

SEP

# POLIBOTÁNICA

ISSN 1405-2768



Núm. 55

Enero 2023



Enero 2023

Núm. 55

POLIBOTÁNICA



CONACYT

PÁG.	CONTENIDO
1	Análisis de trazos de la pteridoflora del estado de Hidalgo, México <i>Track analysis of the pteridoflora of Hidalgo, Mexico</i> Goyenechea Mayer-Goyenechea, I.   V.Y. Anaya Cisneros   J.M. Castillo-Cerón   G. Montiel-Canales
15	<i>Salvia divinorum</i> (Lamiaceae) un nuevo registro para Veracruz, México <i>Salvia divinorum (Lamiaceae) a new record for Veracruz, Mexico</i> Castillo-Campos, G.   J.G. García-Franco   M. Luisa Martínez   I. Fragoso-Martínez
25	Estructura y diversidad arbórea de un bosque de pino-encino en Huiztlatzala, Guerrero, México <i>Structure and tree diversity of a pine-oak forest in Huiztlatzala, Guerrero, Mexico</i> Rodríguez Pacheco, A.   M. I. Palacios Rangel   L. Mohedano Caballero   A. Villanueva Morales
41	Riqueza, estructura y diversidad florística en huertos familiares del sureste del estado de Morelos: una aproximación biocultural <i>Richness, structure and floristic diversity in homegardens of the southeast of Morelos state: a biocultural approach</i> Tegoma Coloreano, A.   J. Blancas   A. García Flores   L. Beltrán-Rodríguez
67	Efectos de jales mineros y materia orgánica en la supervivencia de <i>Arbustus xalapensis</i> Kunth propagado simbióticamente <i>Effect of mining tailings and organic matter on the survival of symbiotically propagated Arbutus xalapensis Kunth</i> Rodríguez González, F.   M. Rangel Villafranco   A.R. Velasco Reyes   J.M. Gómez Bernal   E.A. Ruiz Huerta
81	Concentración de kinetina y tipo de explante en la multiplicación <i>in vitro</i> de <i>Sequoia sempervirens</i> (D. Don). Endl. <i>Kinetin concentration and explant type in in vitro multiplication of Sequoia sempervirens (D. Don). Endl.</i> Castro Garibay, S.L.   A. Villegas Monter   I.J. Cruz Larios
95	Actividad antioxidante y citotóxica del aceite esencial de las hojas de laurel aromático ( <i>Litsea glaucescens</i> Kunth) <i>Antioxidant and cytotoxic activity of essential oil from aromatic bay leaves (Litsea glaucescens Kunth)</i> Tepixtle-Colohua, V.V.   M.R. González-Tepale   D. Guerra-Ramírez   B. Reyes-Trejo   H. Zuleta-Prada   A.M. Borja-de la Rosa   F. Reyes-Fuentes
109	Evaluación <i>in vitro</i> del efecto antibacteriano de los extractos de <i>Bidens pilosa</i> y <i>Eryngium foetidum</i> <i>In vitro evaluation of the antibacterial effect of extracts of Bidens pilosa y Eryngium foetidum</i> Chafila-Molina, A. L.   L. M. Silva-Deley
121	Desinfección de adulto pecan leaflets, and <i>in vitro</i> callogenesis induction <i>Desinfección de foliolos de nogal pecanero adulto, e inducción de callogénesis in vitro</i> Gándara-Ledezma, V.   L. Tinco-García   J.L. Rodríguez-de la O   L. Castro-Espinoza   S. Ruiz-Cruz   A. Márquez-Cervantes   M.A. Gutiérrez-Coronado
145	Estudios para la conservación y aprovechamiento de <i>Chrysactinia mexicana</i> , planta aromática y medicinal nativa de México <i>Studies for the conservation and use of Chrysactinia mexicana, an aromatic and medicinal plant native to Mexico</i> Magallán-Hernández, F.   J.A. Valencia-Hernández   R. Sánchez-Castillo
161	Usos del palo dulce <i>Eysenhardtia polystachya</i> (Ort.) Sarg., en cuatro municipios del estado de Morelos, México <i>Uses of kidneywood Eysenhardtia polystachya (Ort.) Sarg. in four municipalities of the state of Morelos, Mexico</i> Lorenzo-Barrera, N.A.   M. Andrade Rodríguez   O.G. Villegas Torres   E. Román Montes de Oca   H. Sotelo Nava   T. de J. Rodríguez Rojas   R. Suárez Rodríguez
179	Valor cultural de la flora medicinal de las etnias Mochó y Kakchikel del estado de Chiapas, México <i>Cultural significance of medicinal plants amongst Mochó and Kakchikel ethnic groups of the state of Chiapas, Mexico</i> Trigueros-Vázquez, I.Y.: O. Ruiz-Rosado; F. Gallardo-López; B.F. Solís-Guzmán; F. Morales-Trejo y G. López-Romero
197	Estudio de plantas medicinales en el municipio de Pachuca de Soto Hidalgo, México <i>Study of medicinal plants in the municipality of Pachuca of Soto Hidalgo, Mexico</i> Lara Reimers, E.A.   A.R. García Hernández   F. Cruz García   D. Urresti Duran   J.A. Gonzales Fuentes   J.A. Encina Domínguez   Y. Uribe Salazar
213	Plantas silvestres comestibles del estado de Aguascalientes, México, sus formas de consumo y comercialización <i>Edible wild plants of Aguascalientes, Mexico, their forms of consumption and commercialization</i> Sandoval-Ortega, M.H.   E.E. De Loera-Avila   V.M. Martínez-Calderón   S.G. Zumaya-Mendoza
231	Recursos forestales no maderables utilizados en elaboración de artesanías en la comunidad de Malinalco, Estado de México <i>Non-timber forest resources used in elaboration of handicrafts in the community of Malinalco, State of Mexico</i> White-Olascoaga, L.   C. Chávez-Mejía   D. García-Mondragón   M. Michua-Hernández
245	Respuesta en el sistema de defensa antioxidante de <i>Leersia hexandra</i> Sw. a la exposición de hidrocarburos del petróleo <i>Response in the antioxidant defense system of Leersia hexandra Sw. to the exposure of petroleum hydrocarbons</i> Orocio-Carrillo, J.A.   M.C. Rivera-Cruz   A. Juárez-Maldonado   C.C. Bautista-Muñoz   Y. González-García   K. Chávez-Alvarez

# POLIBOTÁNICA

Núm. 55

ISSN electrónico: 2395-9525

Enero 2023

## Portada

*Bidens pilosa* L. Asteraceae. “Acahual”. Aquenios de 5 a 18 mm de largo, los interiores lineares y más largos, los exteriores más o menos comprimidos dorso-ventralmente y más cortos, negruzcos a café, vilano con 3-2 aristas amarillas, de 1 a 3 mm de largo. Planta con múltiples propiedades terapéuticas, considerada en medicina popular como diurética y febrífuga, estomacal y antiulcerosa, para curar catarros con fiebre, faringitis y amigdalitis.

*Bidens pilosa* L. Asteraceae. “Acahual”. Achenes 5 to 18 mm long, inner ones linear and longer, outer ones more or less dorso-ventrally compressed and shorter, blackish to brownish, pappus with 3-2 yellow awns, 1 to 3 mm long. Plant with multiple therapeutic properties, considered in folk medicine as diuretic and febrifuge, stomachic and anti-ulcerous, to cure colds with fever, pharyngitis, and tonsillitis.

por/by **Rafael Fernández Nava**





## INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

Director General: *Dr. Arturo Reyes Sandoval*

Secretario General: *Ing. Arq. Carlos Ruiz Cárdenas*

Secretario Académico: *Mtro. Mauricio Igor Jasso Zaranda*

Secretario de Innovación e Integración Social: *M. en C. Ricardo Monterrubio López*

Secretario de Investigación y Posgrado: *Dra. Laura Arreola Mendoza*

Secretario de Servicios Educativos: *Dra. Ana Lilia Coria Páez*

Secretario de Administración: *M. en C. Javier Tapia Santoyo*

Director de Educación Superior: *Dra. María Guadalupe Ramírez Sotelo*

## ESCUELA NACIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Maestra Decana en Funciones de Dirección:

*M. en C. Yadira Fonseca Sabater*

Subdirectora Académica:

*M. en C. Martha Patricia Cervantes Cervantes*

Jefe de la Sección de Estudios de Posgrado e Investigación:

*Dr. Gerardo Aparicio Ozores*

Subdirector de Servicios Educativos e Integración Social:

*Biól. Gonzalo Galindo Becerril*

---

**POLIBOTÁNICA**, Año 28, No. 55, enero-junio 2023, 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.

Queda estrictamente prohibida la reproducción total o parcial de los contenidos e imágenes de la publicación sin previa autorización del Instituto Politécnico Nacional.



## REVISTA BOTÁNICA INTERNACIONAL DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

### EDITOR EN JEFE

*Rafael Fernández Nava*

### EDITORIA ASOCIADA

*María de la Luz Arreguín Sánchez*

### COMITÉ EDITORIAL INTERNACIONAL

*Christiane Anderson*  
University of Michigan  
Ann Arbor, Michigan, US

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

*Heike Vibrans*  
Colegio de Postgraduados  
Estado de México, México

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

*Graciela Calderón de Rzedowski*  
Instituto de Ecología del Bajío  
Pátzcuaro, Mich., México

*Delia Fernández González*  
Universidad de León  
León, España

*Theodore S. Cochran*  
University of Wisconsin  
Madison, Wisconsin, US

*Jerzy Rzedowski Rotter*  
Instituto de Ecología del Bajío  
Pátzcuaro, Mich., México

*Hugo Cota Sánchez*  
University of Saskatchewan  
Saskatoon, Saskatchewan, Canada

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

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

*Claude Sastre*  
Muséum National d'Histoire Naturelle  
Paris, Francia

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

*Mauricio Velayos Rodríguez*  
Real Jardín Botánico  
Madrid, España

*Francisco de Asis Dos Santos*  
Universidade Estadual de Feira de Santana  
Feira de Santana, Brasil

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

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

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

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

*Tom Wendt*  
University of Texas  
Austin, Texas, US

*José Manuel Rico Ordaz*  
Universidad de Oviedo  
Oviedo, España

### DISEÑO Y FORMACIÓN ELECTRÓNICA

*Luz Elena Tejeda Hernández*

### OPEN JOURNAL SYSTEM Y TECNOLOGÍAS DE LA INFORMACIÓN

*Pedro Aráoz Palomino*

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*

*rfernand@ipn.mx*

Dirección Web

*http://www.polibotanica.mx*

POLIBOTÁNICA es una revista indexada en:

CONACYT, índice de Revistas Mexicanas de Investigación Científica y Tecnológica  
del Consejo Nacional 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, Índice de Revistas Latinoamericanas en Ciencias.



**Polibotánica**

ISSN electrónico: 2395-9525

polibotanica@gmail.com

Instituto Politécnico Nacional

México

<http://www.polibotanica.mx>

# DISINFECTION OF ADULT PECAN LEAFLETS, AND *IN VITRO* CALLOGENESIS INDUCTION

## DESINFECCIÓN DE FOLIOLOS DE NOGAL PECANERO ADULTO, E INDUCCIÓN DE CALLOGÉNESIS *IN VITRO*

Gándara-Ledezma, V.; L. Tineo-García; J.L. Rodríguez-de la O; L. Castro-Espinoza;  
S. Ruiz-Cruz; A. Márquez-Cervantes y M.A. Gutiérrez-Coronado

DISINFECTION OF ADULT PECAN LEAFLETS, AND *in vitro* CALLOGENESIS  
INDUCTION

DESINFECCIÓN DE FOLIOLOS DE NOGAL PECANERO ADULTO, E INDUCCIÓN  
DE CALLOGÉNESIS *in vitro*



Instituto Politécnico Nacional

Núm. 55: 121-144 México. Enero 2023

DOI: 10.18387/polibotanica.55.9



Este es un artículo de acceso abierto bajo la licencia Creative Commons 4.0  
Atribución-No Comercial ([CC BY-NC 4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/)).

Disinfection of adult pecan leaflets, and *in vitro* callogenesis inductionDesinfección de folíolos de nogal pecanero adulto, e inducción de calogénesis *in vitro*

Gándara-Ledezma, V.;  
L. Tineo-García;  
J.L. Rodríguez-de la O;  
L. Castro-Espinoza;  
S. Ruiz-Cruz;  
A. Márquez-Cervantes  
y M.A. Gutiérrez-Coronado

DISINFECTION OF ADULT  
PECAN LEAFLETS, AND *in vitro*  
CALLOGENESIS  
INDUCTION

DESINFECCIÓN DE  
FOLIOLOS DE NOGAL  
PECANERO ADULTO, E  
INDUCCIÓN DE  
CALLOGÉNESIS *in vitro*

POLIBOTÁNICA

Instituto Politécnico Nacional

Núm. 55: 121-144. Enero 2023

DOI:

10.18387/polibotanica.55.9

V. Gándara-Ledezma

L. Tineo-García

Departamento de Biotecnología y Ciencias Alimentarias,  
Instituto Tecnológico de Sonora, Unidad Obregón, Campus Náinari,  
Av. Antonio Caso 2266, C.P. 85137, Cd. Obregón, Sonora, México.

J.L. Rodríguez-de la O

Departamento de Fitotecnía, Universidad Autónoma Chapingo, km 38.5, carretera  
México-Texcoco, C.P. 56230, Chapingo, Texcoco, Estado de México, México.

L. Castro-Espinoza

Departamento de Ciencias del Agua y Medio Ambiente,  
Instituto Tecnológico de Sonora, Unidad Obregón, Campus Náinari,  
Av. Antonio Caso 2266, C.P. 85137, Cd. Obregón, Sonora, México.

S. Ruiz-Cruz

Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos,  
Universidad de Sonora, Unidad Hermosillo, Campus Centro, Blvd. Luis Encinas y  
Rosales s/n, Col. Centro, C.P. 83000, Hermosillo, Sonora, México.

A. Márquez-Cervantes

Campo Experimental Norman E Borlaug (CENEB)-INIFAP,  
kilómetro 12, CP 85028. Cd. Obregón, Sonora.

