



# UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

---



**COORDINACIÓN GENERAL DE ESTUDIOS DE POSGRADO**

**PROGRAMA INSTITUCIONAL DE MAESTRÍA  
EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**FACULTAD DE QUÍMICO FARMACOBIOLOGÍA  
ÁREA TEMÁTICA: BIOTECNOLOGÍA ALIMENTARIA**

**TESIS**

**Efecto de la diferenciación celular en el contenido de fenoles y actividad  
antioxidante de extractos de cultivos *in vitro* de  
zapote blanco (*Casimiroa edulis* La Llave et Lex.)**

**P r e s e n t a:**

**IBT. JUAN CHRISTIAN ALTAMIRANO LÓPEZ**

**Para obtener el título de:**

**Maestro en Ciencias Biológicas**

**Director de Tesis:**

**DR. RAFAEL SALGADO GARCIGLIA**

**Co-Directora de Tesis:**

**DRA. ALEJANDRA HERNÁNDEZ GARCÍA**



---

**Mayo, 2024. Morelia, Michoacán.**

## OFICIO DE FIRMAS ACEPTACIÓN TESIS



### Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo

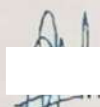
DRA. MARTHA ELENA PEDRAZA SANTOS  
COORDINADORA GENERAL DEL PROGRAMA INSTITUCIONAL DE  
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
PRESENTE

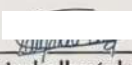
Por este conducto nos permitimos comunicarle que después de haber revisado el manuscrito final de la Tesis Titulada: "Efecto de la diferenciación celular en el contenido de fenoles y actividad antioxidante de extractos de cultivos *in vitro* de zapote blanco (*Cosmibuena edulis* La Llave et Lex.)" presentado por el IBT. Juan Christian Altamirano López con Número de Matrícula 07012476, consideramos que reúne los requisitos suficientes para ser publicado y defendido en Examen de Grado de Maestro en Ciencias.

Sin otro particular por el momento, reiteramos a usted un cordial saludo.

ATENTAMENTE  
Morelia, Michoacán, a 30 de abril de 2024

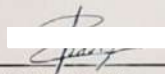
#### COMITÉ SINODAL

  
Dr. Rafael Salgado Garciglia  
Director de Tesis

  
Dra. Alejandra Hernández García  
Co directora

  
Dr. Héctor Eduardo Martínez Flores  
Presidente

  
Dr. Rodolfo López Gómez  
Vocal I

  
Dra. Patricia Ríos Chávez  
Vocal 2

***Esta investigación se realizó en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal del Instituto de Investigaciones Químico Biológicas de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, bajo la dirección del Dr. Rafael Salgado Garciglia y Dra. Alejandra Hernández García.***



## **DEDICATORIA**

*Para todas las personas que creyeron en mí.*

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, en especial al Programa Institucional de Maestría en Ciencias Biológicas, Área Temática de Biotecnología Alimentaria, por brindarme la oportunidad de realizar mis estudios de posgrado.

Al CONACYT, por la beca otorgada para la realización de mis estudios de maestría.

A mis directores de tesis, el Dr. Rafael Salgado Garciglia y la Dra. Alejandra Hernández García, por darme la oportunidad de trabajar en el laboratorio y brindarme las herramientas necesarias para realizar esta investigación. Agradezco toda la ayuda y conocimiento compartido durante estos años.

A los miembros del comité sinodal, conformado por el Dr. Héctor Eduardo Martínez Flores, el Dr. Rodolfo López Gómez y la Dra. Patricia Ríos Chávez, por sus valiosas aportaciones para mejorar esta investigación. En especial, agradezco al Dr. Héctor y a la Dra. Patricia por impartirme clases y compartir su conocimiento.

A la M.C. Patricia Silva Sáenz, curadora de la colección de Plantas Vasculares del Herbario EBUM de la Facultad de Biología de la UMSNH, por la determinación taxonómica.

Agradezco especialmente a mis padres, Rosa María López y Juan Altamirano, por todo su esfuerzo para ayudarme a seguir mis sueños. A mi hermano Josué, por todo su apoyo.

A Beatriz, por estar a mi lado en los buenos y malos momentos, y por darme ánimos cuando más lo necesitaba.

A mis compañeros de laboratorio, quienes hicieron amena la convivencia en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal, en especial a Kathia, por todo su apoyo en la parte experimental y sus conocimientos.

A mis compañeros de maestría, en especial Agustín, Carlos y Fernando, por las aventuras que compartimos.

A mis amigos, por estar conmigo en este camino.

