El mejor tratamiento para el genotipo F9P6 correspondió al T3 (pétalos deshidratados con gel de sílice) y para el F19P3 el T13 (pétalos deshidratados en flujo), en ambos casos deshidratados durante 3 h (Tabla 1). Sin embargo, al comprar ambos tratamientos con sus respectivos blancos durante los 28 días de cultivo, los tratamientos T3 y T13 mostraron una acelerada necrosis durante los primeros 14 días, la cual tendió a estabilizarse en valores cercanos al 70% a partir de los 21 días (Figura 4). En general, los explantes sometidos a deshidratación presentaron mayor necrosamiento que los blancos, a excepción de las anteras, donde el necrosamiento de los blancos fue mayor que los tratamientos (Tabla 1 y 2).

Núm. 61: 273-293 Enero 2026 ISSN electrónico: 2395-9525

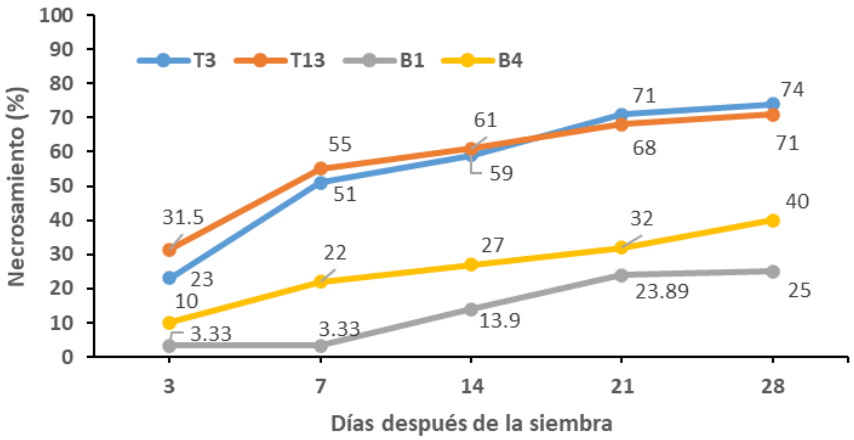

Figura 4. Porcentaje de necrosamiento de pétalos de mejores tratamientos con respecto a la variable necrosamiento, en contraste con blancos. T3: pétalos del genotipo F9P6 deshidratados con gel de sílice por 3 h; T13: pétalos del genotipo F19P3 deshidratados en flujo por 3 h; B1: pétalos del genotipo F9P6; B4: pétalos del genotipo F19P3.
Figure 4. Percentage of necrosis in petals under the best-performing treatments for the necrosis variable, in comparison with controls. T3: Petals of genotype F9P6 dehydrated with silica gel for 3 h; T13: Petals of genotype F19P3 dehydrated by airflow for 3 h; B1: Petals of genotype F9P6; B4: Petals of genotype F19P3.

Los explante de los blancos (sin tratamiento de deshidratación) fueron los únicos que presentaron un incremento de volumen (Tabla 2), siendo los explantes de pétalo y estaminodios los que expresaron mayor incremento de volumen (18 y 16%, respectivamente), no se observó diferencias significativas entre genotipos (Figura 5).

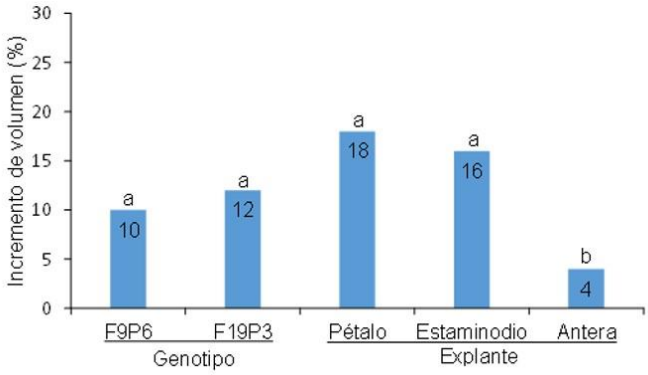

Figura 5. Incremento de volumen por genotipo (F9P6 y F19P3) y tipo de explante (pétalos, estaminodios y anteras) de *Theobroma cacao*, en blancos. Letras distintas por factor indican diferencias significativas (Tukey P≤0.05). Agrupamientos estadísticos de datos promedio a los 28 días con base a la transformación √(x+1).
Figure 5. Volume increase by genotype (F9P6 and F19P3) and type of explant (petals, staminodes and anthers) of *Theobroma cacao*, in blanks. Different letters per factor indicate significant differences (Tukey's test, P≤0.05). Statistical groupings based on mean values at 28 days using the √(x+1) transformation.

Explantes con callo

Los explantes blancos fueron los únicos que indujeron callo. Se observó que ambos genotipos presentaron una respuesta similar para esta variable. Los explantes de pétalo fueron los que expresaron mayor formación de callo (14 %), seguido de los estaminodios (6%), mientras que las anteras no presentaron incremento de volumen por formación de callo (Figura 6).