M.A. Gutiérrez-Coronado / [mgutierrez@itson.edu.mx](mailto:mgutierrez@itson.edu.mx)

Departamento de Biotecnología y Ciencias Alimentarias, Instituto Tecnológico de  
Sonora, Unidad Obregón, Campus Náinari, Av. Antonio Caso 2266, C.P. 85137, Cd.  
Obregón, Sonora, México. Tel. 644 140 04 36

**RESUMEN:** Hasta ahora, no existe un protocolo para la micropropagación de nogal pecanero (*Carya illinoensis*) a partir de explantes de árbol adulto. La contaminación microbiana persistente y el oscurecimiento oxidativo de los tejidos han impedido el éxito de métodos previamente propuestos. Específicamente, el explante de hoja de árbol adulto constituye un punto de partida inexplorado para la regeneración de *C. illinoensis*. Por ello, el objetivo de este estudio fue determinar un método de desinfección y las condiciones de cultivo *in vitro* que inducen una mayor producción de callo en explantes de hoja de árbol adulto de nogal pecanero. Se probaron 5 métodos de desinfección: (1) etanol 70% por 50 s, 1.8-2.7% hipoclorito de sodio con 2 gotas/L de Tween 80 por 50 s, (2) etanol 70% por 2 min, 1.8-2.7% hipoclorito de sodio con 2 gotas/L de Tween 80 por 2 min, (3) etanol 70% por 2 min, 1.8-2.7% hipoclorito de sodio con 2 gotas/L de Tween 80 por 2 min, 1 g/L de carbendazim con 2 gotas/L de Tween 80 por 20 min, (4) etanol 70% por 2 min, 1.8-2.7% hipoclorito de sodio con 2 gotas/L de Tween 80 por 2 min, 8.8 g/L de carbendazim con 2 gotas/L de Tween 80 por 20 min, y (5) etanol 70% por 2 min, 1.8-2.7% hipoclorito de sodio con 2 gotas/L de Tween 80 por 2 min, 1 g/L de procloraz con 2 gotas/L de Tween 80 por 20 min. Además, se probaron 6 diferentes medios de cultivo donde se varió la fuente de carbono (sacarosa, glucosa y maltosa), la inclusión de un antioxidante ( $\text{AgNO}_3$  y carbón activado), y la concentración de sales MS (máxima o un tercio de la



concentración máxima). Los explantes fueron incubados durante 50 días; una porción de los explantes fue incubada en la oscuridad y la otra ante un fotoperiodo de 16 h. Asimismo, unos explantes fueron inoculados en orientación abaxial, y otros en orientación adaxial. Se evaluó el oscurecimiento oxidativo de los explantes, el porcentaje de explantes con callo, el peso fresco y seco de los callos, y el porcentaje de explantes contaminados por microorganismos. El menor porcentaje de explantes contaminados se observó en el tratamiento de desinfección que incluyó inmersión en procloraz, además procloraz fue el único fungicida que permitió la callogénesis en el 100% de los explantes tratados. El oscurecimiento en los explantes no aumentó al triplicar la concentración de sales MS. La glucosa redujo significativamente el oscurecimiento de los explantes, pero también disminuyó de manera significativa el porcentaje de explantes con callo, en comparación con lo observado al utilizar sacarosa o maltosa. La orientación adaxial, promovió un mayor porcentaje de explantes con callo, con un peso fresco y seco, así como un porcentaje de humedad superiores. El fotoperiodo impidió la producción de callo, mientras que la incubación en la oscuridad permitió que más del 80% de los explantes produjeran callo. El medio sin antioxidante y el medio con 5 mg/L de nitrato de plata dieron resultados semejantes de oscurecimiento, mientras que 1 g/L de carbón activado dejó los explantes inviables. El presente trabajo propone un método para el establecimiento aséptico y condiciones de cultivo *in vitro* para la iniciación de callos en hojas de nogal pecanero adulto, con resultados reproducibles.

**Palabras clave:** *Carya illinoensis*, procloraz, carbendazim, callo.

**ABSTRACT:** Until now, there is no protocol for the micropropagation of pecan trees (*Carya illinoensis*) from explants of adult trees. Persistent microbial contamination and browning of tissues have impeded the success of previously proposed methods. Specifically, the adult tree leaf explant constitutes an unexplored starting point for the regeneration of *C. illinoensis*. Therefore, the objective of this study was to determine a disinfection method and *in vitro* culture conditions that induce greater callus production in adult pecan tree leaf explants. Five disinfection methods were tested: (1) 70% ethanol for 50 s, 1.8-2.7% sodium hypochlorite with 2 drops/L of Tween 80 for 50 s, (2) 70% ethanol for 2 min, 1.8-2.7% sodium hypochlorite with 2 drops/L of Tween 80 for 2 min, (3) 70% ethanol for 2 min, 1.8-2.7% sodium hypochlorite with 2 drops/L of Tween 80 for 2 min, 1 g/L of carbendazim with 2 drops/L of Tween 80 for 20 min, (4) 70% ethanol for 2 min, 1.8-2.7% sodium hypochlorite with 2 drops/L of Tween 80 for 2 min, 8.8 g/L of carbendazim with 2 drops /L of Tween 80 for 20 min, and (5) 70% ethanol for 2 min, 1.8-2.7% sodium hypochlorite with 2 drops/L of Tween 80 for 2 min, 1 g/L of prochloraz with 2 drops/L of Tween 80 for 20 min. In addition, 6 different culture media were tested where the carbon source (sucrose, glucose and maltose), the inclusion of an antioxidant (AgNO<sub>3</sub> and activated carbon), and the concentration of MS salts (maximum or one third of the maximum concentration) were varied. The explants were incubated for 50 days; a portion of the explants was incubated in the dark and the other under a photoperiod of 16 h. Likewise, some explants were inoculated in abaxial orientation, and others in adaxial orientation. The level of browning, the percentage of explants with callus, the fresh and dry weight of the calluses, and the percentage of explants contaminated by microorganisms were evaluated. The lowest percentage of contaminated explants was observed in the disinfection treatment that included immersion in prochloraz, and prochloraz was the only fungicide that allowed callogenesis in 100% of the treated explants. The darkening in the explants did not increase when the concentration of MS salts tripled. Glucose significantly reduced browning, but also significantly decreased the percentage of explants with callus, compared to that observed when using sucrose or maltose. The adaxial orientation promoted a higher percentage of explants with callus, with a fresh and dry weight, as well as a higher moisture percentage. The photoperiod prevented callus production, while incubation in the dark allowed more than 80% of the explants to produce callus in each treatment. The medium without antioxidant and the medium with 5 mg/L of silver nitrate gave similar browning results, while 1 g/L of activated carbon left the explants unviable. The present work proposes a method for the aseptic establishment and *in vitro* culture conditions for callus initiation in leaflets of adult pecan tree, with reproducible results.

**Keywords:** *Carya illinoensis*, procloraz, carbendazim, callus, calli.

## INTRODUCCIÓN

El nogal pecanero (*Carya illinoensis*) forma parte de las juglandáceas, una familia constituida por 9 géneros (*Alfaroa*, *Oreomunnea*, *Carya*, *Juglans*, *Anamocarya*, *Cylocarya*, *Engelhardia*, *Platycarya* y *Pterocarya*), y alrededor de 60 especies (Xiang *et al.*, 2011). Se trata de una especie de árbol valorado principalmente por la nuez que produce (Litz, 2005).

Tomando en cuenta los diferentes tipos de explantes que se pueden utilizar para clonar una planta, la yema es el explante que más reduce el riesgo de variación somaclonal (Abahmane, 2011). Además, la yema apical es el explante más responsivo (Salar *et al.*, 2013). No obstante, el nogal pecanero es una planta recalcitrante al cultivo *in vitro* (Renukdas *et al.*, 2010), entendiendo por recalcitrancia a la condición por la cual algunas especies vegetales difícilmente logran ser desinfectadas con éxito, conservando la capacidad de generar brotes viables (Benson, 2003).

El tejido vegetal que contiene altas concentraciones de compuestos fenólicos es particularmente recalcitrante al cultivo *in vitro* (Benson, 2000). Un ejemplo de este tipo de compuestos es la naftoquinona juglona, la cual se encuentra en el ruezno, raíces, hojas y corteza de las juglandáceas (Ahmad & Suzuki, 2019). En general, cuando los compuestos fenólicos se oxidan, se producen quinonas las cuales le dan una apariencia oscura al tejido vegetal. Estas quinonas pueden oscurecer el medio de cultivo, y son compuestos altamente reactivos y tóxicos para el tejido vegetal (Titov *et al.*, 2006), por ello pueden retardar el desarrollo del explante o incluso provocar su muerte (Sparjanbabu *et al.*, 2019).

El tejido vegetal puede sintetizar compuestos fenólicos por eventos estresantes como la disección (Das & Srivastav, 2015) o el ataque de un microorganismo patógeno (Shalaby & Horwitz, 2015). El carbón activado adsorbe los compuestos fenólicos segregados por el tejido vegetal, lo cual inactiva a las enzimas polifenol oxidasa y peroxidasa, logrando así la disminución del oscurecimiento del tejido y, con ello, el incremento de la supervivencia de los explantes y la morfogénesis (Pan & van Staden, 1998). Además, el carbón activado es capaz de adsorber bacterias y sus toxinas (Ovington, 2007).

De hecho, el carbón activado absorbe muchas sustancias diferentes, algunas de las cuales se producen durante el autoclavado del medio de cultivo. Un ejemplo de estas sustancias es el 5-hidroximetil-furfural, el cual inhibe el crecimiento vegetal (Thomas, 2008). Otras de las sustancias absorbidas por el carbón activado son liberadas por el tejido vegetal inoculado en el medio, y otras son ingredientes del medio de cultivo (Eymar *et al.*, 2000). Pero el carbón activado tiende adsorber primero las sustancias moderadamente polares, y adsorbe mejor los compuestos aromáticos que los compuestos olefínicos insaturados. De modo que el carbón activado tiene afinidad por los compuestos fenólicos y sus formas oxidadas, así como por las auxinas y citoquininas (Pan & van Staden, 1998).

Por otra parte, el carbón activado altera el pH del medio, lo cual es sumamente importante ya que el pH del medio afecta el crecimiento del tejido vegetal y los procesos morfogénicos, debido a que altera la disponibilidad y el consumo de los nutrientes (Eymar *et al.*, 2000).

Otra forma de controlar la oxidación del tejido es mediante la adición de nitrato de plata ( $\text{AgNO}_3$ ) al medio de cultivo (Huh *et al.*, 2017; Modeste *et al.*, 2017), ya que este compuesto inhibe la acción del etileno (Kumar *et al.*, 2009). El nitrato de plata puede ser añadido al medio en concentraciones variadas que pudieran ir de 1 a 15 mg/L (Abdollahi & Rashidi, 2017; Dhiman *et al.*, 2020; Gammoudi *et al.*, 2019; Huh *et al.*, 2017; Malik *et al.*, 2021; Modeste *et al.*, 2017; Warchol *et al.*, 2021). Pero este compuesto no sólo reduce la oxidación del tejido vegetal, sino que también puede inducir un incremento en la callogénesis (Gammoudi *et al.*, 2019; Malik *et al.*, 2021; Warchol *et al.*, 2021), la producción de embriones somáticos (Abdollahi & Rashidi, 2017; Huh *et al.*, 2017; Malik *et al.*, 2021; Warchol *et al.*, 2021) y la

regeneración de plántulas (Abdollahi & Rashidi, 2017; Malik *et al.*, 2021; Warchoń *et al.*, 2021), y asimismo mejorar la supervivencia de los explantes (Huh *et al.*, 2017). Adicionalmente, se ha demostrado que el nitrato de plata inhibe el crecimiento de hongos fitopatógenos (Dhiman *et al.*, 2020; Krishnaraj *et al.*, 2012).

Aunada a los problemas de oxidación del tejido, la contaminación microbiana ha representado un impedimento para la micropropagación del nogal pecanero. Se ha intentado regenerar esta planta a través del cultivo *in vitro* de yemas de árbol adulto, pero esto no ha sido posible debido a que no se ha logrado erradicar la contaminación de los explantes, o bien, porque la yema no ha sido capaz de continuar su desarrollo hasta la generación de la planta completa *in vitro* (Rodríguez & Wetzstein, 1994).

Los estudios realizados sobre árboles adultos y patrones de nogal pecanero, señalan cuáles son los microorganismos que más afectan a esta especie vegetal. Por ejemplo, se han analizado muestras de árboles de nogal pecanero de 20 años de edad, establecidos en Coahuila, México, y se ha identificado una desatada incidencia de *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani* y *Lasiodiplodia theobromae* (Alvidrez Villarreal *et al.*, 2012). También se ha reportado que la producción de patrones de nogal pecanero en Brasil se ve afectada por la incidencia de infecciones fúngicas, específicamente por hongos del género *Fusarium*, que ocasionan la pudrición de las raíces de las plántulas (Poletto *et al.*, 2020).

Conviene señalar que se ha demostrado que *Fusarium oxysporum* puede ser inhibido de manera efectiva mediante el tratamiento con procloraz (Amini & Sidovich, 2010; Nel *et al.*, 2007; Özer & Köycü, 1998) y carbendazim (Kamdi *et al.*, 2012; Nikam *et al.*, 2007; Poddar *et al.*, 2004).

De hecho, procloraz, benomilo y carbendazim pertenecen a la clase de los benzimidazoles, cuyo mecanismo de acción consiste en inhibir la síntesis de ergosterol en la célula fúngica para interrumpir su metabolismo. Estos fungicidas pueden ser efectivos contra *Fusarium*, *Botrytis*, *Sclerotinia*, *Septoria*, *Uncinula*, *Erysiphe*, entre otros. Sin embargo, los benzimidazoles pueden tener un efecto fitotóxico que se percibe como una disminución de la biomasa de tejido vegetal, y una reducción en el contenido de clorofilas a y b, carotenoides y pigmentos totales (Baibakova *et al.*, 2019).

Por otra parte, no es necesario investigar la manera de eliminar los hongos del nogal, si la materia prima tiene una baja carga microbiana. Por ello, en diversas investigaciones, se ha realizado el cultivo *in vitro* de embriones cigóticos de nogal pecanero (Kumar & Sharma, 2005; Obeidy & Smith, 1993), especialmente semillas inmaduras (Burns & Wetzstein, 1995, 1997; Mathews & Wetzstein, 1993; McGranahan *et al.*, 1993; Payghamzadeha & Kazemitabar, 2010; Rodríguez & Wetzstein, 1994, 1998; Vendrame *et al.*, 1999; Wetzstein *et al.*, 1989; Wetzstein *et al.*, 1990). Además, los embriones cigóticos, al estar compuestos por tejidos jóvenes, tienen un mayor potencial para la embriogénesis y la organogénesis, que los tejidos maduros y diferenciados (Elhiti & Stasolla, 2011).

No obstante, se debe tener en cuenta que cada semilla tiene una carga genética única (Coyle, 2004). En el caso de *Carya illinoensis*, se trata de una especie que se reproduce por polinización cruzada (Thompson & Conner, 2011), y se sabe que las semillas presentan aún mayor diversidad genética cuando la planta se propaga de este modo (Pooja, 2004). Por lo tanto, al realizar el cultivo *in vitro* de una semilla, se obtienen clones de una planta con características fenotípicas impredecibles.