## ÍNDICE GENERAL

### Página

|                                                                                                                                                                                                                                                                              |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| ÍNDICE DE CUADROS.....                                                                                                                                                                                                                                                       | i  |
| ÍNDICE DE FIGURAS.....                                                                                                                                                                                                                                                       | ii |
| RESUMEN.....                                                                                                                                                                                                                                                                 | iv |
| ABSTRACT.....                                                                                                                                                                                                                                                                | v  |
| 1. INTRODUCCIÓN .....                                                                                                                                                                                                                                                        | 1  |
| 2. ANTECEDENTES .....                                                                                                                                                                                                                                                        | 4  |
| 2.1. Zapotes .....                                                                                                                                                                                                                                                           | 4  |
| 2.2. Zapote blanco ( <i>Casimiroa edulis</i> ).....                                                                                                                                                                                                                          | 4  |
| 2.2.1. Taxonomía del zapote blanco.....                                                                                                                                                                                                                                      | 5  |
| 2.2.2. Distribución.....                                                                                                                                                                                                                                                     | 6  |
| 2.2.3. Usos y propiedades medicinales del zapote blanco .....                                                                                                                                                                                                                | 6  |
| 2.2.4. Principales metabolitos secundarios y actividad biológica del zapote blanco .....                                                                                                                                                                                     | 7  |
| 2.2.5. Actividad antioxidante y contenido de compuestos fenólicos de zapote blanco .....                                                                                                                                                                                     | 8  |
| 2.3. Variación del contenido y grupos de metabolitos secundarios en plantas .....                                                                                                                                                                                            | 9  |
| 2.4. Producción de metabolitos secundarios <i>in vitro</i> .....                                                                                                                                                                                                             | 10 |
| 2.4.1. Variación de metabolitos secundarios <i>in vitro</i> .....                                                                                                                                                                                                            | 11 |
| 2.5. Cultivos <i>in vitro</i> de zapote blanco .....                                                                                                                                                                                                                         | 13 |
| 3. JUSTIFICACIÓN .....                                                                                                                                                                                                                                                       | 14 |
| 4. HIPÓTESIS .....                                                                                                                                                                                                                                                           | 15 |
| 5. OBJETIVOS.....                                                                                                                                                                                                                                                            | 16 |
| 5.1. Objetivo general .....                                                                                                                                                                                                                                                  | 16 |
| 5.1.1 Objetivos específicos . .....                                                                                                                                                                                                                                          | 16 |
| 6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL .....                                                                                                                                                                                                                                             | 17 |
| 7. RESULTADOS .....                                                                                                                                                                                                                                                          | 18 |
| 7.1. Capítulo I: Efecto de rutinas de asepsia y estación de recolecta de segmentos nodales de ramas jóvenes de un árbol adulto de zapote blanco ( <i>Casimiroa edulis</i> ) durante el establecimiento <i>in vitro</i> para la inducción de callos, brotes y plántulas ..... | 18 |
| Resumen .....                                                                                                                                                                                                                                                                | 18 |
| Introducción.....                                                                                                                                                                                                                                                            | 19 |
| Materiales y métodos .....                                                                                                                                                                                                                                                   | 21 |
| Material biológico .....                                                                                                                                                                                                                                                     | 21 |
| Medios y condiciones de cultivo.....                                                                                                                                                                                                                                         | 22 |
| Establecimiento del cultivo <i>in vitro</i> .....                                                                                                                                                                                                                            | 23 |
| Inducción de la formación de callos, brotes, raíces y plántulas .....                                                                                                                                                                                                        | 23 |
| Cinética de crecimiento de callos .....                                                                                                                                                                                                                                      | 25 |
| Análisis estadístico.....                                                                                                                                                                                                                                                    | 25 |
| Resultados .....                                                                                                                                                                                                                                                             | 25 |
| Selección de la rutina de asepsia óptima para el establecimiento <i>in vitro</i> .....                                                                                                                                                                                       | 25 |
| Medio de cultivo para la formación y desarrollo de callo .....                                                                                                                                                                                                               | 29 |
| Determinación del crecimiento de callo.....                                                                                                                                                                                                                                  | 31 |
| Medio de cultivo para la formación y desarrollo de brotes .....                                                                                                                                                                                                              | 32 |
| Medio de enraizamiento de brotes y formación de plántulas .....                                                                                                                                                                                                              | 34 |
| Conclusiones .....                                                                                                                                                                                                                                                           | 35 |
| Referencias.....                                                                                                                                                                                                                                                             | 36 |

|                                                                                                                                                                                                                           |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>7.2.Capítulo II. Actividad antioxidante y contenido de compuestos fenólicos en hojas y tallos de una planta adulta y de cultivos <i>in vitro</i> (callos y plántulas) de zapote blanco (<i>Casimiroa edulis</i>)..</b> | 41 |
| <b>Resumen .....</b>                                                                                                                                                                                                      | 41 |
| <b>Introducción.....</b>                                                                                                                                                                                                  | 41 |
| <b>Materiales y métodos .....</b>                                                                                                                                                                                         | 44 |
| Material biológico .....                                                                                                                                                                                                  | 44 |
| Obtención de los extractos .....                                                                                                                                                                                          | 44 |
| Determinación de fenoles totales .....                                                                                                                                                                                    | 44 |
| Determinación de flavonoides totales .....                                                                                                                                                                                | 45 |
| Actividad antioxidante por DPPH•.....                                                                                                                                                                                     | 45 |
| Actividad antioxidante por ABTS <sup>•+</sup> .....                                                                                                                                                                       | 46 |
| Actividad antioxidante total por método de fosfomolibdeno .....                                                                                                                                                           | 46 |
| <b>Análisis estadístico.....</b>                                                                                                                                                                                          | 47 |
| <b>Resultados .....</b>                                                                                                                                                                                                   | 47 |
| Actividad antioxidante .....                                                                                                                                                                                              | 47 |
| Determinación de fenoles y flavonoides totales .....                                                                                                                                                                      | 49 |
| <b>Conclusiones .....</b>                                                                                                                                                                                                 | 52 |
| <b>Referencias .....</b>                                                                                                                                                                                                  | 53 |
| <b>8. DISCUSIÓN GENERAL.....</b>                                                                                                                                                                                          | 58 |
| <b>9. CONCLUSIONES GENERALES.....</b>                                                                                                                                                                                     | 64 |
| <b>10. LITERATURA GENERAL CITADA .....</b>                                                                                                                                                                                | 65 |
| <b>11. ANEXO 1. Artículo: Establecimiento de un sistema óptimo de rutina de asepsia y estación de recolecta de segmentos nodales para la micropropagación de <i>Casimiroa edulis</i> La Llave et Lex. ....</b>            | 75 |