Núm. 61: 273-293 Enero 2026 ISSN electrónico: 2395-9525

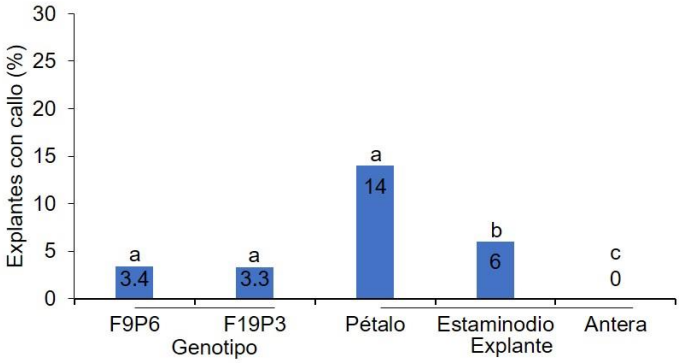

Figura 6. Explantes con callo de acuerdo con el genotipo (F9P6 yF19P3) y tipo de explantes (pétalos, estaminodios y anteras) de de *Theobroma cacao*, en blancos. Letras distintas por factor indican diferencias significativas (Tukey P≤0.05). Agrupamientos estadísticos de datos promedio a los 28 días con base a la transformación √(x+1).
Figure 6. Explants with callus according to the genotype (F9P6 and F19P3) and type of explants (petals, staminodes and anthers) of *Theobroma cacao*, in blanks. Different letters per factor indicate significant differences (Tukey's test, P≤0.05). Statistical groupings based on mean values at 28 days using the √(x+1) transformation.

Viabilidad

La prueba de viabilidad a los 35 días reveló tejido aún vivo en pétalos y anteras de los tratamientos, siendo los pétalos los que presentan porcentajes de hasta 100 % de sobrevivencia (Cuadro 1).

No obstante, los altos índices de necrosamiento en los explantes, la prueba demostró la viabilidad en pétalos y anteras, a los 35 días después de ser recuperados del nitrógeno líquido, por lo que la encapsulación y deshidratación permitieron la viabilidad del explante, aunque se notan ciertas partes del explante muertas o zonas teñidas (Figura 7).

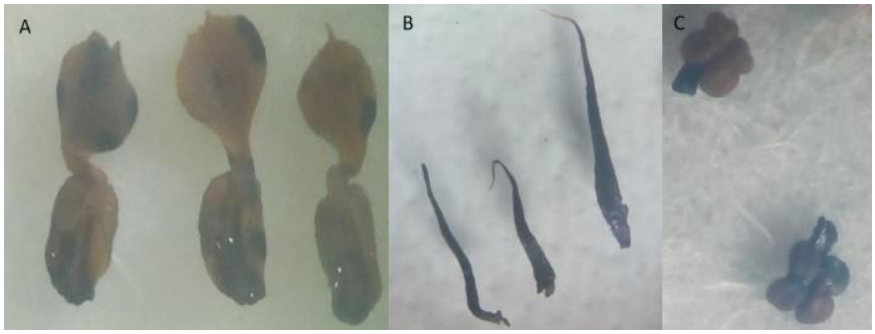

Figura 7. Prueba de viabilidad en explantes crioconservados teñidos con azul de Evans. Pétalos (A), Estaminodios (B) y Anteras (C).
Figure 7. Viability test on cryopreserved explants stained with Evans blue. Petals (A), staminodes (B), and anthers (C).

Experimento 2: Crioconservación por el método de encapsulación-vitrificación

Se realizó un ANOVA y comparación de medias únicamente para las variables de necrosamiento y viabilidad a los 28 días (Tabla 3), ya que solo los blancos presentaron incremento de volumen y callo. Se observó que, si bien no hubo diferencias en el porcentaje de necrosamiento (25.63 – 54.44 %), los pétalos y estaminodios presentaron mayor incremento de volumen (100 %) que las anteras (50 y 56%); sin embargo, no hubo diferencia estadística en la producción de callo (25 - 80%). Todos los explantes de los blancos presentaron 100 % de viabilidad (Tabla 4).

Tabla 3. Niveles de necrosamiento y viabilidad en explantes florales de dos genotipos de cacao, sometidos a precultivo con y sin sacarosa y dos soluciones crioprotectoras. Promedio de niveles de factores a los 28 dds
Table 3. Necrosis levels and viability in floral explants of two cacao genotypes subjected to preculture with or without sucrose and two cryoprotectant solutions. Mean factor levels at 28 days after culture initiation

Tratamientos Genotipo/Explante/Deshidratación/Tiempo	Necrosamiento (%)	Viabilidad† (%)
T1: F9P6/P/PreC0.0/PVS2	89.00 a††	100.0 a
T2: F9P6/P/PreC0.0/PVS4	85.00 a	100.0 a
T3: F9P6/P/PreC0.75/PVS2	86.00 a	80.0 a
T4: F9P6/P/PreC0.75/PVS4	89.00 a	100.0 a
T5: F9P6/E/PreC0.0/PVS2	63.00 abcd	0.0 b
T6: F9P6/E/PreC0.0/PVS4	50.00 bcdef	0.0 b
T7: F9P6/E/PreC0.75/PVS2	45.50 def	0.0 b
T8: F9P6/E/PreC0.75/PVS4	60.00 abcde	0.0 b
T9: F9P6/A/PreC0.0/PVS2	34.50 ef	0.0 b
T10: F9P6/A/PreC0.0/PVS4	51.00 cdef	0.0 b
T11: F9P6/A/PreC0.75/PVS2	46.00 def	0.0 b
T12: F9P6/A/PreC0.75/PVS4	56.88 abcdef	0.0 b
T13: F19P3/P/PreC0.0/PVS2	73.50 abcd	100.0 a
T14: F19P3/P/PreC0.0/PVS4	81.11 abc	80.0 a
T15: F19P3/P/PreC0.75/PVS2	83.00 ab	80.0 a
T16: F19P3/P/PreC0.75/PVS4	84.00 ab	20.0 b
T17: F19P3/E/PreC0.0/PVS2	60.50 abcde	0.0 b
T18: F19P3/E/PreC0.0/PVS4	69.00 abcd	0.0 b
T19: F19P3/E/PreC0.75/PVS2	45.00 def	0.0 b
T20: F19P3/E/PreC0.75/PVS4	55.50 abcde	0.0 b
T21: F19P3/A/PreC0.0/PVS2	50.00 def	0.0 b
T22: F19P3/A/PreC0.0/PVS4	51.00 cdef	0.0 b
T23: F19P3/A/PreC0.75/PVS2	28.50 f	0.0 b
T24: F19P3/A/PreC0.75/PVS4	50.50 cdef	0.0 b
CV	16.51	6.82