Lo anterior denota el interés por trabajar con tejido adulto de nogal para su micropropagación. Y, una vez que se haya superado el establecimiento aséptico, se deben contemplar otros parámetros que pueden optimizar el cultivo, como la fuente de carbono y la concentración de sales minerales en el medio de cultivo. En cultivo de tejidos vegetales, se puede probar la suplementación del medio con diversos hidratos de carbono, sin embargo, la sacarosa es el

estándar. Pero también es común adicionar el medio con los monosacáridos glucosa, fructosa, galactosa, manosa, arabinosa, ribosa y xilosa; los disacáridos maltosa, lactosa, celobiosa y trehalosa; y el trisacárido rafinosa. Por si fuera poco, se han obtenido resultados positivos cultivando tejidos en medio suplementado con polioles, también llamados azúcares de alcohol; ejemplos de estas fuentes de carbono son el sorbitol, el glicerol y el manitol (Yaseen *et al.*, 2013).

El explante de hoja de árbol adulto constituye un punto de partida inexplorado para la regeneración de *C. illinoensis*. Por ello, el objetivo de este estudio fue determinar un método de desinfección y las condiciones de cultivo *in vitro* que inducen una mayor producción de callo en explantes de hoja de árbol adulto de nogal pecanero.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Material biológico

Se recolectaron hojas completas de árboles de nogal pecanero de 16 años de edad, de la cv. 'Wichita', provenientes de un huerto de 50 ha, ubicado en el bloque 1010 del Valle del Yaqui (Cd. Obregón, Sonora, México), con coordenadas 27°20'23.26"N y 109° 55'42.83"O. Las recolecciones se realizaron durante la mañana, en abril, mayo, junio y agosto de 2021. Inmediatamente después del corte de cada hoja, se aplicó solución de 25 g/L de sulfato cúprico en la zona de corte del peciolo, y se pulverizó la superficie de la hoja con solución antioxidante de ácido ascórbico (0.125 g/L) y ácido cítrico (0.075 g/L).

### Selección de folíolos

Durante la selección de los folíolos, se descartaron aquellos que presentaban lesiones causadas por la incidencia de luz solar o mordeduras de insectos, así como los folíolos contaminados por excremento de aves. Y únicamente se trabajó con folíolos apicales.

### Desinfección del tejido vegetal

Se hicieron tres réplicas de desinfección para cada tratamiento. Para cada réplica, se pesaron aproximadamente 3 g de folíolos enteros, después éstos fueron desinfectados mediante inmersión consecutiva en una serie de soluciones desinfectantes y agua, en agitación constante a 100 rpm. Se utilizaron 200 mL de cada solución desinfectante por cada 3 g de tejido tratado; en el caso de que el tejido pesara más o menos de tres gramos, se hizo el cálculo del volumen requerido. El orden de las soluciones y los tiempos de inmersión considerados en los tratamientos de desinfección aparecen en la tabla 1. Al final de la desinfección, los folíolos fueron sumergidos en solución 0.25 g/L de ácido ascórbico y 0.15 g/L de ácido cítrico durante 12 h.

**Tabla 1.** Tratamientos de desinfección de explantes de hoja de nogal pecanero.

Tratamiento	Tiempo de inmersión						
	Etanol al 70%	Solución al 1.8-2.7% de hipoclorito de sodio, con 2 gotas por litro de Tween 80	Agua	Solución al 0.2% de Procloraz, con 2 gotas por litro de Tween 80	Solución de 8.8 g/l de Carbendazim, con 2 gotas por litro de Tween 80	Solución de 1 g/l de Carbendazim, con 2 gotas por litro de Tween 80	Agua
HD1	50 s	50 s	(1 min) x 4	-		-	-
HD2	2 min	2 min	(1 min) x 4	-		-	-
Velbistin	2 min	2 min	(1 min) x 4	-	-	20 min	(1 min) x 4

Ultralite	2 min	2 min	(1 min) x 4	-	20 min	-	-
HD4	2 min	2 min	(1 min) x 4	20 min	-	-	(1 min) x 4

El orden de la secuencia de inmersiones va de izquierda a derecha

#### Descripción del explante y medio de cultivo

Los foliolos desinfectados fueron disectados en campana de flujo laminar. A partir de cada réplica de  $\approx 3$  g de hoja, se obtuvieron 15 explantes ( $n=15$ ) cortados bajo un molde de aluminio estéril de  $1\text{ cm}^2$ , los cuales fueron sembrados individualmente, en frascos con 10 ml de medio de cultivo con las composiciones descritas en la tabla 2.

**Tabla 2.** Composición de medios de cultivo probados para la inducción de la callogénesis en explantes de hoja de nogal pecanero.

Tratamiento	Fuente de carbono (30 g/L)	Antioxidante	Concentración de sales de Murashige y Skoog M6899 Sigma (g/L)
Estándar	Sacarosa	-	1.46
AgNO <sub>3</sub>	Sacarosa	AgNO <sub>3</sub> (5 mg/L)	1.46
CA	Sacarosa	Carbón activado (1 g/L)	1.46
MS+	Sacarosa	-	4.4
Glucosa	Glucosa	-	1.46
Maltosa	Maltosa	-	1.46

En todos los tratamientos se incluyó 1 mg/L de ácido 2,4-diclorofenoxiacético, y 7.5 g/L de agar bacteriológico. Antes de autoclavar el medio, el pH fue ajustado a 5.7 con HCl 1 N ó NaOH 1 N, según el requerimiento.

#### Desarrollo del cultivo

Los explantes cultivados fueron incubados por 50 días, a 25°C, expuestos a dos tratamientos luminosos: (1) oscuridad continua y (2) fotoperiodo de 16 horas de luz blanca y 8 h de oscuridad. Además, se probaron dos posiciones de inóculo: (1) cara adaxial (haz) en contacto con el medio de cultivo y (2) cara abaxial (envés) en contacto con el medio de cultivo.

Durante la incubación se realizaron examinaciones visuales periódicas, cada 10 días a partir de la siembra, para contabilizar los explantes contaminados y los explantes con callo, y para evaluar el nivel de oscurecimiento de cada explante.

#### Cálculo del índice de oscurecimiento

La incidencia de oxidación en los explantes de hoja se evaluó asignando un nivel de oscurecimiento a cada explante, considerando su apariencia (tabla 3). Después de evaluar el nivel de oscurecimiento de cada explante, se calculó el índice de oscurecimiento, utilizando la ecuación 1.

**Tabla 3.** Descripción de los niveles de oscurecimiento en explantes de hoja.

Nivel de oxidación	Características del explante
0	Coloración verde saludable en toda la superficie del explante
1	Coloración verde saludable en toda la superficie del explante, excepto por la presencia de una pequeña mancha de tejido oxidado
2	Explante con coloración verde-marrón en toda su superficie
3	Explante verde de tonalidad oscura. También reciben esta puntuación los explantes con presencia de



grandes manchas de color marrón

$$\text{Índice de oscurecimiento} = \frac{\text{Nivel de oscurecimiento}}{15 - (\text{Número de explantes contaminados})} \quad (1)$$

### Peso del callo

Al finalizar el periodo de incubación, se seleccionaron al azar 5 explantes con callo, de 3 réplicas, de cada tratamiento (en total 3x5=15 explantes por tratamiento). Luego, los callos fueron raspados y colocados en cajas de Petri en peso constante. Se anotó el peso fresco de cada callo, y a continuación los callos fueron secados a 60 °C durante 24 h (Golkar *et al.*, 2019). Enseguida, el material se dejó enfriar en un desecador, para posteriormente ser pesado. Después, se calculó el peso seco del callo y su porcentaje de humedad.

Adicionalmente, se seleccionaron 7 explantes con callo blanco, 7 explantes con callo marrón y 7 explantes con callo amarillo, para hacer la determinación del peso fresco y seco de cada tipo de callo, y calcular su porcentaje de humedad.

### Análisis estadístico

El análisis de varianza de los datos se realizó en el paquete estadístico IBM® SPSS® Statistics, versión 22 (Chicago, IL, EUA). Las medias de índice de oscurecimiento, porcentaje de explantes contaminados, porcentaje de explantes con callos, peso fresco, peso seco y porcentaje de humedad de los callos, fueron comparadas mediante las pruebas de rango múltiple de Duncan y Tukey, según lo especificado en cada tabla de resultados.

## RESULTADOS

En la tabla 4 se muestra la evolución del índice de oxidación calculado para los explantes sometidos a los diferentes tratamientos probados. Al pasar 10 días de incubación, se observaron índices de oxidación nulos e incluso índices de oxidación de hasta 2.79; aunque fue más común encontrar índices de oxidación por encima de 2.5 a los 50 días de incubación.

**Tabla 4.** Índice de oscurecimiento en explantes de hoja al transcurrir el tiempo de incubación.

Desinfección	Medio de cultivo	Orientación	Luz/ Oscuridad	Fechas de siembra	Índice de oscurecimiento				
					10 días	20 días	30 días	40 días	50 días
HD1	Estándar	Adaxial	Oscuridad	21/04/2021	1.64 ± 0.40 <sup>a, b, c</sup>	1.99 ± 0.46 <sup>a, b, c, d</sup>	2.49 ± 0.38 <sup>c, f, g</sup>	2.82 ± 0.10 <sup>c, f</sup>	2.84 ± 0.14 <sup>f</sup>
HD1	Estándar	Adaxial	Oscuridad	26/06/2021	0.07 ± 0.12 <sup>a</sup>	0.24 ± 0.10 <sup>a</sup>	1.09 ± 0.47 <sup>a, b, c, d, e</sup>	2.23 ± 0.45 <sup>d, e, f</sup>	2.52 ± 0.24 <sup>d, e, f</sup>
HD2	Estándar	Adaxial	Oscuridad	22/04/2021	0.93 ± 0.96 <sup>a, b</sup>	2.28 ± 0.24 <sup>b, c, d</sup>	2.29 ± 0.32 <sup>d, e, f, g</sup>	2.62 ± 0.04 <sup>d, e, f</sup>	2.67 ± 0.12 <sup>e, f</sup>
Velbistin	Estándar	Adaxial	Oscuridad	26/04/2021	1.61 ± 0.47 <sup>a, b, c</sup>	2.60 ± 0.24 <sup>d</sup>	2.80 ± 0.20 <sup>g</sup>	2.87 ± 0.12 <sup>c, f</sup>	2.87 ± 0.12 <sup>f</sup>
Ultralite	Estándar	Adaxial	Oscuridad	27/05/2021 30/05/2021 03/06/2021	0.04 ± 0.08 <sup>a</sup>	0.66 ± 0.75 <sup>a, b, c</sup>	0.99 ± 0.71 <sup>a, b, c, d</sup>	1.80 ± 0.53 <sup>b, c, d, e</sup>	2.27 ± 0.42 <sup>d, e, f</sup>
Procloraz	Estándar	Adaxial	Oscuridad	26/04/2021	0.98 ± 0.54 <sup>a, b, c</sup>	1.09 ± 1.25 <sup>a, b, c, d</sup>	2.87 ± 0.13 <sup>g</sup>	2.98 ± 0.04 <sup>f</sup>	3.00 ± 0.00 <sup>f</sup>
Ultralite	CA	Adaxial	Oscuridad	16/06/2021	2.30 ± 0.67 <sup>b, c</sup>	1.44 ± 0.76 <sup>a, b, c, d</sup>	0.76 ± 0.37 <sup>a, b, c</sup>	0.58 ± 0.43 <sup>a</sup>	0.60 ± 0.13 <sup>a, b</sup>
Ultralite	AgNO <sub>3</sub>	Adaxial	Oscuridad	01/06/2021 30/05/2021	0.68 ± 0.18 <sup>a, b</sup>	0.91 ± 0.54 <sup>a, b, c, d</sup>	1.31 ± 0.77 <sup>a, b, c, d, e, f</sup>	2.02 ± 0.20 <sup>c, d, e, f</sup>	2.38 ± 0.21 <sup>d, e, f</sup>
Velbistin	Glucosa	Adaxial	Oscuridad	07/05/2021 18/05/2021	0.00 ± 0.00 <sup>a</sup>	0.77 ± 0.42 <sup>a, b, c, d</sup>	0.77 ± 0.40 <sup>a, b, c</sup>	1.13 ± 0.53 <sup>a, b, c</sup>	1.16 ± 0.52 <sup>a, b, c</sup>
Ultralite	Glucosa	Adaxial	Oscuridad	09/06/2021 27/05/2021	0.75 ± 0.23 <sup>a, b</sup>	0.66 ± 0.18 <sup>a, b, c</sup>	0.67 ± 0.12 <sup>a, b</sup>	0.89 ± 0.14 <sup>a, b</sup>	1.78 ± 0.34 <sup>c, d, e</sup>
Velbistin	Maltosa	Adaxial	Oscuridad	07/05/2021 18/05/2021	0.42 ± 0.33 <sup>a</sup>	1.58 ± 0.50 <sup>a, b, c, d</sup>	1.78 ± 0.77 <sup>a, b, c, d, e, f, g</sup>	2.36 ± 0.49 <sup>d, e, f</sup>	2.40 ± 0.55 <sup>d, e, f</sup>
Ultralite	Maltosa	Adaxial	Oscuridad	27/05/2021	1.07 ± 0.78 <sup>a, b, c</sup>	1.29 ± 0.56 <sup>a, b, c, d</sup>	1.93 ± 0.07 <sup>b, c, d, e, f, g</sup>	2.38 ± 0.37 <sup>d, e, f</sup>	2.58 ± 0.33 <sup>e, f</sup>

				03/06/2021					
Velbistin	MS+	Adaxial	Oscuridad	18/05/2021 27/05/2021	0.52 ± 0.36 <sup>a,b</sup>	2.25 ± 0.50 <sup>b, c, d</sup>	2.73 ± 0.11 <sup>f, g</sup>	2.67 ± 0.12 <sup>d, e, f</sup>	2.67 ± 0.12 <sup>e, f</sup>
Ultralite	Estándar	Adaxial	Luz	27/05/2021	0.67 ± 1.04 <sup>a,b</sup>	1.24 ± 0.95 <sup>a, b, c, d</sup>	2.13 ± 0.60 <sup>c, d, e, f, g</sup>	2.44 ± 0.28 <sup>d, e, f</sup>	2.84 ± 0.14 <sup>f</sup>
Velbistin	Estándar	Abaxial	Oscuridad	04/05/2021	0.36 ± 0.50 <sup>a</sup>	0.44 ± 0.48 <sup>a, b</sup>	0.47 ± 0.46 <sup>a</sup>	0.47 ± 0.46 <sup>a</sup>	0.50 ± 0.50 <sup>a</sup>
HD1	Estándar	Adaxial	Oscuridad	20/08/2021	1.51 ± 1.34 <sup>a, b, c</sup>	1.06 ± 0.83 <sup>a, b, c, d</sup>	1.63 ± 0.72 <sup>a, b, c, d, e, f, g</sup>	1.68 ± 0.42 <sup>b, c, d</sup>	1.58 ± 0.40 <sup>b, c, d</sup>
HD3	Estándar	Adaxial	Oscuridad	21/08/2021	2.79 ± 0.17 <sup>c</sup>	2.47 ± 0.42 <sup>c, d</sup>	2.51 ± 0.54 <sup>c, f, g</sup>	2.40 ± 0.53 <sup>d, e, f</sup>	2.33 ± 0.46 <sup>d, e, f</sup>

Los datos son la media del índice de oscurecimiento, observado en 3 réplicas de desinfección-siembra. Los tratamientos fueron una combinación de fungicida utilizado durante la desinfección de foliolos, y fotoperíodo empleado durante la incubación de los explantes. Los distintos superíndices indican diferencias significativas entre medias de la misma columna, según la prueba de Duncan (ANOVA de una vía,  $P < 0.05$ ). ± señala la desviación estándar de  $n=15$  (15 explantes por cada una de las 3 réplicas).