## ÍNDICE DE CUADROS

|                                                                                                                                                           | Página |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| <b>Cuadro 1.</b> Clasificación taxonómica del zapote blanco. ....                                                                                         | 5      |
| <b>Cuadro 2.</b> Principales usos medicinales del zapote blanco ( <i>C. edulis</i> ). ....                                                                | 6      |
| <b>Cuadro 3.</b> Principales metabolitos secundarios presentes en hoja y fruto del zapote blanco ( <i>C. edulis</i> ) .....                               | 7      |
| <b>Cuadro 4.</b> Variación de metabolitos secundarios en algunas especies por diferentes factores (bióticos y abiótico).. ....                            | 10     |
| <b>Cuadro 5.</b> Rutinas de asepsia para el establecimiento <i>in vitro</i> de segmentos nodales de zapote blanco ( <i>C. edulis</i> ). ....              | 23     |
| <b>Cuadro 6.</b> Tratamientos para la inducción de callos en segmentos de tallos de zapote blanco ( <i>C. edulis</i> ). ....                              | 24     |
| <b>Cuadro 7.</b> Tratamientos para la inducción de brotes en yemas apicales del brote inicial <i>in vitro</i> de zapote blanco ( <i>C. edulis</i> ). .... | 24     |

## ÍNDICE DE FIGURAS

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | Página |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| <b>Figura 1.</b> Planta y diferentes partes de zapote blanco ( <i>Casimiroa edulis</i> ), fuente de explantes para los cultivos <i>in vitro</i> : A), Árbol; B), Ramas con brotes; C) Hojas; D) Flores; E) Fruto .....                                                                                                                                                                                                                      | 5      |
| <b>Figura 2.</b> Ejemplar de herbario de zapote blanco (A) y ficha de confirmación de especie (Folio 2200 EBUM (B)).....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | 22     |
| <b>Figura 3.</b> Explantes de zapote blanco ( <i>C. edulis</i> ) durante el establecimiento <i>in vitro</i> : A) Segmento nodal con yemas apicales y axilares; B) Oxidación del explante; C) Contaminación fúngica en explante; D) Explante superviviente. A los 14 días de cultivo.....                                                                                                                                                    | 26     |
| <b>Figura 4.</b> Porcentajes de contaminación (A), oxidación (B) y supervivencia (C) de explantes de segmentos nodales de zapote blanco ( <i>C. edulis</i> ) de ramas recolectadas en primavera, verano, otoño e invierno, tratados con cinco diferentes rutinas de asepsia (R1, R2, R3, R4 y R5). A los 14 días del cultivo. Letras distintas indican que existe diferencia significativa ( $p \leq 0.05$ , $n=25$ , prueba de Tukey)..... | 27     |
| <b>Figura 5.</b> Desarrollo de brote inicial (A) en explantes de zapote blanco ( <i>C. edulis</i> ), a los 28 días del cultivo; B), explante de brote inicial para la inducción de la formación de callo; C) Callo a los 14 días del cultivo en MS con $2 \text{ mgL}^{-1}$ de Picloram (T8); y, D) Callo de 28 días de recultivo en T8. ....                                                                                               | 29     |
| <b>Figura 6.</b> Porcentajes de formación callos en explantes de zapote blanco ( <i>C. edulis</i> ) a los 28 días del cultivo en MS con diferentes tratamiento de BA y Picloram. Letras distintas indican que existe diferencia significativa ( $p \leq 0.05$ , $n=5$ , prueba de Tukey). ....                                                                                                                                              | 30     |
| <b>Figura 7.</b> Crecimiento de callo (peso fresco) (A) de zapote blanco ( <i>C. edulis</i> ) durante 35 días de cultivo, cultivados en MS con $2 \text{ mgL}^{-1}$ de Picloram; B) Callo al inicio de la cinética de crecimiento; C) Callo a los 30 días de la cinética de crecimiento. Letras distintas indican que existe diferencia significativa ( $p \leq 0.05$ , $n=3$ , prueba de Tukey). ....                                      | 32     |
| <b>Figura 8.</b> Número de brotes obtenidos en yemas apicales del brote inicial <i>in vitro</i> de zapote blanco ( <i>C. edulis</i> ) obtenidos en diferentes concentraciones de BA/ANA, a los 28 días del cultivo. Letras distintas indican que existe diferencia significativa ( $p \leq 0.05$ , $n=5$ , prueba de Tukey).. ....                                                                                                          | 33     |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | <b>Pág.</b> |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------|
| <b>Figura 9.</b> Formación y desarrollo de brotes en yemas apicales de zapote blanco ( <i>C. edulis</i> ) en diferentes concentraciones BA/ANA: A) Explante inicial; B) Brotes en T3; C) Brotes en T7; y, D) Brotes en T4. A los 28 días de cultivo. ....                                                                                                                                                                                            | 34          |
| <b>Figura 10.</b> Enraizamiento de brotes de zapote blanco ( <i>C. edulis</i> ) con 15 mgL <sup>-1</sup> a los 28 días del cultivo. A) Brote con desarrollo de primordios de raíz (7 días); B) Brote con desarrollo de raíz (14 días); C) Plántula con raíces de 3 cm de longitud, con hasta dos pares de hojas. ....                                                                                                                                | 35          |
| <b>Figura 11.</b> Porcentaje de actividad antioxidante por DPPH• (A), ABTS•+ (B) y TAC (C), de los extractos metanólicos de hojas y tallos de una planta adulta, plántulas y callos <i>in vitro</i> de zapote blanco ( <i>C. edulis</i> ), y de los controles positivos Trolox, ácido ascórbico (AC. ASC) y butilhidroxitolueno (BHT). Letras distintas indican que existe diferencia significativa ( $p \leq 0.05$ , $n=3$ , prueba de Tukey). .... | 48          |
| <b>Figura 12.</b> Contenido de fenoles (A) y flavonoides totales (B) de hojas y tallos de una planta adulta, y de plántulas y callos <i>in vitro</i> de zapote blanco ( <i>C. edulis</i> ) expresados en miligramos equivalente de ácido gálico (mg Eq. AG/g E.S.) y quercetina (mg Eq. Q/g E.S.), respectivamente. Letras distintas indican que existe diferencia significativa ( $p \leq 0.05$ , $n=3$ , prueba de Tukey). ....                    | 50          |