C.V.= Coeficiente de variación datos transformados ($\sqrt{x+1}$). † La viabilidad se evaluó a los 35 dds. †† Medias por columna y factor de estudio con distintas letras son significativamente diferentes (Tukey P≤0.05). G1: genotipo F9P6; G2: genotipo F19P3; P: pétalo; E: estaminodio; A: Antera; PreC0.0: precultivo sin sacarosa; PreC0.75: precultivo con sacarosa 0.75 M; PVS2: Crioprotector PVS2; PVS4: Crioprotector PVS4.

Tabla 4. Niveles de Necrosamiento, incremento de volumen, explantes con callo y supervivencia de explantes florales de dos genotipos de cacao no crioconservados (Blancos). Promedio a los 28 días después del establecimiento
Table 4. Necrosis levels, volume increase, explants with callus, and survival of floral explants from two non-cryopreserved cacao genotypes (Blanks). Mean values at 28 days after establishment

Blancos (Genotipo/Explante)	Necrosamiento (%)	Incremento de volumen (%)	Explantes con callo (%)	Viabilidad† (%)
B1: F9P6/P	42.50 a††	100.0 a	50.0 a	100.0 a
B2: F9P6/E	26.50 a	100.0 a	80.0 a	100.0 a
B3: F9P6/A	54.44 a	56.0 b	33.0 a	100.0 a
B4: F19P3/P	41.50 a	100.0 a	50.0 a	100.0 a
B5: F19P3/E	31.00 a	100.0 a	40.0 a	100.0 a
B6: F19P3/A	25.63 a	50.0 b	25.0 a	100.0 a
CV	25.51	8.98	17.14	0.0

C.V.= Coeficiente de variación datos transformados ($\sqrt{x+10}$ para Necrosamiento y $\sqrt{x+1}$ para incremento de volumen y explantes con callo). † La viabilidad se evaluó a los 35 después del establecimiento. †† Medias por columna y factor de estudio con distintas letras son significativamente diferentes (Tukey P≤0.05). P=Pétalo; E=estaminodio; A= anteras.

Necrosamiento

De acuerdo con el análisis factorial, a lo largo de 28 días, el necrosamiento aumentó progresivamente en ambos genotipos, y no se apreciaron diferencias significativas entre ellos (Figura 8-A). En el caso del factor tipo de explante, éstos presentaron altos porcentajes de necrosamiento (Tabla 3), no obstante, los pétalos fueron los más afectados desde el inicio hasta el final de experimento (76%) (Figura 8-B).

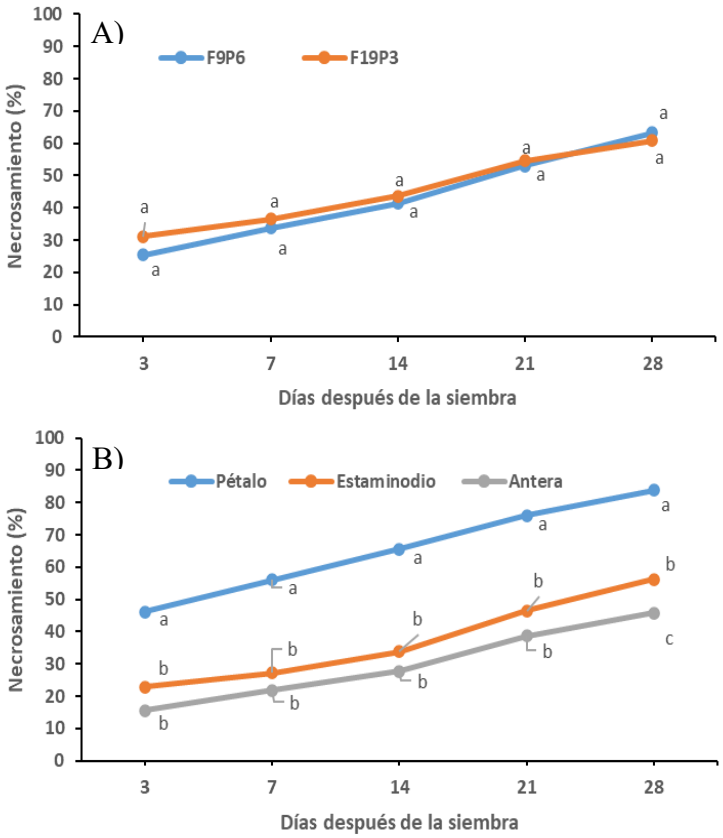

Figura 8. Porcentaje de necrosamiento en los genotipos F9P6 y F19P3 de *Theobroma cacao* (A) y en los pétalos, estaminodios y anteras (B). Letras distintas por fecha de evaluación indican diferencias significativas (Tukey P≤0.05). Agrupamientos estadísticos de datos promedio a los 28 días con base a la transformación $\sqrt{x+1}$.