La tabla 5 señala la proporción de explantes contaminados por microorganismos, en cada tratamiento. El número total de explantes contaminados es predominantemente el resultado de la interacción del tratamiento de desinfección probado y la fecha de siembra del explante.

**Tabla 5.** Porcentaje de explantes de hoja visiblemente contaminados por microorganismos, al transcurrir el tiempo de incubación.

Desinfección	Medio de cultivo	Orientación	Luz/Oscuridad	Fechas de siembra	Porcentaje de explantes visiblemente contaminados					Porcentaje total de explantes contaminados
					10 días	20 días	30 días	40 días	50 días	
HD1	Estándar	Adaxial	Oscuridad	21/04/2021	0.00 ± 0.00 <sup>a</sup>	4.44 ± 3.85 <sup>a</sup>	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00 <sup>a</sup>	4.44 ± 3.85 <sup>a</sup>
HD1	Estándar	Adaxial	Oscuridad	26/06/2021	4.44 ± 3.85 <sup>a, b</sup>	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	2.22 ± 3.85 <sup>a, b</sup>	2.22 ± 3.85 <sup>a, b</sup>	8.89 ± 3.85 <sup>a</sup>
HD2	Estándar	Adaxial	Oscuridad	22/04/2021	8.89 ± 3.85 <sup>a, b</sup>	11.11 ± 3.85	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00 <sup>a</sup>	20.00 ± 6.67 <sup>a, b</sup>
Velbistin	Estándar	Adaxial	Oscuridad	26/04/2021	4.44 ± 3.85 <sup>a, b</sup>	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00 <sup>a</sup>	4.44 ± 3.85 <sup>a</sup>
Ultralite	Estándar	Adaxial	Oscuridad	27/05/2021 30/05/2021 03/06/2021	0.00 ± 0.00 <sup>a</sup>	2.22 ± 3.85	4.44 ± 7.70	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00 <sup>a</sup>	6.67 ± 6.67 <sup>a</sup>
Procloraz	Estándar	Adaxial	Oscuridad	26/04/2021	0.00 ± 0.00 <sup>a</sup>	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00 <sup>a</sup>	0.00 ± 0.00 <sup>a</sup>
Ultralite	CA	Adaxial	Oscuridad	16/06/2021	4.44 ± 3.85 <sup>a, b</sup>	13.33 ± 13.33	2.22 ± 3.85	4.44 ± 7.70	0.00 ± 0.00 <sup>a</sup>	24.44 ± 10.18 <sup>a, b</sup>
Ultralite	AgNO <sub>3</sub>	Adaxial	Oscuridad	01/06/2021 30/05/2021	2.22 ± 3.85 <sup>a</sup>	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00 <sup>a</sup>	2.22 ± 3.85 <sup>a</sup>
Velbistin	Glucosa	Adaxial	Oscuridad	07/05/2021 18/05/2021	6.67 ± 6.67 <sup>a, b</sup>	4.44 ± 7.70	2.22 ± 3.85	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00 <sup>a</sup>	13.33 ± 11.55 <sup>a</sup>
Ultralite	Glucosa	Adaxial	Oscuridad	09/06/2021 27/05/2021	22.22 ± 10.18 <sup>b, c</sup>	2.22 ± 3.85	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00 <sup>a</sup>	24.44 ± 10.18 <sup>a, b</sup>
Velbistin	Maltosa	Adaxial	Oscuridad	07/05/2021 18/05/2021	0.00 ± 0.00 <sup>a</sup>	2.22 ± 3.85	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00 <sup>a</sup>	2.22 ± 3.85 <sup>a</sup>
Ultralite	Maltosa	Adaxial	Oscuridad	27/05/2021 03/06/2021	8.89 ± 10.18 <sup>a, b</sup>	2.22 ± 3.85	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00 <sup>a</sup>	11.11 ± 13.88 <sup>a</sup>
Velbistin	MS+	Adaxial	Oscuridad	18/05/2021 27/05/2021	4.44 ± 3.85 <sup>a, b</sup>	4.44 ± 7.70	2.22 ± 3.85	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00 <sup>a</sup>	11.11 ± 3.85 <sup>a</sup>
Ultralite	Estándar	Adaxial	Luz	27/05/2021	2.22 ± 3.85 <sup>a</sup>	0.00 ± 0.00	2.22 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	4.44 ± 3.85 <sup>a</sup>

							3.85	0.00	0.00 <sup>a</sup>	
Velbistin	Estándar	Abaxial	Oscuridad	04/05/2021	0.00 ± 0.00 <sup>a</sup>	2.22 ± 3.85	2.22 ± 3.85	4.44 ± 3.85	4.44 ± 3.85 <sup>b</sup>	13.33 ± 13.33 <sup>a</sup>
HD1	Estándar	Adaxial	Oscuridad	20/08/2021	31.11 ± 10.18 <sup>c</sup>	6.67 ± 6.67	4.44 ± 7.70	4.44 ± 7.70	0.00 ± 0.00 <sup>a</sup>	46.67 ± 13.33 <sup>b</sup>
HD3	Estándar	Adaxial	Oscuridad	21/08/2021	17.78 ± 13.88 <sup>a, b, c</sup>	0.00 ± 0.00	4.44 ± 3.85	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00 <sup>a</sup>	22.22 ± 15.40 <sup>a, b</sup>

Los datos son la media del número de explantes contaminados, observado en 3 réplicas de desinfección-siembra. Los tratamientos fueron una combinación de fungicida utilizado durante la desinfección de foliolos, y fotoperiodo empleado durante la incubación de los explantes. ± señala la desviación estándar de n=15 (15 explantes por cada una de las 3 réplicas). Los distintos superíndices indican diferencias significativas entre medias de la misma columna, según la prueba de Duncan (ANOVA de una vía, P<0.05).

Los resultados de callogénesis se presentan en la tabla 6. Se observa que únicamente los explantes inoculados en medio adicionado con nitrato de plata empezaron a producir callo habiendo transcurrido tan sólo 10 días de incubación. En la mayoría de los tratamientos, la respuesta callogénica empezó a manifestarse a los 20 días de incubación.

**Tabla 6.** Porcentaje de explantes de hoja con callo, al transcurrir el tiempo de incubación.

Desinfección	Medio de cultivo	Orientación	Luz/Oscuridad	Fechas de siembra	Porcentaje de explantes con callo				
					10 días	20 días	30 días	40 días	50 días
HD1	Estándar	Adaxial	Oscuridad	21/04/2021	0.00 ± 0.00 <sup>b</sup>	73.33 ± 6.67 <sup>a, b, c</sup>	100.00 ± 0.00 <sup>a</sup>	100.00 ± 0.00 <sup>a</sup>	100.00 ± 0.00 <sup>a</sup>
HD1	Estándar	Adaxial	Oscuridad	26/06/2021	0.00 ± 0.00 <sup>b</sup>	62.22 ± 42.86 <sup>a, b, c, d</sup>	91.11 ± 3.85 <sup>a, b</sup>	95.56 ± 3.85 <sup>a, b</sup>	91.11 ± 3.85 <sup>a, b</sup>
HD2	Estándar	Adaxial	Oscuridad	22/04/2021	0.00 ± 0.00 <sup>b</sup>	68.89 ± 13.88 <sup>a, b, c</sup>	84.44 ± 10.18 <sup>a, b, c</sup>	88.89 ± 3.85 <sup>a, b</sup>	88.89 ± 3.85 <sup>a, b</sup>
HD3 (Velbistin)	Estándar	Adaxial	Oscuridad	26/04/2021	0.00 ± 0.00 <sup>b</sup>	95.56 ± 3.85 <sup>a</sup>	95.56 ± 3.85 <sup>a</sup>	95.56 ± 3.85 <sup>a, b</sup>	95.56 ± 3.85 <sup>a</sup>
HD3 (Ultralite)	Estándar	Adaxial	Oscuridad	27/05/2021 30/05/2021 03/06/2021	0.00 ± 0.00 <sup>b</sup>	60.00 ± 52.92 <sup>a, b, c, d</sup>	97.78 ± 3.85 <sup>a</sup>	93.33 ± 6.67 <sup>a, b</sup>	91.11 ± 3.85 <sup>a, b</sup>
HD4	Estándar	Adaxial	Oscuridad	26/04/2021	0.00 ± 0.00 <sup>b</sup>	86.67 ± 6.67 <sup>a, b</sup>	100.00 ± 0.00 <sup>a</sup>	100.00 ± 0.00 <sup>a</sup>	100.00 ± 0.00 <sup>a</sup>
Ultralite	CA	Adaxial	Oscuridad	16/06/2021	0.00 ± 0.00 <sup>b</sup>	0.00 ± 0.00 <sup>d</sup>	0.00 ± 0.00 <sup>c</sup>	0.00 ± 0.00 <sup>f</sup>	0.00 ± 0.00 <sup>e</sup>
Ultralite	AgNO <sub>3</sub>	Adaxial	Oscuridad	01/06/2021 30/05/2021	37.78 ± 37.91 <sup>a</sup>	73.33 ± 23.09 <sup>a, b, c</sup>	82.22 ± 7.70 <sup>a, b, c, d</sup>	86.67 ± 11.55 <sup>a, b</sup>	86.67 ± 11.55 <sup>a, b</sup>
Velbistin	Glucosa	Adaxial	Oscuridad	07/05/2021 18/05/2021	0.00 ± 0.00 <sup>b</sup>	84.44 ± 3.85 <sup>a, b</sup>	80.00 ± 6.67 <sup>a, b, c, d</sup>	84.44 ± 7.70 <sup>a, b</sup>	84.44 ± 7.70 <sup>a, b</sup>
Ultralite	Glucosa	Adaxial	Oscuridad	09/06/2021 27/05/2021	0.00 ± 0.00 <sup>b</sup>	13.33 ± 11.55 <sup>c, d, e</sup>	44.44 ± 10.18 <sup>c, d, e</sup>	53.33 ± 6.67 <sup>c, d, e</sup>	55.56 ± 7.70 <sup>c, d</sup>
Velbistin	Maltosa	Adaxial	Oscuridad	07/05/2021 18/05/2021	0.00 ± 0.00 <sup>b</sup>	0.00 ± 0.00 <sup>d</sup>	55.56 ± 48.23 <sup>a, b, c, d</sup>	80.00 ± 17.64 <sup>a, b, c</sup>	86.67 ± 6.67 <sup>a, b</sup>
Ultralite	Maltosa	Adaxial	Oscuridad	27/05/2021 03/06/2021	0.00 ± 0.00 <sup>b</sup>	44.44 ± 26.94 <sup>a, b, c, d</sup>	77.78 ± 20.37 <sup>a, b, c, d</sup>	86.67 ± 17.64 <sup>a, b</sup>	88.89 ± 13.88 <sup>a, b</sup>
Velbistin	MS+	Adaxial	Oscuridad	18/05/2021 27/05/2021	2.22 ± 3.85 <sup>b</sup>	71.11 ± 27.76 <sup>a, b, c</sup>	86.67 ± 6.67 <sup>a, b, c</sup>	88.89 ± 3.85 <sup>a, b</sup>	88.89 ± 3.85 <sup>a, b</sup>
Ultralite	Estándar	Adaxial	Luz	27/05/2021	0.00 ± 0.00 <sup>b</sup>	0.00 ± 0.00 <sup>d</sup>	0.00 ± 0.00 <sup>c</sup>	0.00 ± 0.00 <sup>f</sup>	0.00 ± 0.00 <sup>e</sup>
Velbistin	Estándar	Abaxial	Oscuridad	04/05/2021	0.00 ± 0.00 <sup>b</sup>	40.00 ± 6.67 <sup>a, b, c, d</sup>	66.67 ± 13.33 <sup>a, b, c</sup>	68.89 ± 16.78 <sup>a, b, c, d</sup>	68.89 ± 16.78 <sup>a, b, c</sup>

							<sup>d</sup>		
HD1	Estándar	Adaxial	Oscuridad	20/08/2021	0.00 ± 0.00 <sup>b</sup>	28.89 ± 16.78 <sup>b, c, d</sup>	46.67 ± 13.33 <sup>b, c, d</sup>	44.44 ± 10.18 <sup>d, e</sup>	40.00 ± 6.67 <sup>d</sup>
HD3	Estándar	Adaxial	Oscuridad	21/08/2021	0.00 ± 0.00 <sup>b</sup>	13.33 ± 13.33 <sup>c, d</sup>	37.78 ± 16.78 <sup>d, e</sup>	40.00 ± 13.33 <sup>c</sup>	40.00 ± 13.33 <sup>d</sup>

Los datos son la media del número de explantes con callo, observado en 3 réplicas de desinfección-siembra. Los tratamientos fueron una combinación de fungicida utilizado durante la desinfección de foliolos, y fotoperiodo empleado durante la incubación de los explantes. ± señala la desviación estándar de n=15 (15 explantes por cada una de las 3 réplicas). Los distintos superíndices indican diferencias significativas entre medias de la misma columna, según la prueba de Duncan (ANOVA de una vía, P<0.05).

Los callos generados en todos los tratamientos fueron clasificados de acuerdo a su color, y se procedió a realizar el análisis destructivo de su peso fresco y seco. El promedio de los pesos de los callos y sus porcentajes de humedad se encuentran en la tabla 7.