## RESUMEN

El zapote blanco (*Casimiroa edulis* La Llave et Lex.) (Rutaceae), es un árbol nativo que se distribuye en México, cuyos frutos son una fuente de alimento con actividad antioxidante. Diversas partes de esta planta son utilizadas en la medicina tradicional mexicana, para el tratamiento de hipertensión, insomnio y ansiedad. Debido a estas propiedades, y a que no existe un programa para su cultivo y propagación, es necesario establecer cultivos *in vitro* para evaluar la producción de metabolitos secundarios, en específico de compuestos fenólicos. El objetivo de esta investigación fue establecer cultivos *in vitro* de zapote blanco a partir de segmentos nodales de ramas de árboles adultos, recolectadas en las cuatro estaciones del año (primavera, verano, otoño e invierno), utilizando cinco rutinas de asepsia, así como determinar la actividad antioxidante y el contenido de fenoles y flavonoides totales en extractos metanólicos de callos y plántulas *in vitro*, así como de hojas y tallos de una planta adulta de zapote blanco. El establecimiento *in vitro* se consiguió con la siembra de segmentos nodales con yemas apicales y axilares, en medio MS (Murashige y Skoog) con 1 gL<sup>-1</sup> de carbón activado, 5 gL<sup>-1</sup> de Tecto60® y 500 mgL<sup>-1</sup> de ampicilina, con 0.05 mgL<sup>-1</sup> de benciladenina (BA), mantenidos en cuarto de cultivo (25°C, 16 h de luz con fotoperíodo, 32  $\mu$ molm<sup>2</sup>s<sup>-1</sup>). A los 14 días, la mejor rutina de asepsia fue R5 en explantes recolectados en invierno (84.7% de supervivencia, 5% de contaminación y 5% por oxidación), que consistió en: Solución 1, hipoclorito de sodio comercial (NaClO, 6% de cloro activo) 10% v/v + 10 gL<sup>-1</sup> Tecto60® por 5 min; Solución 2, detergente neutro (Hyclin®) 20% v/v + 10 gL<sup>-1</sup> Tecto60® por 15 min; Solución 3, NaClO 20% v/v + 10 gL<sup>-1</sup> Tecto60® por 20 min. A los 28 días se desarrolló el brote inicial, utilizado como fuente de yemas apicales para la inducción de formación de callos y multiplicación de brotes, cultivadas en medio MS con benciladenina (BA) y ácido 4-amino-3,5,6-tricloropicolínico (Picloram), y BA y ácido naftalenacético (ANA), respectivamente. Para el enraizado y formación de plántulas, los brotes se cultivaron en MS con ácido indol-3-butírico (AIB). La formación de callo se obtuvo en MS con 2 mgL<sup>-1</sup> Picloram en un 40% de los explantes, el óptimo número de brotes se obtuvo con 0.5 mgL<sup>-1</sup> BA y 0.1 mgL<sup>-1</sup> ANA (6 brotes/explante), y a los 28 días del cultivo de los brotes en MS con 15 mgL<sup>-1</sup> AIB, se formaron plántulas (4.5 cm de altura, 3.2 raíces de 3 cm de largo). La actividad antioxidante se determinó mediante los métodos de DPPH<sup>•</sup>, ABTS<sup>•+</sup> y TAC, y para la determinación de fenoles con el reactivo Folin-Ciocalteu y de flavonoides totales con cloruro de aluminio. En callos se mostró una mayor actividad antioxidante tanto con el método DPPH<sup>•</sup> (76.99%) como con ABTS<sup>•+</sup> (89.73%), y los porcentajes más altos con TAC se obtuvieron en los extractos de hojas y tallos de planta adulta (97%), seguido del de plántulas *in vitro*, con un valor bajo en callos. El mayor contenido de ácidos fenólicos y flavonoides se obtuvo en los extractos de hoja (1.89 mg Eq. AG/g E.S., 2.95 mg Eq. Q/g E.S.). Los resultados indican que los cultivos de callos y plántulas *in vitro* producen tanto ácidos fenólicos como flavonoides y su contenido se relacionó con el nivel de diferenciación celular y con la actividad antioxidante. Es perspectiva el realizar un análisis de identificación y cuantificación de los compuestos mayoritarios.