Figure 8. Percentage of necrosis in two *Theobroma cacao* genotypes (A) and in three types of floral explants (B). Different letters for each evaluation date indicate significant differences (Tukey, P ≤ 0.05). Statistical groupings of mean values at 28 days based on $\sqrt{x+1}$ transformation.

Los tratamientos de ambos genotipos que incluyen a los explantes de pétalos, fueron los que presentaron los mayores niveles de necrosamiento (73 a 89%) y no presentaron diferencias estadísticas entre ellos. No obstante, fueron los únicos tratamientos que mostraron viabilidad en parte de sus tejidos (Tabla 3). Entre estos tratamientos, el T2 (Pétalos de F9P6 con precultivo sin

sacarosa y PVS4 como crioprotector) y T13 (Pétalos de F19P3 con precultivo sin sacarosa y PVS2 como crioprotector), podrían ser seleccionados, toda vez que presentan numéricamente un valor menor de necrosis y 100% de viabilidad. En este caso particular, al ser comprados ambos con los respectivos blancos (B1 y B4) durante 28 días de cultivo (Figura 9), se observó que los blancos presentaron en cada fecha de evaluación aproximadamente la mitad de necrosis que T2 y T13. De igual manera, tanto para los tratamientos T2 y T13, así como para los blancos, el nivel de necrosamiento se incrementó cerca del doble desde el inicio del cultivo hasta el final de la evaluación (Figura 9).

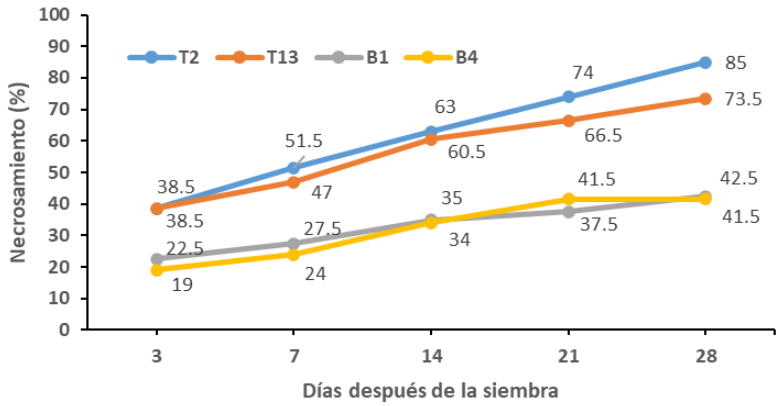

Figura 9. Porcentaje promedio de necrosamiento de Pétalos en los mejores tratamientos, respecto a la variable necrosamiento, en contraste con blancos. T2: Pétalos de F9P6 con sacarosa 0.0 M y PVS4 como crioprotector; T13: Pétalos de F19P3 sin sacarosa y PVS2 como crioprotector; B1: Pétalos de F9P6: B4: Pétalos de F19P3.
Figure 9. Figure 9. Mean percentage of petal necrosis in the best treatments, based on the necrosis variable, in comparison with blanks. T2: Petals of F9P6 with 0.0 M sucrose and PVS4 as cryoprotectant; T13: Petals of F19P3 with 0.0 M sucrose and PVS2 as cryoprotectant; B1: Petals of F9P6; B4: Petals of F19P3.

Por otro lado, no se detectaron diferencias significativas para necrosamiento entre los tratamientos con estaminodios y anteras como explantes. Si bien en el caso de los explantes de estaminodio y anteras se identificaron tratamientos con bajo porcentaje de necrosamiento (T7, T19 para estaminodio y T9, T23 para anteras), en ningún caso los explantes fueron viables (Tabla 3).

Incremento de volumen

Los explantes crioconservados no presentaron un incremento de volumen luego de ser crioconservados, no así los blancos, en los que sí se apreció un incremento de volumen (Tabla 4). El análisis factorial permitió identificar que, para los tratamientos blanco, ambos genotipos expresaron el mismo nivel de incremento de volumen, donde los pétalos y estaminodios fueron más reactivos que las anteras (Figura 10).