**Tabla 7.** Peso fresco y seco, y porcentaje de humedad de callos, según su color.

Color del callo	Peso fresco	Peso seco	% de humedad del callo fresco
<b>Blanco</b>	0.0106 ± 0.002 <sup>c</sup>	0.0019 ± 0.0015 <sup>c</sup>	79.58 ± 8.30 <sup>b</sup>
<b>CV</b>	0.87	0.81	0.10
<b>Marrón</b>	0.1128 ± 0.0127 <sup>a</sup>	0.0118 ± 0.0012 <sup>a</sup>	89.52 ± 0.87 <sup>a</sup>
<b>CV</b>	0.11	0.10	0.01
<b>Amarillo</b>	0.0352 ± 0.0219 <sup>b</sup>	0.0049 ± 0.0026 <sup>b</sup>	83.66 ± 5.33 <sup>a, b</sup>
<b>CV</b>	0.62	0.52	0.06

Los datos son los promedios del peso fresco y seco, así como del porcentaje de humedad de los callos, observados en siete explantes con callo de la misma coloración (n=7). ± señala la desviación estándar. Los distintos superíndices indican diferencias significativas entre medias de la misma columna, según las pruebas de Duncan y Tukey (ANOVA de una vía, P<0.05).

Finalmente, para cuantificar la producción de callo, se evaluó el peso fresco y seco, así como el porcentaje de humedad de los callos, según el tratamiento recibido por el explante. Los resultados de estas evaluaciones se muestran en la tabla 8. Se observa que los explantes responsivos, presentaron callos con un peso fresco promedio dentro del rango de 6 a 81 mg, con un peso seco de 1 a 7.3 mg, y un porcentaje de humedad de 67.68 a 90.30 %.

**Tabla 8.** Peso fresco y seco del callo, y porcentaje de humedad del callo fresco, correspondiente a los tratamientos de desinfección, adición de antioxidantes en el medio de cultivo, modificación de fuente de carbono y concentración de sales MS, incubación con fotoperiodo, así como cultivo con cara abaxial en contacto con el medio de cultivo.

Desinfección	Medio de cultivo	Orientación	Luz/Oscuridad	Desinfección	Peso fresco del callo	Peso seco del callo	% de humedad del callo fresco
HD1	Estándar	Adaxial	Oscuridad	21/04/2021	0.0514 ± 0.0276 <sup>a, b, c</sup>	0.0063 ± 0.0005 <sup>a, b</sup>	84.9000 ± 7.4958 <sup>a, b</sup>
HD1	Estándar	Adaxial	Oscuridad	26/06/2021	0.0232 ± 0.0073 <sup>c, d, e</sup>	0.0036 ± 0.0006 <sup>b, c, d</sup>	83.4100 ± 2.6000 <sup>a, b, c</sup>
HD2	Estándar	Adaxial	Oscuridad	22/04/2021	0.0810 ± 0.0121 <sup>a</sup>	0.0073 ± 0.0007 <sup>a</sup>	90.3000 ± 1.5279 <sup>a</sup>
Velbistin	Estándar	Adaxial	Oscuridad	26/04/2021	0.0746 ±	0.0067 ±	88.5366 ± 5.5176 <sup>a</sup>

					0.0466 <sup>a, b</sup>	0.0027 <sup>a</sup>	
Ultralite	Estándar	Adaxial	Oscuridad	27/05/2021, 30/05/2021, 03/06/2021	0.0186 ± 0.0068 <sup>c, d, e</sup>	0.0031 ± 0.0009 <sup>c, d</sup>	81.9466 ± 3.0978 <sup>a, b, c, d</sup>
HD4	Estándar	Adaxial	Oscuridad	26/04/2021	0.0317 ± 0.0172 <sup>c, d, e</sup>	0.0069 ± 0.0035 <sup>a</sup>	75.9066 ± 3.0978 <sup>a, b, c, d, e</sup>
Ultralite	CA	Adaxial	Oscuridad	16/06/2021	0.0000 ± 0.0000 <sup>e</sup>	0.0000 ± 0.0000 <sup>e</sup>	0.0000 ± 0.0000 <sup>f</sup>
Ultralite	AgNO <sub>3</sub>	Adaxial	Oscuridad	01/06/2021, 30/05/2021	0.0102 ± 0.0018 <sup>e</sup>	0.0025 ± 0.0004 <sup>c, d, e</sup>	73.7066 ± 4.1282 <sup>d, e</sup>
Velbistin	Glucosa	Adaxial	Oscuridad	18/05/2021, 07/06/2021	0.0102 ± 0.0015 <sup>e</sup>	0.0018 ± 0.0005 <sup>d, e</sup>	81.1566 ± 5.4095 <sup>a, b, c, d</sup>
Ultralite	Glucosa	Adaxial	Oscuridad	27/05/2021, 09/06/2021	0.0041 ± 0.0011 <sup>e</sup>	0.0010 ± 0.0002 <sup>d, e</sup>	74.2900 ± 8.7200 <sup>c, d, e</sup>
Velbistin	Maltosa	Adaxial	Oscuridad	07/05/2021, 18/05/2021	0.0108 ± 0.0048 <sup>e</sup>	0.0019 ± 0.0007 <sup>d, e</sup>	77.3100 ± 6.9247 <sup>b, c, d</sup>
Velbistin	MS+	Adaxial	Oscuridad	18/05/2021	0.0125 ± 0.0011 <sup>d, e</sup>	0.0016 ± 0.0005 <sup>d, e</sup>	86.9266 ± 3.0842 <sup>a</sup>
Velbistin	MS+	Adaxial	Oscuridad	21/05/2021	0.0459 ± 0.0373 <sup>b, c, d</sup>	0.0052 ± 0.0035 <sup>a, b, c</sup>	87.2466 ± 2.2990 <sup>a</sup>
Fotoperiodo	Estándar	Adaxial	Luz	27/05/2021	0.0000 ± 0.0000 <sup>e</sup>	0.0000 ± 0.0000 <sup>e</sup>	0.0000 ± 0.0000 <sup>f</sup>
Velbistin	Estándar	Abaxial	Oscuridad	04/05/2021	0.0063 ± 0.0022 <sup>e</sup>	0.0017 ± 0.0004 <sup>d, e</sup>	67.6853 ± 8.3582 <sup>e</sup>

Los datos son los promedios del peso fresco y seco, así como del porcentaje de humedad de los callos frescos, observados en 3 réplicas de 5 callos cada una. ± señala la desviación estándar de n=5. Los distintos superíndices indican diferencias significativas entre medias de la misma columna, según la prueba de Duncan (ANOVA de una vía, P<0.05)

## DISCUSIÓN

### Desinfección de explantes

El menor porcentaje de explantes contaminados se observó en el tratamiento de desinfección que incluyó inmersión en procloraz. En otra investigación también se comprobó que procloraz puede ser más efectivo que carbendazim en la eliminación de hongos. En dicho estudio, se probó el efecto inhibitorio de la combinación de tres pares diferentes de fungicidas, y 7 fungicidas individuales, en tres concentraciones distintas (1 ppm, 10 ppm, 100 ppm) sobre *Fusarium acutatum* y *Fusarium oxysporum*. Se observó que tanto carbendazim como procloraz inhibieron significativamente el crecimiento de la colonia de *Fusarium acutatum*, sin embargo, procloraz tuvo un efecto inhibitorio significativamente superior al de carbendazim, y al de la mayoría de los tratamientos probados. Además, en las pruebas contra *Fusarium oxysporum*, procloraz fue el único fungicida que logró inhibir por completo el crecimiento de la colonia del hongo (Degani & Kalman, 2021).

Por si fuera poco, en la presente investigación, no hubo diferencias estadísticamente significativas en el porcentaje de explantes con callo según el método de desinfección, pero procloraz fue el único fungicida que permitió la callogénesis en el 100% de los explantes tratados.

Por otra parte, los folíolos desinfectados en abril, sin la aplicación de fungicidas, dieron mejores resultados de callogénesis y de contaminación microbiana, que los folíolos desinfectados en mayo, junio y agosto, con o sin aplicación de fungicidas. Teniendo en consideración que *C. illinoensis* es un árbol caducifolio (Benucci *et al.*, 2012), y que sus hojas comienzan a formarse a mediados de marzo, es posible que el tratamiento de desinfección planteado haya



sido altamente efectivo en abril debido a que las hojas tratadas eran jóvenes, y habían estado menos expuestas a precipitaciones y otras fuentes de contaminación. Se sabe que el agua de lluvia puede recolectarse en la superficie de las plantas y propiciar un ambiente ideal para el desarrollo de microorganismos (Babaei *et al.*, 2013).

Por otra parte, la humedad atmosférica generalmente es el factor ambiental más determinante para la severidad de la contaminación fúngica en las plantas. Los hongos que son transmitidos a través del aire, infectan las plantas con mayor facilidad cuando la temperatura ambiental es de 15-40 °C. Asimismo, el crecimiento de hongos se ve favorecido por la humedad elevada y temperaturas moderadas, por otra parte, la baja humedad, así como las temperaturas extremas, inhiben el crecimiento del hongo y la germinación de esporas (Talley *et al.*, 2002).

En la presente investigación, los folíolos desinfectados en agosto, fueron los más afectados por la presencia de contaminación fúngica. Esta situación puede deberse a que agosto es el mes más cálido y húmedo del verano. Por ejemplo, en la primavera y verano de 2015, en el Valle del Yaqui, se registraron los siguientes promedios de temperatura diurna y temperatura nocturna: 29 °C y 17 °C en abril, 33 °C y 19 °C en mayo, 35 °C y 27 °C en junio, y 35 °C y 29 °C en julio y agosto. Asimismo, se reportaron los siguientes promedios de porcentaje de humedad relativa diurna y humedad relativa nocturna: 35 y 75 en abril, 20 y 57 en mayo, 35 y 62 en junio, 45 y 67 en julio, y 55 y 77 en agosto (Leyva Corona *et al.*, 2015).

Se puede afirmar que, conforme avanza la temporada, se reduce el potencial de los folíolos como fuente de explantes, y se desaconseja desinfectar folíolos de nogal pecanero adulto en agosto porque el tejido presenta oscurecimiento oxidativo desde el momento de su recolección, el cual se intensifica drásticamente tras la desinfección, con o sin aplicación de fungicida, dejando la totalidad de la superficie del folíolo severamente oscurecida e inviable.

#### **Concentración de sales de Murashige y Skoog**

Los resultados del presente estudio indican que el oscurecimiento en los explantes de hoja de nogal pecanero no aumenta al triplicar la concentración de sales de Murashige y Skoog, aun comparando explantes sembrados en abril (el mes en el que las hojas se encuentran más vigorosas) en medio adicionado con 1.46 g/L de sales MS, contra explantes sembrados en mayo en medio adicionado con 4.4 g/L de sales MS.

En otras investigaciones, sí se ha observado un cambio significativo en el oscurecimiento del tejido al alterar la concentración de sales MS en el medio de cultivo. Por ejemplo, Elmaataoui *et al.* (2020) cultivaron explantes de yemas adventicias de palma datilera en medios adicionados con 1/2 de la concentración basal de sales MS, y 1/3 de la concentración basal de sales MS, y comprobaron que los medios preparados con 1/2 de la concentración basal de sales MS provocaron un mayor porcentaje de tejido oscurecido.

Por otra parte, no hubo un cambio significativo en el porcentaje de explantes con callogénesis al triplicar la concentración de sales MS. Sin embargo, no se probaron las dos concentraciones de sales MS en el cultivo de folíolos recolectados el mismo mes.

#### **Fuente de carbono**

En el presente trabajo, el uso de glucosa como fuente de carbono en el medio de cultivo redujo significativamente el oscurecimiento de los explantes de hoja, pero también ocasionó un porcentaje de callogénesis significativamente inferior, en comparación con el de los explantes cultivados en medio suplementado con sacarosa o maltosa. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Martínez *et al.* (2021). Ellos observaron que un mayor número de explantes de hipocotilo, raíz primaria, hoja y tallo de *Taraxacum officinale* L. produjeron callo cuando fueron cultivados en medio adicionado con 32 g/L de sacarosa, que cuando fueron cultivados en medio suplementado con la misma concentración de glucosa, registrando callogénesis de

98.2±3.7% en los explantes en sacarosa, y 83.2± 3.1% de callogénesis en los explantes en glucosa.

Además, los resultados de oxidación y callogénesis en los explantes inoculados en medio adicionado con sacarosa y maltosa no presentaron diferencias estadísticamente significativas.

### Posición del explante sobre el medio de cultivo

En estudios preliminares, se observó que los explantes de nogal pecanero que incluían una parte de la nervadura principal del foliolo sufrían un severo y progresivo oscurecimiento oxidativo, por ello, en la presente investigación, los explantes fueron recortados evitando tomar parte de esa gruesa nervadura. De igual modo, en experimentos de cultivo *in vitro* de hojas de *Erigeron breviscapus*, se ha aconsejado evitar tomar explantes que contengan parte de la nervadura principal (Xing *et al.*, 2010). Aunque en otras especies vegetales se han obtenido resultados positivos al tomar explantes a partir de la zona de la nervadura central. Por ejemplo, en un estudio sobre la inducción de la callogénesis en hojas de *Sapindus mukorossi* Gaertn, se observó que era indispensable conservar un fragmento de la nervadura principal en el explante, de lo contrario, el tejido era incapaz de producir callo (Singh *et al.*, 2015).

En lo que respecta a la posición de siembra del explante de hoja, en el presente trabajo, se comprobó que al colocar la cara adaxial en contacto directo con el medio de cultivo, un mayor porcentaje de explantes producía callo, con un peso fresco y seco, así como un porcentaje de humedad superiores.

Nuestros resultados concuerdan con los de Gamage & Nakanishi (2000), quienes indujeron la producción de brotes adventicios en explantes de hoja de manzano (*Malus x domestica* Borkh.), y observaron una mayor generación, no sólo de brotes, sino que también de callos, en los explantes sembrados con el envés hacia arriba, en comparación con lo manifestado en explantes inoculados con el haz hacia arriba. De igual modo, en experimentos de cultivo *in vitro* de hojas de *Fragaria vesca*, el porcentaje de explantes con callo fue significativamente superior cuando éstos fueron inoculados en el medio de cultivo con la cara abaxial hacia arriba, en comparación con el resultado de sembrarlos en la posición opuesta (Sarker *et al.*, 2020).