**Palabras clave:** Actividad antioxidante, callos, fenoles y flavonoides totales, plántulas *in vitro*, zapote blanco.

## ABSTRACT

The white sapote (*Casimiroa edulis* La Llave et Lex.) (Rutaceae), is a native tree that is distributed in Mexico, whose fruits are a food source with antioxidant activity. Various parts of this plant are used in traditional Mexican medicine, for the treatment of hypertension, insomnia and anxiety. Due to these properties, and there is not program for their cultivation and propagation, it is necessary to establish *in vitro* cultures to evaluate the production of secondary metabolites, specifically phenolic compounds. The objective of this research was to establish *in vitro* cultures of white sapote from nodal segments of adult tree branches, collected in the four seasons of the year (spring, summer, autumn and winter), using five aseptic routines, as well as to determine the antioxidant activity and the content of total phenols and flavonoids in methanolic extracts of callus and plantlets *in vitro*, as well as from leaves and stems of an adult white sapote plant. *In vitro* establishment was achieved by culture nodal segments with apical and axillary buds, in MS medium (Murashige and Skoog), with 1 gL<sup>-1</sup> of activated carbon, 5 gL<sup>-1</sup> of Tecto60® and 500 mgL<sup>-1</sup> of ampicillin, with 0.05 mgL<sup>-1</sup> of benzyladenine (BA), kept in a culture room (25°C, 16 h of light with photoperiod, 32 µmolm<sup>2</sup>s<sup>-1</sup>). At 14 days, the best aseptic routine was R5 in explants collected in winter (84.7% survival, 5% contamination and 5% oxidation), which consisted of: Solution 1, commercial sodium hypochlorite (NaClO, 6% active chlorine) 10% v/v + 10 gL<sup>-1</sup> Tecto60® for 5 min; Solution 2, neutral detergent (Hyclin®) 20% v/v + 10 gL<sup>-1</sup> Tecto60® for 15 min; Solution 3, NaClO 20% v/v + 10 gL<sup>-1</sup> Tecto60® for 20 min. After 28 days, the initial shoot developed was used as a source of apical buds for the induction of callus formation and shoot multiplication, cultured in MS medium with benzyladenine (BA) and 4-amino-3,5,6-trichloropicolinic acid (Picloram), and BA and naphthaleneacetic acid (NAA), respectively. For rooting and plantlet formation, shoots were grown in MS with indole-3-butyric acid (IBA). Callus formation was obtained in MS with 2 mgL<sup>-1</sup> Picloram in 40% of the explants, the optimal number of shoots was obtained with 0.5 mgL<sup>-1</sup> BA and 0.1 mgL<sup>-1</sup> NAA (6 shoots/explant), and 28 days after the culture of the shoots in MS with 15 mgL<sup>-1</sup> IBA, plantlets were formed (4.5 cm high, 3.2 roots with 3 cm long). Antioxidant activity was determined by the methods of DPPH•, ABTS•+ and TAC, and for the determination of total phenols with the Folin-Ciocalteu reagent, and total flavonoids with aluminum chloride. In callus, a higher antioxidant activity was shown with both the DPPH• method (76.99%) and ABTS•+ (89.73%), and the highest percentages with TAC were obtained in extracts of leaves and stems of adult plants (97%). The highest content of phenolic acids and flavonoids was obtained in leaf extracts (1.89 mg Eq. AG/g E.S., 2.95 mg Eq. Q/g E.S.), with close values in *in vitro* plantlets and stem. The results indicate that callus and *in vitro* plantlets cultures produce both phenolic acids and flavonoids and their content was related to the level of cell differentiation and antioxidant activity. It is important to carry out an analysis of the identification and quantification of the main compounds.

**Keywords:** Antioxidant activity, calluses, phenols and total flavonoids, *in vitro* plantlets, white sapote.

## 1. INTRODUCCIÓN

El zapote blanco (*Casimiroa edulis* La Llave *et Lex.*), es una planta nativa de América tropical, con distribución desde el sur de México hasta Centroamérica (Mabberley, 2008; Vidal-López *et al.*, 2008). Es un árbol de la familia Rutaceae con propiedades medicinales, ya que sus hojas, semillas, corteza, raíces y frutos, son utilizados en la medicina tradicional mexicana, debido a que presenta compuestos de tipo terpénico, fenólico y alcaloides, algunos de los cuales han sido identificado como principios activos responsables de actividad antimicrobiana, antioxidante, antiinflamatoria, cicatrizante, hipotensora, hipoglucémica y sedativa (Martínez, 1989; Berdonces, 2009; Jiménez, 2012; Argueta, 2014).

En las diferentes partes de la planta del zapote blanco, se han identificado compuestos volátiles y no volátiles del grupo de los terpenos, polifenólicos y alcaloides, que, los polifenoles como la saptina, herniarina, imperatonina y pentametoxiflavona, además con otros compuestos, se consideran los responsables de la actividad antioxidante, anticancerígena e hipotensora, que esta planta presenta (Bertin *et al.*, 2014, Mostafa *et al.*, 2017). Los resultados de las diversas investigaciones realizadas con las diferentes partes de esta planta, sugieren la utilización de éstas por sus componentes activos, en el tratamiento de enfermedades como la hipertensión y otras enfermedades cardiovasculares, la diabetes o para el manejo del síndrome metabólico. Los frutos son comestibles y se le atribuyen propiedades funcionales y nutraceuticas (Bertin *et al.* 2014).

El perfil químico de los metabolitos secundarios extraídos a partir de las diferentes partes de las plantas colectadas en ambientes naturales o bajo cultivo en campo, es muy variable, ya que se ve influenciado por las condiciones ambientales tales como el clima, la época del año, el suelo, la ubicación y por enfermedades o plagas a las que las plantas se enfrentan. Ante esta problemática, la biotecnología moderna ofrece el cultivo de tejidos vegetales mediante técnicas *in vitro*, para analizar la producción de metabolitos y determinar la influencia de estos factores externos sobre su biosíntesis, ya que se cultivan bajo condiciones controladas de pH, luz, temperatura, nutrientes y agua. Además, es útil para realizar investigaciones que aporten conocimiento de la producción de metabolitos secundarios durante los procesos de

desdiferenciación celular (cultivos de callos y de suspensiones celulares) y de diferenciación celular (brotes, raíces y plántulas). Los cultivos *in vitro* son una fuente continua y sustentable, para proveer de biomasa o material vegetal durante cualquier época del año y disminuir o evitar la colecta de forma indiscriminada, sin afectar las poblaciones (Massot *et al.*, 2000; Calva y Pérez, 2005; Pérez-Alonso y Jiménez, 2011).

Diferentes estrategias *in vitro* han sido desarrolladas con el objetivo de incrementar el contenido de metabolitos secundarios en plantas e incluso han permitido la obtención de nuevos compuestos de gran interés en la industria farmacéutica y alimentaria. En diversas investigaciones se ha demostrado que las condiciones y medios de cultivos *in vitro* de algunas plantas, sobre todo medicinales, afectan el perfil metabólico de metabolitos secundarios como terpenos y polifenoles, con lo que se ha demostrado la ventaja de realizar este tipo de estudios (Capote *et al.*, 2009; Matos-Acurero, 2011).