Núm. 61: 273-293 Enero 2026 ISSN electrónico: 2395-9525

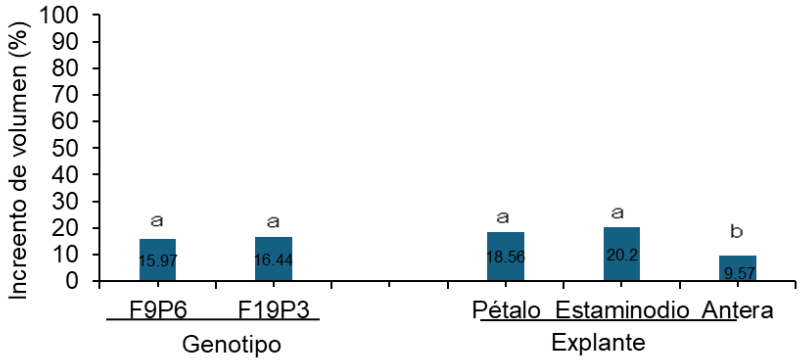

Figura 10. Incremento de volumen en tres explantes florales (pétalos, estaminodios y anteras) de dos genotipos (F9P6 y F19P3) de *Theobroma cacao*, en blancos. Letras distintas por factor indican diferencias significativas (Tukey P≤0.05). Agrupamientos estadísticos de datos promedio a los 28 días con base en la transformación √(x+1).
Figure 10. Volume increase in three floral explants (petals, staminodes and anthers) of two genotypes (F9P6 and F19P3) of *Theobroma cacao*, in blanks. Different letters for each factor indicate significant differences (Tukey, P ≤ 0.05). Statistical groupings of mean values at 28 days based on √(x+1) transformation.

Explantes con callo

En los explante crioconservados no se observó la presencia de callo. Solo los blancos formaron callo e incrementaron su volumen, en ambos genotipos, expresando una respuesta similar. Nuevamente la reactividad de los pétalos y estaminodios fue similar y superior a las anteras (Figura 11).

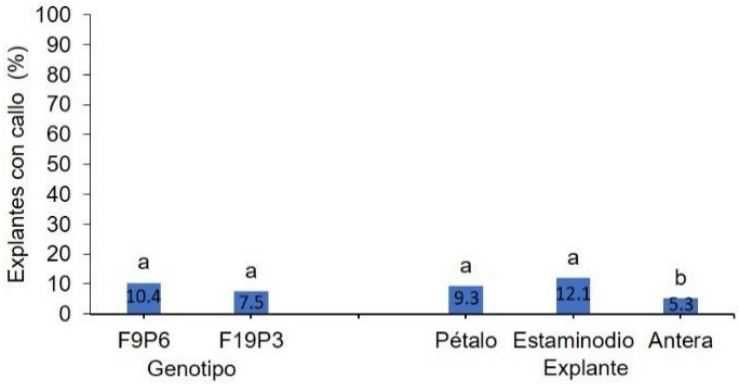

Figura 11. Explantes con callo en tres explantes florales (pétalos, estaminodios y anteras) de dos genotipos (F9P6 y F19P3) de *Theobroma cacao*, en blancos. Letras distintas por factor indican diferencias significativas (Tukey P≤0.05). Agrupamientos estadísticos de datos promedio a los 28 días con base a la transformación √(x+1).
Figure 11. Explants with callus on three floral explants (petals, staminodes and anthers) of two genotypes (F9P6 and F19P3) of *Theobroma cacao*, in blanks. Means for each factor with different letters different letters differ significantly (Tukey test, P ≤ 0.05). Statistical groupings based on mean values at 28 days using √(x+1) transformation.

Viabilidad

A pesar de los altos índices de necrosamiento observados, fue posible identificar porcentajes de viabilidad entre 20 y 100%, pero solo en explantes de pétalo (Tabla 3). No obstante, no se apreciaron diferencias estadísticas importantes, a excepción del tratamiento T16 con solo 20% de

viabilidad, el cual correspondió al genotipo F19P3 con precultivo con sacarosa (0.75 M) y el crioprotector PVS4.

DISCUSIÓN

A pesar de los altos índices de necrosamiento observados, los resultados demostraron que los explantes de pétalo conservaron viabilidad hasta 35 días después de ser recuperados del nitrógeno líquido (Figura 6). Esto indica que las técnicas de crioconservación aplicadas permitieron preservar parcialmente la integridad tisular. No obstante, se observaron daños localizados (zonas teñidas) que probablemente limitaron la reactivación del crecimiento y la reactivación de crecimiento en los explantes crioconservados (hasta los 28 días). De acuerdo con Azofeifa (2009), el oscurecimiento de los tejidos cultivados *in vitro* puede deberse a la oxidación de compuestos fenólicos, proceso común en explantes sometidos a estrés fisiológico o manipulación, y que también podría contribuir al necrosamiento observado en este estudio. Por otra parte, se ha señalado que la presencia de necrosis en los explantes no descarta completamente su potencial morfogénico, por lo que el necrosamiento observado en los pétalos de cacao no necesariamente implica una pérdida total de viabilidad (Guzmán, 2010; Tirado, 2014), en realidad, estos altos niveles de necrosamiento en los explantes de cacao cultivados *in vitro*, incluso en los tratamientos blanco de ambos genotipos, son típicos, pues se relaciona con la condición recalcitrante del material (Fuentes, 2014; Orozco, 2008; Suriano, 2009). Por otra parte, Chalker-Scott y Fuchigami (1989) también relacionan el necrosamiento con lesiones causadas por el frío, las cuales se deben a la rotura de las membranas celulares y pueden provocar la muerte del explante. Cabe mencionar que la formación de hielo no es el único factor que puede afectar gravemente a las células: durante la congelación o deshidratación, la salida de agua del citoplasma concentra los solutos intracelulares (iones y sales), alcanzando niveles que pueden resultar tóxicos para las estructuras celulares (Adu-Gyamfi & Wetten, 2012). Asimismo, un exceso de deshidratación puede disminuir peligrosamente el potencial hídrico y la turgencia celular, generando deformaciones estructurales irreversibles (Gowthami *et al*., 2025).