Sin embargo, existen muchos estudios donde se revela que cultivar los explantes de hoja con el envés en contacto con el medio de cultivo, promueve mejores resultados. Por ejemplo, se ha comprobado que la posición de los explantes de cotiledón de tomate, sobre el medio de cultivo, influye en su respuesta organogénica ante un tratamiento hormonal. Después de tres semanas de incubación, se observó que sembrar los cotiledones en orientación abaxial, es decir, con el envés hacia abajo, dio mejores resultados que sembrar los explantes en orientación adaxial, o sea, con el haz hacia abajo. Colocar los cotiledones con el envés en contacto con el medio de cultivo permitió que un mayor porcentaje de explantes presentara brotes adventicios, que se formaran brotes más largos y que cada explante produjera un mayor número de brotes (Bhatia *et al.*, 2005).

En otra investigación, se probó el efecto de la inducción de callogénesis en explantes de hoja de *Moringa oleifera* sembrados en dirección abaxial y adaxial. En dicho estudio, los callos formados en los explantes sembrados en dirección adaxial tuvieron un volumen significativamente menor que los callos sembrados en dirección abaxial (Förster *et al.*, 2013).

En experimentos con hojas de *Achyranthes aspera*, se probaron diez dosis diferentes de ácido 2,4-diclorofenoxiacético, que iban de 0.1 a 4 mg/L, y se observó que, en general, inocular los explantes con la cara abaxial en contacto con el medio de cultivo, permitía que un mayor porcentaje de explantes produjera callos; especialmente ante la dosis de 1 mg/L, que fue la dosis probada en el presente estudio. En el caso de *A. aspera*, el 75% de los explantes que fueron sembrados con el envés en contacto con el medio adicionado con 1 mg/L de ácido 2,4-

diclorofenoxiacético, produjeron callo, mientras que ninguno de los explantes que fueron sembrados en la posición opuesta produjeron callo (Naz & Khatoon, 2014).

Estudiando la inducción de callos embriogénicos en explantes de hoja de *Sapindus mukorossi* Gaertn, se observó que todos los explantes produjeron callos cuando fueron sembrados con la cara abaxial en contacto con el medio de cultivo, mientras que sólo el 25% de los explantes presentaron formación de callo cuando se colocaron con la cara adaxial en contacto con el medio. Asimismo, se comprobó que sembrar los explantes con la cara adaxial hacia arriba aumentó de manera significativa la formación de embriones somáticos, en comparación con sembrarlos en la posición inversa (Singh *et al.*, 2015).

En otro estudio, la producción de brotes adventicios en explantes de hoja de manzano salvaje (*Malus sieversii*) fue más efectiva cuando los segmentos de hoja se inoculaban con la cara abaxial en contacto con el medio de cultivo que cuando fueron sembrados al revés (Zhang *et al.*, 2020).

En experimentos realizados con explantes de hoja de pera blanca (*Pyrus bretschneideri*), se vio que el número promedio de brotes adventicios formados por explante fue mayor cuando la cara abaxial estaba en contacto con el medio de cultivo, en comparación con el promedio observado en los explantes colocados con la cara adaxial en contacto con el medio de cultivo (Sun *et al.*, 2003).

Asimismo, los explantes de hoja de algunas especies vegetales pueden responder de manera indistinta al ser sembrados en diferente posición. Tal y como lo comprobaron Konate *et al.* (2013), al realizar el cultivo *in vitro* de cotiledones de *Vigna subterranea* (L.). Ellos observaron que la callogénesis es semejante cuando explante era inoculado en diferente posición, observándose que el 59.24% de los explantes producían callo cuando eran sembrados con el envés en contacto con el medio, y un 52.22% formaban callo si se les inoculaba con el haz en contacto con el medio. De manera similar, se ha comprobado que se pueden inducir brotes adventicios en hojas de pera japonesa (*Pyrus pyrifolia*), consiguiendo resultados semejantes al sembrar los explantes en posición abaxial o adaxial (Lane *et al.*, 1998). Y lo mismo ocurrió en experimentos realizados con hojas de arándano. En la investigación aludida, se explicó que las hojas de este arbusto están curvadas en dirección a la cara abaxial, razón por la cual, los explantes sembrados con la cara adaxial hacia abajo, tuvieron una mayor área en contacto con el medio, en comparación con los explantes sembrados con la cara abaxial hacia abajo. Sin embargo, en este caso, la posición del explante (abaxial o adaxial) no tuvo un efecto significativo sobre la inducción de brotes adventicios (Qu *et al.*, 2000).

### Tratamiento luminoso

Se sabe que la luz influye sobre la tasa de división celular, y la evolución del etileno, lo cual a su vez puede influir sobre la callogénesis. Por lo tanto, el fotoperiodo puede influir de manera significativa en los procesos morfogénicos que se manifiestan en el explante (Jaramillo & Summers, 1991).

En el presente estudio se observó que exponer los explantes de foliolo de nogal a un fotoperiodo, desde el inicio de su incubación, impidió la producción de callo. Mientras que la incubación en ausencia de luz permitió que, en la mayoría de los tratamientos, más del 80% de los explantes produjeran callo.

Estos resultados concuerdan con los de múltiples investigaciones en las que se han comprobado los beneficios de incubar los explantes en la oscuridad. Esto ha ocurrido al inducir la callogénesis en explantes de hipocotilo de *Ajuga bracteosa*. Con el objetivo de incrementar la biomasa de los callos iniciados, éstos fueron expuestos a tres diferentes tratamientos: (1) oscuridad continua, (2) fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 de oscuridad, y (3) iluminación

continua. Al término del experimento, se observó que los callos crecieron más cuando fueron incubados en oscuridad continua (Ali *et al.*, 2018).

También se ha realizado el cultivo de anteras de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) para la iniciación de callos. En dicho estudio, los callos desarrollados mediante la incubación en ausencia de luz durante 10 semanas, fueron 3.4 veces más grandes que los callos producidos mediante incubación con un periodo inicial de 5 semanas de oscuridad, seguido por 5 semanas de exposición a la luz. Incluso, se observó que, con cada semana adicional de incubación en la oscuridad, los callos lograron crecer 0.27 mm más (Jaramillo & Summers, 1991).

En otra investigación, se probó el efecto de la luz en explantes de hoja de lavanda (*Lavandula vera* L.) y zamarilla de los muros (*Teucrium chamaedrys* L.). Los tratamientos evaluados fueron: (1) oscuridad continua por 6 semanas, (2) 0-5 semanas en oscuridad continua, seguido por fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 de oscuridad. Al finalizar las seis semanas de incubación, se observó que los explantes de hoja de lavanda produjeron más callo al incrementar el periodo de incubación en ausencia de luz; no obstante, la formación de embriones somáticos se redujo conforme se aumentó el tiempo de incubación en la oscuridad. En lo que respecta a los explantes de hoja de zamarilla de los muros, el crecimiento del callo no se vio afectado por la presencia o ausencia de luz durante la incubación, sin embargo, la oscuridad favoreció la embriogénesis en el tejido (Kintzios *et al.*, 2002).

Asimismo, se ha trabajado en la inducción de brotes adventicios en explantes de hoja de *Erigeron breviscapus*. En este caso, la incubación durante 15 días en ausencia de luz permitió que un porcentaje significativamente mayor de explantes produjera brotes, mientras que la incubación ante un periodo de 16 h ocasionó una severa necrosis en los tejidos. Por otra parte, la incubación en la oscuridad durante un periodo superior a 15 días inhibió el desarrollo de brotes (Xing *et al.*, 2010).

Además, en una serie de experimentos realizados con el propósito de maximizar la callogénesis en explantes de hoja de *Moringa oleifera*, los explantes inicialmente fueron incubados durante 24 h en un ambiente iluminado y, posteriormente, fueron separados en un grupo que continuó expuesto a un fotoperiodo de 16 h de luz, y otro grupo que permaneció en la oscuridad. Al cabo de cuatro semanas, se evaluó el volumen de los callos, y se observó que los explantes expuestos a la luz desarrollaron callos con un volumen significativamente inferior al de los callos desarrollados mediante incubación en oscuridad continua (Förster *et al.*, 2013).

Por otro lado, también existen casos en los que un fotoperiodo puede ser significativamente beneficioso para el desarrollo del cultivo. Por ejemplo, en una serie de experimentos, se cultivaron explantes de cotiledón de *Basella rubra* L. Transcurridas 5 semanas, los callos incubados en iluminación continua fueron los que produjeron más biomasa (12.42 g), seguidos por los que estuvieron expuestos al fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 de oscuridad (9.02 g), y por último, los que estuvieron en oscuridad constante (4.28 g) (Kumar *et al.*, 2020).

También se ha investigado el efecto de la luz y la oscuridad en la inducción de callo y regeneración de la planta, a partir de cinco explantes diferentes de tres variedades de tabaco (*Nicotiana tabacum* L.). En las tres variedades, los cinco diferentes tipos de explantes respondieron mejor al fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 de oscuridad, que al tratamiento de oscuridad constante. En la incubación con fotoperiodo, se observó un mayor número de explantes con callo, una mayor cantidad de plantas regeneradas a partir del callo, un número superior de brotes por callo, e incluso una mayor supervivencia en la rusticación (Siddique & Islam, 2015).

#### ***Antioxidantes en el medio de cultivo***

En la presente investigación, la dosis de nitrato de plata probada propició, en los explantes de hoja, un índice de oscurecimiento y un porcentaje de callogénesis semejantes a los observados

en explantes que fueron colocados en medio de cultivo sin antioxidantes. Dichos resultados demuestran que el nitrato de planta no fue perjudicial para el tejido del explante y sugieren que posiblemente una diferente dosis podría tener un impacto más favorable.

Por su parte, los explantes de hoja de nogal, cultivados en medio adicionado con 1 g/L de carbón activado, sufrieron un oscurecimiento oxidativo significativamente menor que los explantes inoculados en medio sin adición de antioxidantes y que los explantes en medio adicionado con nitrato de planta. No obstante, el carbón activado provocó una severa sequedad en el tejido. Esto puede deberse a que el carbón activado es una sustancia higroscópica, es decir, se trata de una sustancia capaz de absorber la humedad del aire, así como el agua líquida; y su higroscopicidad varía según la temperatura empleada en su fabricación (CIOFU, 2015).

Ávila Treviño *et al.* (2013) también probaron el efecto del carbón activado en explantes de hoja de nogal pecanero; ellos adicionaron 10 g/L de carbón activado al medio de cultivo y lograron reducir el necrosamiento de manera significativa. Pero, en dicha investigación, no se evaluó la inhibición del oscurecimiento y la inducción de la callogénesis de manera simultánea, por lo que no se comprobó la conservación de la responsividad del explante ante la mencionada dosis de carbón activado.

El efecto perjudicial del carbón activado en el medio de cultivo, también ha sido observado en otros estudios. Como ha ocurrido en experimentos de cultivo *in vitro* de brotes de *Aloe vera*. Los resultados de dichos estudios demostraron que los explantes sembrados en medio de cultivo libre de antioxidantes, produjeron un mayor número de brotes que aquellos explantes que fueron sembrados en medio suplementado con 0.5, 1 o 2 g/L de carbón activado. Esto ocurre porque el carbón activado es un poderoso absorbente y, además de absorber las sustancias tóxicas del medio de cultivo, absorbe también algunos nutrientes, y grandes cantidades de fitorreguladores, lo cual puede inhibir el crecimiento *in vitro* (Das & Srivastav, 2015).

Pese a lo anterior, en muchos otros estudios se han medido los beneficios de incluir carbón activado en el medio de cultivo. Por ejemplo, Abdelwahd *et al.* (2008) trabajaron con explantes de yema cotiledonar, nudo cotiledonar e hipocotilo de *Vicia faba* L., y observaron que ninguno de los explantes cultivados en medio suplementado con 10 g/L de carbón activado presentaron oxidación, mientras que el 13.46% de los explantes del control sí presentaron oscurecimiento oxidativo.

En otro estudio, se cultivaron embriones cigóticos de palma de aceite en medio suplementado con 2 g/L de carbón activado y en medio sin la adición de este absorbente. Al término del experimento, se observó un porcentaje de supervivencia de explantes significativamente superior en el medio adicionado con carbón activado (Sparjanbabu *et al.*, 2019).

También es posible que la disparidad de resultados sea propiciada, al menos parcialmente, por la calidad del carbón activado utilizado, pues sus propiedades varían de acuerdo al método utilizado para su obtención y el material vegetal de origen (CIOFU, 2015). Además, la efectividad del carbón activado como promotor de la viabilidad y morfogénesis de los explantes depende del resto de los componentes del medio y del tejido vegetal cultivado (Pan & Van Staden, 1999).

Se sabe que el carbón activado promueve la organogénesis en explantes de diversas especies de plantas leñosas. Pero debe tomarse en cuenta que el material de origen del carbón activado, así como las impurezas, pueden influir en las propiedades del carbón. Por ello, en cultivo *in vitro* de tejidos vegetales, se recomienda utilizar carbón activado lavado en ácido y posteriormente neutralizado (Pan & van Staden, 1998). Aunque existe evidencia de que tanto el carbón activado lavado en ácido como el carbón activado neutralizado, alteran de manera significativamente el pH del medio de cultivo después del autoclavado (Owen *et al.*, 1991).



El pH del medio puede impactar la integridad de las moléculas de sacarosa, ya que la hidrólisis o inversión de la sacarosa es un proceso que puede ser catalizado por ácidos, bases, sales y enzimas (Torres *et al.*, 1994), liberando las moléculas de glucosa y fructosa que constituyen al disacárido (Jin *et al.*, 2015). Asimismo, se ha comprobado que el grado de hidrólisis de la sacarosa es proporcional a la concentración de carbón activado en el medio de cultivo (Pan & Van Staden, 1999).

Lo anterior ocurre por el efecto que tiene el carbón activado sobre el pH del medio. Ya se han hecho pruebas con medio para el cultivo *in vitro* de tejidos vegetales, ajustando el pH del medio a 5.7, previo al autoclavado, y se ha observado que el medio de cultivo libre de carbón activado puede sufrir una disminución de su pH después de la esterilización, adquiriendo un pH de 4.67, mientras que un medio con la misma composición pero suplementado con 5 g/L de carbón activado puede sufrir una elevación de su pH a 6.08 (Eymar *et al.*, 2000).

En otro estudio, se prepararon medios de cultivo adicionados con 2.5 g/L de diferentes tipos de carbón activado. Además, se incluyó un blanco, que consistió en medio de cultivo sin carbón activado. Tres de los productos probados indicaban haber pasado por un lavado ácido; otro producto indicaba haber sido neutralizado, y los otros tres productos no especificaban su tratamiento. Tras pasar 8 días de almacenaje, se midió el pH de los medios, y se observó que el único medio que sufrió una disminución de su pH tras el almacenaje fue el control. El resto de los medios sufrieron una elevación significativa de su pH, incluyendo el medio que fue adicionado con carbón activado neutralizado (Sáenz *et al.*, 2010).