El uso de cultivos *in vitro* de brotes, raíces y plántulas (diferenciados), así como de callos y células en suspensión (indiferenciados), es una de las estrategias más promisorias para el estudio y producción de metabolitos secundarios de alto valor en la industria, específicamente en la alimentaria y farmacéutica, debido al potencial que presentan para producirse en biorreactores, en procesos de elicitación y mediante ingeniería metabólica (Pérez-Alonso y Jiménez, 2011). Un ejemplo de esto es lo mostrado en callos *in vitro* de *Melia azedarach* (paraíso) donde se obtuvo quercetina, rutina y kaempferol (Ahmadpoor *et al.*, 2022). El uso de elicitores como el óxido de cinc (ZnO) en crecimiento en callos de tres especies de *Thymus* spp. (tomillo), fue determinante la concentración de timol y carvacrol, la que dependió de la especie, ya que en *T. kotschyanus* y en *T. daenesis* se presentó la concentración más alta de estos compuestos (Mosavat *et al.*, 2019). También, la concentración de metabolitos puede depender del explante utilizado en el establecimiento de los cultivos *in vitro*, como se reportó en *Linum usitatissimum* (linaza) obteniendo una mayor concentración de polifenoles en callos obtenidos en tallo que en hoja (Anjum *et al.*, 2017).

La concentración, tipo y combinación de los reguladores de crecimiento adicionados a los medios de cultivo, también son un factor que influye en la variación de algunos metabolitos

secundarios de cultivos *in vitro*. En callos de *Lallemantia iberica* (cabeza de dragón) se presentó una mayor concentración de polifenoles, usando thidiazurón (TDZ) en comparación con la adición de ácido naftalenacético (ANA) y la combinación de ácido naftalenacético y benciladenina (BA) (Pourebadi *et al.* 2015). Esta variación que se presenta en los diferentes sistemas de cultivos *in vitro*, influye en la actividad biológica de los extractos obtenidos, como la antimicrobiana, la antioxidante o la antiinflamatoria, entre otras. Sin embargo, en *Sambucus nigra* (sauco) se comprobó que tanto los extractos de plantas silvestres como de callos, mostraron la misma actividad antiinflamatoria y antioxidante (Cruz-Cruz, 2018).

En esta investigación, el objetivo fue determinar el efecto de los procesos de diferenciación y dediferenciación sobre el contenido de polifenoles y la actividad antioxidante de extractos obtenidos en cultivos *in vitro* de zapote blanco (*C. edulis*), tanto de cultivos indiferenciados (callos) como diferenciados (plántulas).