Aunque se han obtenido resultados favorables sobre el efecto del precultivo en medios enriquecidos con carbohidratos para la recuperación de explantes crioconservados (Abdelnour, 1999; Ballesteros *et al*., 2024; Fang *et al*., 2004; Gonzalez-Arnao & Engelmann, 2006), en este estudio los explantes precultivados con 0.75 M de sacarosa no mostraron una respuesta morfogénica superior respecto a los precultivados sin sacarosa.

Si bien la sacarosa cumple una función importante en la crioprotección, algunos tratamientos pueden resultar nocivos, ya sea por concentraciones elevadas (Gowthami *et al*., 2025) o por tiempos de exposición prolongados durante el precultivo, los cuales pueden inducir la acumulación de compuestos fenólicos y promover el marchitamiento por necrosis, reduciendo la supervivencia (Poobathy *et al*., 2013; Sakai & Engelmann, 2007).

De acuerdo con Sánchez-Chiang y Jiménez (2010), las soluciones vitrificadoras como PVS2 o PVS4 son mezclas altamente concentradas que pueden causar plasmólisis excesiva y choque osmótico, afectando negativamente los tejidos tras el descongelamiento. Esto puede deberse a la presencia de crioprotectores como el DMSO, que, aunque puede penetrar las células y protegerlas durante la congelación, también puede resultar tóxico para especies tropicales. Por ello, tanto los crioprotectores como sus combinaciones deben seleccionarse cuidadosamente (Sánchez-Chiang & Jiménez, 2010; Zamecnik *et al*., 2021). Según Sakai *et al*. (1991), las soluciones vitrificadoras previenen la formación de cristales de hielo en diversas especies; sin embargo, una encapsulación deficiente en este estudio pudo haber provocado daños celulares permanentes que impidieron la reactivación del crecimiento.

En cuanto a la viabilidad, (Zhang *et al*., 2017), reportaron una exitosa crioconservación y recuperación de anteras de *Citrus cavaleriei* y *Citrus maxima,* al pasar por un proceso de deshidratación previamente. En contraste, en el presente estudio no se observó incremento de volumen que indicara actividad celular tras la crioconservación en ninguno de los tres tipos de explantes. Es probable que una deshidratación excesiva durante el proceso haya afectado la

integridad de los tejidos (Osorio *et al*., 2011), reduciendo drásticamente la viabilidad de los estaminodios y anteras, no así en los pétalos, aunque no expresaron respuesta morfogénica, por lo que se innegablemente también sufrieron daño. Dicho daño podría deberse a alteraciones estructurales generadas por la pérdida de agua antes de la crioconservación, que provocan el colapso celular y limitan la recuperación posterior al descongelamiento (Sakai & Engelmann, 2007). Asimismo, no se descarta que durante la crioconservación se formen metabolitos secundarios capaces de inhibir la división celular y la regeneración de los explantes (Cisne, 1992).

CONCLUSIONES

La crioconservación de explantes florales encapsulados de cacao mediante las técnicas de encapsulación-deshidratación y encapsulación-vitrificación permitió preservar la viabilidad de los pétalos en los genotipos F9P6 y F19P3, mientras que los estaminodios y anteras no sobrevivieron al proceso. La encapsulación-deshidratación fue más efectiva al emplear deshidratación con gel de sílice o flujo laminar durante 3 a 5 h, según el genotipo. En tanto, la encapsulación-vitrificación resultó exitosa al utilizar crioprotectores (PVS2 y PVS4) sin precultivo con sacarosa, destacando su eficacia en los pétalos del genotipo F9P6.
Estos resultados constituyen una base útil para el desarrollo de bancos de germoplasma *in vitro*, que aseguren la disponibilidad de material para la embriogénesis somática y conservación de variedades élite.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a SADER-CONAHCyT por el financiamiento para la realización del presente trabajo de investigación, a través del proyecto 2017-02-00291417: “Desarrollo de innovaciones tecnológicas para el manejo integral sustentable del cultivo de cacao (*Theobroma cacao* L.) en México”.

LITERATURA CITADA

Abdelnour, A. (1999). Crioconservación de plantas, estado actual de la investigación en Costa Rica. *Agronomia Costarricense*, *23(2)*, 205–214. https://link.gale.com/apps/doc/A109220326/IFME?u=anon~873386c4&sid=googleScholar&xid=7d25c7cf

Adu-Gyamfi, R., & Wetten, A. (2012). Cryopreservation of cocoa (*Theobroma cacao* L.) somatic embryos by vitrification. *CryoLetters*, *33*(6), 494–505.

Adu-Gyamfi, R., Wetten, A., & Marcelino Rodríguez López, C. (2016). Effect of Cryopreservation and Post-Cryopreservation Somatic Embryogenesis on the Epigenetic Fidelity of Cocoa (*Theobroma cacao* L.). *PLOS ONE*, *11*(7), e0158857. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0158857

Aguirre-Medina, J. F., Alonso-Báez, M., Iracheta-Donjuan, L., Grajales-Solis, M., Avendaño-Arrazate, C. H., Sandoval-Esquivez, A., Mendoza-López, A., Solís-Bonilla, J. L., Olivera-de los Santos, A., López-Navarrete, M. C., Zamarripa-Colmenero, A., Gallardo-Méndez, R. A., & López-Guillen, G. (2010). *Tecnologías para la producción de cacao*. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Campo Experimental Rosario Izapa. Libro técnico Núm. 6. Tuxtla Chico, Chiapas.