Cabe señalar que la hidrólisis de la sacarosa a causa del autoclavado, puede favorecer o perjudicar el desarrollo del cultivo, y esto depende de la especie vegetal cultivada, pues hay especies en las que la fructosa inhibe el crecimiento (Pan & van Staden, 1998). Por ejemplo, en un estudio, se probó el efecto de la adición de diferentes fuentes de carbono (fructosa, glucosa, sacarosa y maltosa) al medio de cultivo utilizado para la inducción de la callogénesis en explantes de cotiledón e hipocotilo de algodón. Y se observó que los medios de cultivo suplementados con fructosa provocaron que un menor porcentaje de explantes produjera callo, y que hubiera una mayor secreción de compuestos fenólicos (Ganesan *et al.*, 2015).

Además de alterar el pH del medio y con ello influir sobre la hidrólisis de la sacarosa, el carbón activado ejerce su poder adsorbente sobre la sacarosa y sus componentes de manera particular. A saber, el carbón activado tiene mayor afinidad por los oligosacáridos, es decir, los azúcares de mayor peso molecular, que por los monosacáridos y disacáridos, que son azúcares de menor peso molecular (Kuhn *et al.*, 2014; Nobre *et al.*, 2019).

#### **Textura y color de los callos**

En los diferentes tratamientos del presente estudio, se observó la formación de callos blancos, marrones y amarillos. Como se observa en la tabla 7, los callos blancos tuvieron una textura compacta, y el porcentaje de humedad más bajo ( $79.58 \pm 8.30\%$ ). Los callos marrones presentaron una textura friable, y el contenido de agua más alto ( $89.52 \pm 0.87\%$ ), mientras que los callos amarillos tuvieron una textura variada con tendencia a la compactidad.

En explantes de hoja de *Byrsonima verbascifolia*, se han inducido callos friables, con un porcentaje de humedad de 90.14-94.81, y callos compactos con un porcentaje de humedad de 80.33-93.62 (Fonsêca Castro *et al.*, 2016). En dicho caso, el porcentaje de humedad no ha sido una característica distintiva entre callos friables y compactos.

Incluso, se ha descrito la obtención de callos compactos con un mayor porcentaje de humedad que los callos friables. Como explican Osman *et al.* (2016), quienes trabajaron con explantes de endospermo de *Barringtonia racemosa* L. y reportaron la obtención de callos friables frescos con un contenido de agua dentro del rango de 69.37-85.78%, y callos compactos con 82.33-92.86% de humedad.

Lo anterior demuestra que el contenido de agua no tiene que estar correlacionada con la friabilidad del callo. Por otra parte, Daffalla *et al.* (2019) explican que la humedad del callo puede ser aprovechada como un indicador de la viabilidad de las células que lo integran.

## CONCLUSIONES

Con la presente investigación se lograron identificar parámetros de recolección de muestras, desinfección y cultivo *in vitro*, fundamentales para la iniciación de callos en explantes de folíolo de nogal pecanero adulto. Los resultados destacaron el efecto promotor de recolectar el tejido vegetal en abril, y sembrar los explantes en medio adicionado con sacarosa, en ausencia de luz.

## LITERATURA CITADA

- Abahmane, L. (2011). Date palm micropropagation via organogenesis. *Date Palm Biotechnology*, 69–90. <https://doi.org/10.1007/978-94-007-1318-5>
- Abdelwahd, R., Hakam, N., Labhilili, M., & Udupa, S. M. (2008). Use of an adsorbent and antioxidants to reduce the effects of leached phenolics in *in vitro* plantlet regeneration of faba bean. *African Journal of Biotechnology*, 7(8), 997–1002. <https://doi.org/10.4314/ajb.v7i8.58590>
- Abdollahi, M. R., & Rashidi, S. (2017). Production and conversion of haploid embryos in chickpea (*Cicer arietinum* L.) anther cultures using high 2,4-D and silver nitrate containing media. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 133(1), 39–49. <https://doi.org/10.1007/s11240-017-1359-4>
- Ahmad, T., & Suzuki, Y. J. (2019). Juglone in oxidative stress and cell signaling. *Antioxidants*, 8(91). <https://doi.org/10.3390/antiox8040091>
- Ali, H., Khan, M. A., Nazifullah, & Khan, R. S. (2018). Impacts of hormonal elicitors and photoperiod regimes on elicitation of bioactive secondary volatiles in cell cultures of *Ajuga bracteosa*. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 183, 242–250. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2018.04.044>
- Alvidrez Villarreal, R., Hernández Castillo, F. D., García Martínez, O., Mendoza Villarreal, R., Rodríguez Herrera, R., & Aguilar, C. N. (2012). Isolation and pathogenicity of fungi associated to ambrosia borer (*Euplatypus segnis*) found injuring pecan (*Carya illinoensis*) wood. *Agricultural Sciences*, 3(3), 405–416. <https://doi.org/10.4236/as.2012.33048>
- Amini, J., & Sidovich, D. F. (2010). The effects of fungicides on *Fusarium oxysporum* F. sp. *Lycopersici* associated with *Fusarium* wilt of tomato. *Journal of Plant Protection Research*, 50(2), 172–178. <https://doi.org/10.2478/v10045-010-0029-x>
- Ávila Treviño, J. A., Arreola Ávila, J. G., Rodríguez de la O., J. L., Trejo Calzada, R., Valdez Cepeda, D., & Borja de la Rosa, A. (2013). Respuestas morfogénicas en la propagación *in vitro* de nogal pecanero (*Carya illinoensis* [Wangenh] K. Koch). *Revista Chapingo, Serie Ciencias Forestales y Del Ambiente*, 19(3), 469–481. <https://doi.org/10.5154/r.rchscfa.2013.09.037>
- Babaei, N., Abdullah, N. A. P., Saleh, G., & Abdullah, T. L. (2013). Control of contamination and explant browning in *Curculigo latifolia* *in vitro* cultures. *Journal of Medicinal Plants Research*, 7(8), 448–454. <https://doi.org/10.5897/JMPR12.859>
- Baibakova, E. V., Nefedjeva, E. E., Suska-Malawska, M., Wilk, M., Sevriukova, G. A., & Zheltobriukhov, V. F. (2019). Modern fungicides: mechanisms of action, fungal resistance and phytotoxic effects. *Annual Research & Review in Biology*, 32(3), 1–16. <https://doi.org/10.9734/arrb/2019/v32i330083>
- Benson, E. E. (2003). *Plant conservation biotechnology*. CRC Press.
- Benson, E. E. (2000). Special symposium: *in vitro* plant recalcitrance do free radicals have a

- role in plant tissue culture recalcitrance. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, 36(3), 163–170. <https://doi.org/10.1007/s11627-000-0032-4>
- Benucci, G. M. N., Bonito, G., Falini, L. B., Bencivenga, M., & Donnini, D. (2012). Mycorrhizal inoculation of pecan seedlings with some marketable truffles. *Acta Mycologica*, 47(2), 179–184. <https://doi.org/10.5586/am.2012.022>
- Bhatia, P., Ashwath, N., & Midmore, D. J. (2005). Effects of genotype, explant orientation, and wounding on shoot regeneration in tomato. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, 41, 457–464. <https://doi.org/10.1079/IVP2005649>
- Burns, J. A., & Wetzstein, H. Y. (1995). Development and germination of pecan somatic embryos derived from liquid culture. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 31, 72–78. <https://doi.org/10.1007/BF02632240>
- Burns, J. A., & Wetzstein, H. Y. (1997). Development and characterization of embryogenic suspension cultures of pecan. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 48, 93–102. <https://doi.org/10.1023/A:1005832331593>
- CIOFU. (2015). Activated carbon (charcoal) obtaining. Application. *Fiabilitate Si Durabilitate - Fiability & Durability Supplement*, 98–103.
- Coyle, H. M. (2004). *Forensic botany: principles and applications to criminal casework*. CRC Press. <http://eprints.uanl.mx/5481/1/1020149995.PDF>
- Daffalla, H. M., Elsheikh, A. M., Ali, H. A., & Khalafalla, M. M. (2019). Callus maintenance and cell line selection of *Grewia tenax*. *Journal of Herbs, Spices and Medicinal Plants*, 1–18. <https://doi.org/10.1080/10496475.2019.1595256>
- Das, P., & Srivastav, A. K. (2015). To study the effect of activated charcoal, ascorbic acid and light duration on *in vitro* micropropagation of *Aloe vera* L. *International Journal of Innovative Research in Science, Engineering and Technology*, 4(5), 3131–3138. <https://doi.org/10.15680/IJIRSET.2015.0405091>
- Degani, O., & Kalman, B. (2021). Assessment of commercial fungicides against onion (*Allium cepa*) basal rot disease caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *cepae* and *Fusarium acutatum*. *Journal of Fungi*, 7(235). <https://doi.org/10.3390/jof7030235>
- Dhiman, M., Sharma, L., Singh, A., & Sharma, M. M. (2020). Exsitu conservation using *in vitro* methods of an endangered plant *Sterculia urens* Roxb.: A high volume trade plant for gum karaya. *Industrial Crops and Products*, 158, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.113015>
- Elhiti, M., & Stasolla, C. (2011). The use of zygotic embryos as explants for *in vitro* propagation: an overview. In T. Thorpe & E. Yeung (Eds.), *Plant Embryo Culture. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols)* (Vol. 710, pp. 229–255). Humana Press. [https://doi.org/10.1007/978-1-61737-988-8\\_17](https://doi.org/10.1007/978-1-61737-988-8_17)
- Elmaataoui, S., Mazri, M. A., Meziani, R., & Bouchiha, F. (2020). Effects of culture medium strength and antioxidants on adventitious bud multiplication, hyperhydricity and tissue browning of sate palm cv. Aziza Bouzid. *World Journal of Advanced Research and Reviews*, 6(2), 103–109. <https://doi.org/10.30574/wjarr>
- Eymar, E., Alegre, J., Toribio, M., & López-Vela, D. (2000). Effect of activated charcoal and 6-benzyladenine on *in vitro* nitrogen uptake by *Lagerstroemia indica*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 63(1), 57–65. <https://doi.org/10.1023/A:1006471519609>
- Fonsêca Castro, A. H., de Queiroz Braga, K., Martinez de Sousa, F., Coimbra, M. C., & Russo Chagas, R. C. (2016). Callus induction and bioactive phenolic compounds production from *Byrsonima verbascifolia* (L.) DC. (Malpighiaceae). *Revista Ciencia Agrônômica*, 47(1), 143–151. <https://doi.org/10.5935/1806-6690.20160017>
- Förster, N., Mewis, I., & Ulrichs, C. (2013). *Moringa oleifera*-Establishment and multiplication of different ecotypes *in vitro*. *Gesunde Pflanzen*, 65(1), 21–31. <https://doi.org/10.1007/s10343-013-0291-8>
- Gamage, N., & Nakanishi, T. (2000). *In vitro* shoot regeneration from leaf tissue of apple (cultivar 'Orine'): high shoot proliferation using carry over effect of TDZ. In L. H. W. van del Plas (Ed.), *XXV International Horticultural Congress, Part 10: Application of Biotechnology and Molecular Biology and Breeding-In Vitro* (pp. 291–300). Acta Horticulturae.

- Gammoudi, N., Zerria, K., Nagaz, K., & Ferchichi, A. (2019). Enhancement of capsaicinoids in vitro production by abiotic elicitors in placenta-derived callus of *Capsicum annuum* L. Tunisian var. 'Baklouti Medenine.' *Biologia*, 74, 725–732. <https://doi.org/10.2478/s11756-019-00237-8>
- Ganesan, P., Subiramani, S., Govindarajan, S., Sadasivam, V., Manickam, V., Mogilicherla, K., Thiruppathi, S. K., & Narayanasamy, J. (2015). Evaluation of different carbon sources for high frequency callus culture with reduced phenolic secretion in cotton (*Gossypium hirsutum* L.) cv. SVPR-2. *Biotechnology Reports*. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2015.05.005>
- Golkar, P., Moradi, M., & Garousi, G. A. (2019). Elicitation of stevia glycosides using salicylic acid and silver nanoparticles under callus culture. *Sugar Tech*, 21(4), 569–577. <https://doi.org/10.1007/s12355-018-0655-6>
- Huh, Y. S., Lee, J. K., & Nam, S. Y. (2017). Effect of plant growth regulators and antioxidants on *in vitro* plant regeneration and callus induction from leaf explants of purple passion fruit (*Passiflora edulis* Sims). *Journal of Plant Biotechnology*, 44, 335–342. <https://doi.org/10.5010/JPB.2017.44.3.335>
- Jaramillo, J., & Summers, W. L. (1991). Dark–Light treatments influence induction of tomato anther callus. *HortScience*, 26(7), 915–916. <https://doi.org/10.21273/hortsci.26.7.915>
- Jin, J., Liu, W., Deng, S., Han, Y., Cai, Y., & Hui, G. (2015). Glucose, D-fructose, and sucrose non-enzyme quantitative analysis method based on Cu foam electrode. *Electrochimica Acta*, 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2014.11.194>
- Kamdi, D. R., Mondhe, M. K., Jadesha, G., Kshirsagar, D. N., & Thakur, K. D. (2012). Efficacy of botanicals, bio-agents and fungicides against *Fusarium oxysporum* F. Sp. Ciceri, in chickpea wilt sick plot. *Annals of Biological Research*, 3(11), 5390–5392.
- Kintzios, S., Papanastasiou, I., Turgelis, P., Papastellatos, C., Georgopoulos, V., & Drossopoulos, J. (2002). The effects of light on callus growth and somatic embryogenesis from *Lavandula vera* and *Teucrium chamaedrys*: A preliminary study. *Journal of Herbs, Spices and Medicinal Plants*, 9(2 & 3), 223–227. [https://doi.org/10.1300/J044v09n02\\_32](https://doi.org/10.1300/J044v09n02_32)
- Konate, S., Kone, M., Kouakou, H. T., Kouadio, J. Y., & Zouzou, M. (2013). Callus induction and proliferation from cotyledon explants in Bambara groundnut. *African Crop Science Journal*, 21(3), 255–263.
- Krishnaraj, C., Ramachandran, R., Mohan, K., & Kalaichelvan, P. T. (2012). Optimization for rapid synthesis of silver nanoparticles and its effect on phytopathogenic fungi. *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 93, 95–99. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2012.03.002>
- Kuhn, R. C., Mazutti, M. A., Albertini, L. B., & Filho, F. M. (2014). Evaluation of fructooligosaccharides separation using a fixed-bed column packed with activated charcoal. *New Biotechnology*, 31(3), 237–241. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2014.02.005>
- Kumar, S. S., Arya, M., Mahadevappa, P., & Giridhar, P. (2020). Influence of photoperiod on growth, bioactive compounds and antioxidant activity in callus cultures of *Basella rubra* L. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 209. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2020.111937>
- Kumar, S., & Sharma, S. (2005). Somatic embryogenesis and cryopreservation of walnut (*Juglans regia* L.) and pecan (*Carya illinoensis* Koch). *Acta Horticulturae*, 143–147. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2005.696.24>
- Kumar, V., Parvatam, G., & Ravishankar, G. A. (2009). AgNO<sub>3</sub> - A potential regulator of ethylene activity and plant growth modulator. *Electronic Journal of Biotechnology*, 12(2), 1–15. <https://doi.org/10.2225/vol12-issue2-fulltext-1>
- Lane, W. D., Iketani, H., & Hayashi, T. (1998). Shoot regeneration from cultured leaves of Japanese pear (*Pyrus pyrifolia*). *Plan Cell, Tissue and Organ Culture*, 54, 9–14.
- Leyva Corona, J. C., Armenta Castelo, D. I., Zamorano Algandar, R., Thomas, M. G., Rincon, G., Medrano, J. F., Rivera Acuña, F., Reyna Granados, J. R., & Luna Nevárez, P. (2015). Variables climáticas asociadas a la producción de leche en vacas Holstein criadas bajo condiciones de estrés por calor del Valle del Yaqui, México. *Revista Latinoamericana de Recursos Naturales*, 11(1), 1–11.