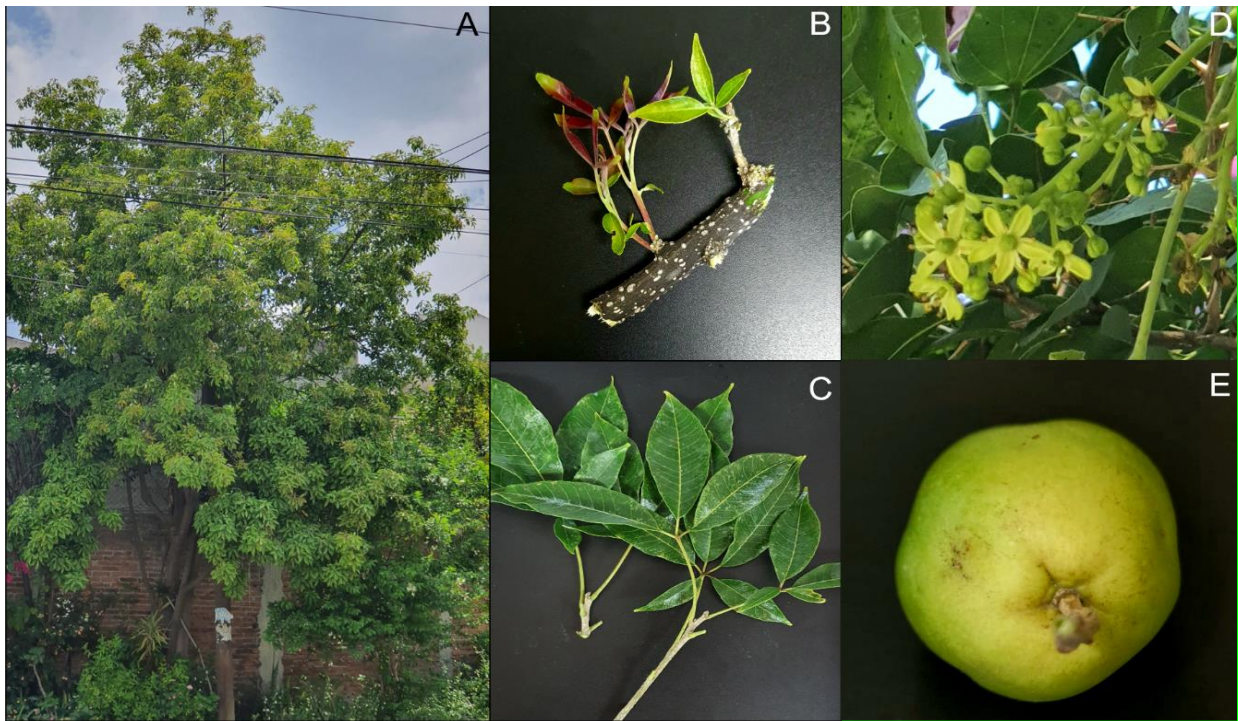
## 2. ANTECEDENTES

### 2.1. Zapotes

El zapote es el nombre común de varias especies de árboles frutales que pertenecen diversos géneros como *Casimiroa*, *Diospyros*, *Manilkara*, *Pouteria*, nativas de América Central y del Sur. Por las características de maduración de los frutos y la susceptibilidad a enfermedades causadas por hongos, bacterias y parásitos, se comercializa solo en mercados regionales, utilizando su pulpa para aguas frescas, dulces o helados (Gómez-Jaimes *et al.*, 2012). Los más conocidos son el zapote blanco (*Casimiroa edulis*), el zapote negro (*Diospyros nigra*), el chico zapote (*Manilkara zapota*) y el zapote mamey (*Pouteria sapota*) (Villegas-Monter, 2016), que además de su uso como alimento, presentan propiedades medicinales, con potencial en el tratamiento de enfermedades gastrointestinales, como agentes laxantes, antidiarreicos y digestivos. Sin embargo, es importante destacar que muchos de estos usos aún se encuentran en fase de investigación (SIAP, 2017). En México, la palabra "zapote" proviene del náhuatl *tzapot*, que significa "fruto dulce", llamados a los verdaderos zapotes, que pertenecen a los género *Manilkara* y *Pouteria*, que pertenecen a la familia Sapotaceae. Los zapotes que pertenecen a los géneros *Casimiroa* y *Diospyros*, pertenecen a dos familias diferentes, Rutaceae y Ebenaceae, respectivamente, por lo que no son considerados verdaderos zapotes (Morera, 1992).

### 2.2. Zapote blanco (*Casimiroa edulis*)

El zapote blanco es un árbol nativo perteneciente a la familia Rutaceae, es perennifolio de 8-12 m de altura, con la copa ancha y el tronco grueso con la corteza de color gris, de hábito terrestre y ripario, en asociación con bosque de pino-encino. Con hojas largamente pecioladas, digitadas, normalmente con 5 foliolos, elípticos u ovales a anchamente ovados, de 10-18 cm de longitud, agudos o acuminados. De flores pentámeras en cortas panículas, de color verde amarillento o blancuzco, fragantes, los frutos son drupáceos, redondeados, amarillentos o verdosos, de unos 10 cm de diámetro, algo aperados, la piel es delgada y la pulpa amarillenta, mantecosa, de sabor dulce con 2-5 semillas (Vidal-López *et al.*, 2008) (Figura 1).



**Figura 1.** Planta y diferentes partes de zapote blanco (*Casimiroa edulis*), fuente de explantes para los cultivos *in vitro*: A), Árbol; B), Ramas con brotes; C) Hojas; D) Flores; E) Fruto (Imágenes propias).

### 2.2.1. Taxonomía del zapote blanco

El zapote blanco pertenece al reino Plantae, la división Magnoliophyta, la clase Magnoliopsida, el orden Sapindales, la familia Rutaceae y el género *Casimiroa*, siendo su especie específica *Casimiroa edulis*.

**Cuadro 1.** Clasificación taxonómica del zapote blanco.

---

|             |                                                                                                                        |
|-------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Reino:      | Plantae                                                                                                                |
| División:   | Magnoliophyta                                                                                                          |
| Clase:      | Magnoliopsida                                                                                                          |
| Orden:      | Sapindales                                                                                                             |
| Familia:    | Rutaceae                                                                                                               |
| Subfamilia: | Toddalioideae                                                                                                          |
| Género:     | <i>Casimiroa</i>                                                                                                       |
| Especie:    | <i>Casimiroa edulis</i> La Llave y Lex., 1825 ( <a href="http://www.theplantlist.org">www.theplantlist.org</a> , s/f). |

---

### 2.2.2. Distribución

*Casimiroa edulis* se distribuye desde el sur de México hasta Centroamérica (Mabberley, 2008; Vidal-López *et al.*, 2008; Segura *et al.*, 2018), principalmente en bosques de pino-encino, en climas templados hasta subtropicales, se encuentran en huertos familiares, huertas y en forma silvestre. Por sus propiedades medicinales y por su característico fruto, se ha cultivado en diferentes partes del mundo como en Colombia (Gonzáles *et al.*, 2019), Estados Unidos, Nueva Zelanda, Sudáfrica (Ahlawat *et al.*, 2016), Egipto y Etiopía (Satheesh, 2015).

### 2.2.3. Usos y propiedades medicinales del zapote blanco

El fruto de este árbol es muy utilizado como una fuente de alimento tanto en México como en Colombia (Gonzáles *et al.*, 2019), rico en vitamina C, utilizado en la tecnología de alimentos como índice de calidad nutricional de productos alimenticios e importante en nuestra dieta por su actividad antioxidante (Castañeda *et al.*, 2010). En México, en el año 2016, solo el estado de Hidalgo se reportó como el único productor de zapote blanco con 8.22 toneladas (SIAP, 2017).

Diversas partes de esta planta son utilizadas en la medicina tradicional mexicana, cuyo uso se remonta desde los pueblos prehispánicos (Vidal-López *et al.*, 2008). Estudios de diversas partes de este árbol han demostrado propiedades medicinales (Cuadro 2).

**Cuadro 2.** Principales usos medicinales del zapote blanco (*C. edulis*).

| Parte de la planta | Actividad farmacobiología       | Referencia                        |
|--------------------|---------------------------------|-----------------------------------|
| Hoja               | Hipnótico, cardiovascular       | Awaad <i>et al.</i> , 2012        |
| Hoja               | Antimicrobiana                  | Vargas <i>et al.</i> , 2017       |
| Hoja               | Antihipertensiva, vasodilatador | Vázquez-Cruz <i>et al.</i> , 2009 |
| Hoja y tallo       | Ansiolítica                     | Molina-Hernández, 2004            |
| Semillas           | Antiviral, antitumoral          | Esposito <i>et al.</i> , 2011     |
| Fruto              | Antihipertensiva                | Awaad <i>et al.</i> , 2007        |

### 2.2.4. Principales metabolitos secundarios y actividad biológica del zapote blanco

El zapote blanco ha sido objeto de numerosos estudios debido a sus propiedades medicinales, en los cuales se han identificado metabolitos secundarios como alcaloides, terpenos y compuestos fenólicos con diversas propiedades biológicas (Cuadro 3). Estos estudios se centran principalmente en el análisis de su fruto y sus hojas.