Avendaño-Arrazate, C. H., Guillén-Díaz, S., & Hernández-Gómez, E. (2018). “Regalo de Dios”: Clon de cacao (*Theobroma cacao* L.) tolerante a *Moniliophthora roreri* Cif & Par, para la renovación de las zonas cacaoteras de México. *Agroproductividad*, *11*(9), 173–176.

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

Ballesteros, D., Martínez, M. T., Sánchez-Romero, C., Montalbán, I. A., Sales, E., Moncaleán, P., Arrillaga, I., & Corredoira, E. (2024). Current status of the cryopreservation of embryogenic material of woody species. *Frontiers in Plant Science*, *14*. https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1337152

Bartlett, D. W., Clough, J. M., Godwin, J. R., Hall, A. A., Hamer, M., & Parr-Dobrzanski, B. (2002). The strobilurin fungicides. *Pest Management Science*, *58*, 649–662. https://doi.org/10.1002/ps.520

Castañeda, P. R. (1990). *Bioestadística aplicada*. Trillas. https://books.google.com.mx/books?id=RfVBPgAACAAJ

Chalker-Scott, L., & Fuchigami, L. H. (1989). The role of phenolic compounds in plant stress responses. *Low Temperature Stress Physiology in Crops*, 68–76.

Cisne, C. J. D. (1992). Criopreservación de embriones cigóticos y somáticos de cacao. [Tesis de maestría]. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza.

Driver, J., & Kuniyuki, A. H. (1984). *In vitro* propagation of Paradox Walnut root stock. *HortScience: A Publication of the American Society for Horticultural Science*, *18*, 506–509. https://doi.org/https://doi.org/10.21273/HORTSCI.19.4.507

Engelmann, F., & González-Arnao, M. T. (2013). Introducción a la conservación *ex situ* de los recursos genéticos vegetales. In M. T. González-Arnao & F. Engelmann (Eds.), *Crioconservación de plantas en américa latina y el caribe* (pp. 25–35). IICA.

Fang, J.-Y., Wetten, A., & Hadley, P. (2004). Cryopreservation of cocoa (*Theobroma cacao* L.) somatic embryos for long-term germplasm storage. *Plant Science*, *166*(3), 669–675. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2003.11.002

Fuentes, B. A. (2014). Respuesta del callo embriogénico de cacao a modificaciones de la consistencia y componentes del medio de cultivo [Tesis de licenciatura]. Universidad Autónoma de Chiapas.

Gonzalez-Arnao, M. T., & Engelmann, F. (2006). Cryopreservation of plant germplasm using the encapsulation-dehydration technique: Review and case study on sugarcane. *CryoLetters*, *27*(3), 155–168.

Gowthami, R., Agrawal, A., Chander, S., Pandey, R., Sharma, N., Gupta, S., Srivastava, V., Malhotra, E. V., Bansal, S., Malik, S. K., Mahendru-Singh, A., & Singh, G. P. (2025). *In vitro* Genebank of India for safe conservation of horticultural plant diversity: four decades of milestones. *3 Biotech*, *15*(11), 1–26. https://doi.org/10.1007/s13205-024-04177-2

Guan, Y., Li, S. G., Fan, X. F., & Su, Z. H. (2016). Application of somatic embryogenesis in woody plants. *Frontiers in Plant Science*, *7*, 938. https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00938

Guzmán, T. B. (2010). Efecto del tipo de explante, estado y componentes del medio de cultivo en el origen y formación *in vitro* de tejido embrionario de cacao (*Theobroma cacao* L.*)* [Tesis de licenciatura]. Universidad Autónoma de Chiapas.

Hernández-Gómez, E., Hernández-Morales, J., Avendaño-Arrazate, C. H., López-Guillen, G., Garrido-Ramírez, E. R., Romero-Nápoles, J., & Nava-Díaz, C. (2015). Factores socieconómicos y parasitológicos que limitan la producción del cacao en Chiapas, México. *Revista Mexicana de Fitopatología*, *33(2)*, 232–246. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0185-33092015000200232&lng=es&tlng=es.

Iracheta-Donjuan, L., Cruz-López, L. A., López-Gómez, P., Avendaño-Arrazate, C. H., & Ortíz-Curiel, S. (2019). 2iP y brasinosteroides promueven la inducción de la embriogénesis somática en *Theobroma cacao* L. *Agro Productividad*, *12*(1), 65–70. https://doi.org/10.32854/agrop.v0i0.1340

Iracheta-Donjuan, L., López-Gómez, P., & Avendaño-Arrazate, C. (2017). Variabilidad de la capacidad morfogénica *in vitro* de híbridos interclonales de *Theobroma cacao* L. In E. de J. Pérez Álvarez & M. B. Arévalo Dorry (Eds.), *Congreso Mesoamericano de*

Investigación UNACH (pp. 1404–1409). Universidad Autónoma de Chiapas. https://dgip.unach.mx/images/CMIU/PDF/CMIU-2017.pdf

Marassi, M. A., Scocchi, A., & Gonzalez, A. M. (2006). Plant regeneration from rice anthers cryopreserved by an encapsulation/dehydration technique. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, *42*(1), 31–36. https://doi.org/10.1079/IVP2005746

Matsumoto, T., & Niino, T. (2017). Development of vitrification method. In T. Niino, T. Matsumoto, S. Yamamoto, S. Mki, D. Tanaka, & F. Engelmann (Eds.), *Manual of Cryopreservation Methods using Cryo-plate* (pp. 8–15). PTCCryo Group.