- <https://www.redalyc.org/pdf/495/49549092012.pdf>
- Litz, R. E. (2005). Biotechnology of fruit and nut crops. In *Ocean Modelling*. CABI Publishing. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ocemod.2013.04.010><http://dx.doi.org/10.1016/j.ocemod.2011.06.003><http://dx.doi.org/10.1016/j.ocemod.2008.12.004><http://dx.doi.org/10.1016/j.ocemod.2014.08.008><http://dx.doi.org/10.1016/j.jcp.2009.08.006>
- Malik, W. A., Mahmood, I., Razzaq, A., Afzal, M., Shah, G. A., Iqbal, A., Zain, M., Ditta, A., Asad, S. A., Ahmad, I., Mangi, N., & Ye, W. (2021). Exploring potential of copper and silver nano particles to establish efficient callogenesis and regeneration system for wheat (*Triticum aestivum* L.). *GM Crops and Food*, 1(1), 1–22. <https://doi.org/10.1080/21645698.2021.1917975>
- Martinez, M. E., Jorquera, L., Poirrier, P., Díaz, K., & Chamy, R. (2021). Effect of the carbon source and plant growth regulators (Pgrs) in the induction and maintenance of an in vitro callus culture of *Taraxacum officinale* (L) weber ex F.H. wigg. *Agronomy*, 11(6). <https://doi.org/10.3390/agronomy11061181>
- Mathews, H., & Wetzstein, H. Y. (1993). A revised protocol for efficient regeneration of somatic embryos and acclimatization of plantlets in pecan, *Carya illinoensis*. *Plant Science*, 91(1), 103–108. [https://doi.org/10.1016/0168-9452\(93\)90193-4](https://doi.org/10.1016/0168-9452(93)90193-4)
- McGranahan, G. H., Leslie, C. A., Dandekar, A. M., Uratsu, S. L., & Yates, I. E. (1993). Transformation of pecan and regeneration of transgenic plants. *Plant Cell Reports*, 12(11), 634–638. <https://doi.org/10.1007/BF00232814>
- Modeste, K. K., Eliane, M. T., Daouda, K., Brahima, S. A., Tchoa, K., Kouablan, K. E., & Mongomaké, K. (2017). Effect of antioxidants on the callus induction and the development of somatic embryogenesis of cocoa [*Theobroma cacao* (L.)]. *Australian Journal of Crop Science*, 11(1), 25–31. <https://doi.org/10.21475/ajcs.2017.11.01.pne174>
- Naz, S., & Khatoon, K. (2014). The effect of auxins on callus induction in *Achyranthes aspera*. *Pakistan Journal of Botany*, 46(6), 2203–2207.
- Nel, B., Steinberg, C., Labuschagne, N., & Viljoen, A. (2007). Evaluation of fungicides and sterilants for potential application in the management of *Fusarium* wilt of banana. *Crop Protection*, 26, 697–705. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2006.06.008>
- Nikam, P. S., Jagtap, G. P., & Sontakke, P. L. (2007). Management of chickpea wilt caused by *Fusarium oxysporium* f. sp. ciceri. *African Journal of Agricultural Research*, 2(12), 692–697.
- Nobre, C., Caitano do Nascimento, A. K., Pires Silva, S., Coelho, E., Coimbra, M. A., Holanda Cavalcanti, M. T., Teixeira, J. A., & Figueiredo Porto, A. L. (2019). Process development for the production of prebiotic fructo-oligosaccharides by *Penicillium citreonigrum*. *Bioresource Technology*, 282, 464–474. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.03.053>
- Obeidy, A. A., & Smith, M. A. L. (1993). Organogenesis from mature pecan cotyledons and embryonic axes. *HortScience*, 28(3), 213–215. <https://doi.org/10.21273/hortsci.28.3.213>
- Osman, N. I., Sidik, N. J., & Awal, A. (2016). Effects of variations in culture media and hormonal treatments upon callus induction potential in endosperm explant of *Barringtonia racemosa* L. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 6(2), 143–147. <https://doi.org/10.1016/j.apjtb.2015.10.007>
- Ovington, L. G. (2007). Advances in wound dressings. *Clinics in Dermatology*, 25(1), 33–38. <https://doi.org/10.1016/j.clindermatol.2006.09.003>
- Owen, H. R., Wengerd, D., & Miller, A. R. (1991). Culture medium pH is influenced by basal medium, carbohydrate source, gelling agent, active charcoal, and medium storage method. *Plant Cell Reports*, 10, 583–586.
- Özer, N., & Köycü, N. D. (1998). Evaluation of seed treatments for controlling *Aspergillus niger* and *Fusarium oxysporum* on onion seed. *Phytopathologia Mediterranea*, 37(1), 33–40.
- Pan, M. J., & van Staden, J. (1998). The use of charcoal in *in vitro* culture - A review. *Plant Growth Regulation*, 26, 155–163. <https://doi.org/10.1023/A:1006119015972>



- Pan, M. J., & Van Staden, J. (1999). Effect of activated charcoal, autoclaving and culture media on sucrose hydrolysis. *Plant Growth Regulation*, 29, 135–141. <https://doi.org/10.1023/A:1006238300890>
- Payghamzadeha, K., & Kazemitabar, S. K. (2010). The effects of BAP, IBA and genotypes on *in vitro* germination of immature walnut embryos. *International Journal of Plant Production*, 4(4), 309–322. <https://doi.org/10.22069/ijpp.2012.714>
- Poddar, R. K., Singh, D. V., & Dubey, S. C. (2004). Management of chickpea wilt through combination of fungicides and bioagents. *Indian Phytopath*, 57(1), 39–43.
- Poletto, T., Brião Muniz, M. F., Fantinel, V. S., Harakava, R., & Rolim, J. M. (2020). Characterization and pathogenicity of *Fusarium oxysporum* associated with *Carya illinoensis* seedlings. *Floresta e Ambiente*, 27(2), 1–9. <https://doi.org/10.1590/2179-8087.108917>
- Pooja. (2004). *Physiology of angiosperms*. Discovery Publishing House.
- Qu, L., Polashock, J., & Vorsa, N. (2000). A highly efficient *in vitro* cranberry regeneration system using leaf explants. *HortScience*, 35(5), 948–952. <https://doi.org/10.21273/hortsci.35.5.948>
- Renukdas, N. N., Manoharan, M., & Garner, J. O. (2010). *In vitro* propagation of pecan [*Carya illinoensis* (Wangenh) K. Koch]. *Plant Biotechnology*, 27(2), 211–215. <https://doi.org/10.5511/plantbiotechnology.27.211>
- Rodriguez, A. P. M., & Wetzstein, H. Y. (1994). The effect of auxin type and concentration on pecan (*Carya illinoensis*) somatic embryo morphology and subsequent conversion into plants. *Plant Cell Reports*, 13, 607–611. <http://www.springerlink.com/index/n12h61vh462n23wv.pdf>
- Rodriguez, A. P. M., & Wetzstein, H. Y. (1998). A morphological and histological comparison of the initiation and development of pecan (*Carya illinoensis*) somatic embryogenic cultures induced with naphthaleneacetic acid or 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. *Protoplasma*, 204(1–2), 71–83. <https://doi.org/10.1007/BF01282295>
- Sáenz, L., Herrera-Herrera, G., Uicab-Ballote, F., Chan, J. L., & Oropeza, C. (2010). Influence of form of activated charcoal on embryogenic callus formation in coconut (*Cocos nucifera*). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 100, 301–308. <https://doi.org/10.1007/s11240-009-9651-6>
- Salar, R. K., Gahlawat, S. K., Siwach, P., & Duhan, J. S. (2013). *Biotechnology: prospects and applications* (R. K. Salar, S. K. Gahlawat, P. Siwach, & J. S. Duhan (eds.); 1st ed.). <https://doi.org/10.1007/978-81-322-1683-4>
- Sarker, B. C., Archbold, D. D., Geneve, R. L., & Kester, S. T. (2020). Rapid *in vitro* multiplication of non-runnering *Fragaria vesca* Genotypes from seedling shoot axillary bud explants. *Horticulturae*, 6(51), 1–8. <https://doi.org/10.3390/horticulturae6030051>
- Shalaby, S., & Horwitz, B. A. (2015). Plant phenolic compounds and oxidative stress: integrated signals in fungal–plant interactions. *Current Genetics*, 61(3), 347–357. <https://doi.org/10.1007/s00294-014-0458-6>
- Siddique, A. B., & Islam, S. S. (2015). Effect of light and dark on callus induction and regeneration in tobacco (*Nicotiana tabacum* L.). *Bangladesh Journal of Botany*, 44(4), 643–651. <https://doi.org/10.3329/bjb.v44i4.38636>
- Singh, R., Rai, M. K., & Kumari, N. (2015). Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Sapindus mukorossi* Gaertn. from leaf-derived callus induced with 6-benzylaminopurine. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 177, 498–510. <https://doi.org/10.1007/s12010-015-1758-0>
- Sparjanbabu, D. S., Kumar, P. N., Krishna, M. S. R., Ramajayam, D., & Susanthi, B. (2019). Effect of activated charcoal, culture media and plant growth regulators on *in vitro* germination and development of elite dura oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) zygotic embryos. *Plant Cell Biotechnology and Molecular Biology*, 20(7 & 8), 314–323.
- Sun, Q.-R., Fan, S.-H., & Liu, Q.-Z. (2003). High frequency shoot regeneration from giant dunkpear leaves *in vitro*. *Shandong Agricultural Sciences*, 2, 10–12.
- Talley, S. M., Coley, P. D., & Kursar, T. A. (2002). The effects of weather on fungal abundance

**Recibido:**  
3/agosto/2022

**Aceptado:**  
12/enero/2023

- and richness among 25 communities in the Intermountain West. *BMC Ecology*, 2, 7–10. <https://doi.org/10.1186/1472-6785-2-7>
- Thomas, T. D. (2008). The role of activated charcoal in plant tissue culture. *Biotechnology Advances*, 26(6), 618–631. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2008.08.003>
- Thompson, T. E., & Conner, P. J. (2011). Pecan. In M. Badenes & D. Byrne (Eds.), *Fruit breeding* (pp. 771–801). Springer. [https://doi.org/10.1007/978-1-4419-0763-9\\_20](https://doi.org/10.1007/978-1-4419-0763-9_20)
- Titov, S., Bhowmik, S. K., Mandal, A., Alam, M. S., & Uddin, S. N. (2006). Control of phenolic compound secretion and effect of growth regulators for organ formation from *Musa* spp. cv. Kanthali floral bud explants. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*, 2(3), 97–104. <https://doi.org/10.3844/ajbbsp.2006.97.104>
- Torres, A. P., Oliveira, F. A. R., Silva, C. L. M., & Fortuna, S. P. (1994). The influence of pH on the kinetics of acid hydrolysis of sucrose. *Journal of Food Process Engineering*, 17, 191–208. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4530.1994.tb00335.x>
- Vendrame, W. A., Kochert, G., & Wetzstein, H. Y. (1999). AFLP analysis of variation in pecan somatic embryos. *Plant Cell Reports*, 18(10), 853–857. <https://doi.org/10.1007/s002990050673>
- Warchoń, M., Juzoń, K., Dziurka, K., Czyczyło-Mysza, I., Kapłoniak, K., Marcińska, I., & Skrzypek, E. (2021). The effect of zinc, copper, and silver ions on oat (*Avena sativa* L.) androgenesis. *Plants*, 10(2), 1–11. <https://doi.org/10.3390/plants10020248>
- Wetzstein, H. Y., Ault, J. R., & Merkle, S. A. (1989). Further characterization of somatic embryogenesis and plantlet regeneration in pecan (*Carya illinoensis*). *Plant Science*, 64, 193–201.
- Wetzstein, H. Y., Merkle, S. A., & Ault, J. R. (1990). Factor influencing somatic embryogenesis and plantlet regeneration in pecan, *Carya illinoensis*. *Acta Horticulturae*, 280, 69–73.
- Xiang, X. G., Zhang, J. B., Lu, A. M., & Li, R. Q. (2011). Molecular identification of species in Juglandaceae: A tiered method. *Journal of Systematics and Evolution*, 49(3), 252–260. <https://doi.org/10.1111/j.1759-6831.2011.00116.x>
- Xing, Z. Y., Yuan, H. Y., Wang, L. F., & Zheng, L. P. (2010). Regenerating plants from in vitro culture of *Erigeron breviscapus* leaves. *African Journal of Biotechnology*, 9(26), 4022–4024. <https://doi.org/10.4314/ajb.v9i26>
- Yaseen, M., Ahmad, T., Sablok, G., Standardi, A., & Hafiz, I. A. (2013). Review: role of carbon sources for *in vitro* plant growth and development. *Molecular Biology Reports*, 40, 2837–2849. <https://doi.org/10.1007/s11033-012-2299-z>
- Zhang, Y., Bozorov, T. A., Li, D. X., Zhou, P., Wen, X. J., Ding, Y., & Zhang, D. Y. (2020). An efficient in vitro regeneration system from different wild apple (*Malus sieversii*) explants. *Plant Methods*, 16(56), 1–10. <https://doi.org/10.1186/s13007-020-00599-0>