Mohammadi, M. A., Wai, M. H., Rizwan, H. M., Qarluq, A. Q., Xu, M., Wang, L., Cheng, Y., Aslam, M., Zheng, P., Wang, X., Zhang, W., & Qin, Y. (2023). Advances in micropropagation, somatic embryogenesis, somatic hybridizations, genetic transformation and cryopreservation for Passiflora improvement. *Plant Methods*, *19*, 50. https://doi.org/10.1186/s13007-023-01030-0

Mosa, K. A., Ahmed, A. E., Hazem, Y., Kanawati, I. S., Abdullah, A., Hernandez-Sori, L., Ali, M. A., & Vendrame, W. (2023). Insights into cryopreservation, recovery and genetic stability of medicinal plant tissues. *Fitoterapia*, *169*, 105555. https://doi.org/10.1016/j.fitote.2023.105555

Orozco, W. V. (2008). Establecimiento in vitro e inducción de la organogénesis en clones de cacao resistentes a la moniliasis [Tesis de licenciatura]. Universidad autónoma de Chiapas.

Osorio, S. A., Mascorro Gallardo, J. O., Rodríguez de la O, J. L., Melchor López, C., & González Arnao, M. T. (2011). Crioconservación de ápices de crisantemo (*Dendranthema grandiflorum* Kitam) por encapsulación-deshidratación y por vitrificación. *Revista Chapingo Serie Horticultura*, *XVII*, 33–43.

Pence, V. C. (1991). Cryopreservation of immature embryos of *Theobroma cacao*. *Plant Cell Reports*, *10*, 144–191.

Pineda-Aguilar, J., Iracheta-Donjuan, L., Avendaño-Arrazate, C. H., & López-Gómez P. (2016). Efecto del precultivo con elicitores y crioprotectores en la reactivación de callos de *Theobroma cacao* L. *Memorias de XI Congreso de Biotecnología*.

Poobathy, R., Xavier, R., Sinniah, U. R., & Subramaniam, S. (2013). Molecular stability of protocorm-like bodies of *Dendrobium* sonia-28 after encapsulation- dehydration and vitrification. *Australian Journal of Crop Science*, *7*, 189–195.

Robles, G. K. K. (2015). Efecto de la vernalización y reguladores de crecimiento en la inducción de callo haploide de *Theobroma cacao* L. [Tesis de licenciatura]. Universidad autónoma de Chiapas.

Sakai, A., & Engelmann, F. (2007). Vitrification, Encapsulation-Vitrification and Droplet-Vitrification: A review. *CryoLetters*, *28(3)*, 151–172.

Sakai, A., Kobayashi, S., & Oiyama, I. (1991). Cryopreservation of nucellar cells of navel orange (*Citrus sinensis* Osb.) by a simple freezing method. *Plant Science*, *74*(2), 243–248. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0168-9452(91)90052-A

Sánchez-Chiang, N., & Jiménez, V. M. (2010). Técnicas de conservación *in vitro* para el establecimiento de bancos de germoplasma en cultivos tropicales. *Agronomía Mesoamericana*, *21(1)*, 193–205.

Silva, J. J., Montes Cruz, S., Acosta Pompa, L., Arias, E., & García Alcántara, A. (2005). Embriogénesis somática: una alternativa para la propagación, mejoramiento y conservación de germoplasma en cacao. *Cuadernos de Biodiversidad*, *16*, 9–12. https://doi.org/10.14198/cdbio.2005.16.02

Solís, J. L., Zamarripa Colmenero, A., Pecina Quintero, V., Garrido Ramírez, E., & Hernández Gómez, E. (2015). Evaluación agronómica de híbridos de cacao (*Theobroma cacao* L.) para selección de alto rendimiento y resistencia en campo a moniliasis. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, *6 (1)*, 71–82.

Suriano, de P. Y. (2009). Introducción de Embriogénesis somática en genotipos de cacao con diferente grado de resistencia a la moniliasis [Tesis para ingeniero biotecnólogo]. Universidad Autónoma de Chiapas.

Recibido:
9/julio/2025

Aceptado:
5/diciembre/2025

Tirado, P. B. (2014). Efecto del medio de cultivo y tamaño del explante sobre la embriogénesis secundaria en *Theobroma cacao* L. [Tesis de licenciatura]. Universidad autónoma de Chiapas.

Zamecnik, J., Faltus, M., & Bilavcik, A. (2021). Vitrification solutions for plant cryopreservation: Modification and properties. *Plants*, *10*(12), 2623. https://doi.org/10.3390/plants10122623

Zhang, J.-M., Lu, X.-X., Xin, X., Yin, G.-K., He, J.-J., Huang, B., Jiang, D., & Chen, X.-L. (2017). Cryopreservation of Citrus anthers in the National Crop Genebank of China. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, *53*(4), 318–327. https://doi.org/10.1007/s11627-017-9848-z