**Cuadro 3.** Principales metabolitos secundarios presentes en hoja y fruto del zapote blanco (*C. edulis*).

| Grupo de metabolitos | Metabolito                      | Actividad biológica                         | Referencia                                                  |
|----------------------|---------------------------------|---------------------------------------------|-------------------------------------------------------------|
| Sesquiterpenos       | Germacreno D                    | Hipotensora                                 | Miller <i>et al.</i> , 2009                                 |
|                      | (E)-cariofileno                 | Sedativa                                    | Awaad <i>et al.</i> , 2012                                  |
| Compuestos fenólicos | Herniarina                      |                                             | Bertin <i>et al.</i> , 2014<br>Mostafa <i>et al.</i> , 2017 |
|                      | Imperatorina                    | Antioxidante                                |                                                             |
|                      | 8-Geraniolxipsoraleno           |                                             |                                                             |
|                      | 5,6,2',3',4'-Pentametoxiflavona | Hipotensora                                 |                                                             |
|                      | Zapotina                        | Anticancerígeno                             |                                                             |
|                      | Ácido vainílico                 |                                             |                                                             |
|                      | Piragalol                       |                                             |                                                             |
|                      | Ácido benzoico                  |                                             |                                                             |
|                      | Catecol                         |                                             |                                                             |
|                      | Ácido p-hidroxibenzoico         |                                             |                                                             |
| Cumarinas            | Umbeliferona                    | Antimicrobiana, Hipoglucémica y Adipogénica | Awaad <i>et al.</i> , 2012<br>Nagai <i>et al.</i> , 2014    |
|                      | Esculetina                      |                                             |                                                             |
|                      | Xantotoxol                      |                                             |                                                             |
|                      | Isopimpinellina                 |                                             |                                                             |
|                      | Ácido colinérgico               |                                             |                                                             |
| Alcaloides           | Edulina                         | Hipotensora                                 | Magos <i>et al.</i> , 1998                                  |
|                      | Histamina                       |                                             |                                                             |
|                      | Palmitamida                     |                                             |                                                             |
|                      | Zapotidina                      |                                             |                                                             |
|                      | Casimiroidina                   |                                             |                                                             |
|                      | Casimiroina                     |                                             |                                                             |
|                      | Edulina                         |                                             |                                                             |
|                      | N-Benzoil-tiramina              |                                             |                                                             |

### 2.2.5. Actividad antioxidante y contenido de compuestos fenólicos de zapote blanco

El alto contenido de compuestos con propiedades antioxidantes en plantas, que tienen la capacidad de capturar radicales libres, como los ácidos fenólicos, flavónicos y antociánicos, ha generado un creciente interés en su uso en fitoterapia, tanto profiláctica como curativa. La función de los antioxidantes es neutralizar los radicales libres presentes en las células biológicas, los cuales ejercen un impacto negativo en los organismos vivos, causando un funcionamiento celular deficiente, envejecimiento prematuro y enfermedades degenerativas (Munteanu y Apetrei, 2021).

Se han llevado a cabo estudios sobre la actividad antioxidante de metabolitos secundarios extraídos de árboles o de sus frutos, como lo reportado en cáscara y las semillas de frutos de *Manilkara zapota*, que determinaron una alta actividad antioxidante según el método ABTS [2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin-6-ácido sulfónico)], con alrededor de 700.0  $\mu\text{M}$  Trolox/g de residuo, en un extracto metanólico con un alto contenido de polifenoles (Aquino *et al.*, 2020). En otros frutos tropicales, se ha observado actividad antioxidante, como en curuba (*Passiflora tripartita* var. Mollissima), el aguacate cv. Hass (*Persea americana* Mill.) y la uchuva (*Physalis peruviana* L.) (Ibarra-López *et al.* 2016).

El extracto etanólico de hojas de *C. edulis* ha presentado una alta actividad antioxidante (método ABTS), con un valor de 842  $\mu\text{M}$  Trolox equivalentes/g peso seco, identificando dos nuevas flavonas (5-metoxi-6-hidroxi-flavona y 6-O.- $\beta$ -D-glucósido (Awaad *et al.*, 2008). Elkady *et al.* (2017) evaluaron una alta actividad antioxidante de extractos hexánicos y metanólicos de cáscara y semillas de frutos de *C. edulis* Llave et Lex, y lo relacionaron con el contenido de fenólicos, flavonoides y taninos en el extracto metanólico, e identificaron los principales compuestos activos como el pirogalol, el ácido p-hidroxibenzoico, la luteolina y la acacetina.

Tun *et al.* (2019) aislaron dos flavonoides (6,7-dimethoxiflavona y 5,6,2'-trimetoxiflavona) de un extracto metanólico de la corteza del tronco de *C. edulis*, ambos compuestos mostraron una alta actividad antioxidante. Recientemente se determinó la capacidad antioxidante y contenido de compuestos fenólicos totales del fruto de *C. edulis*, utilizando los ensayos DPPH, Folin

Ciocalteau y espectrofotometría con las partes comestibles (pulpa y cáscara) del fruto, encontrando un contenido de polifenoles de 333.4 mg equivalente de ácido gálico (GAE)/100 g en la pulpa, cantidad comparativamente superior a la mandarina. Además, en la cáscara obtuvieron 576 mg GAE/100 g de polifenoles superior a frutas tales como el noni y pitaya amarilla, conocidas comúnmente por sus efectos positivos que aportan a la salud (Vera-Sánchez *et al.*, 2023). Abo-Taleb y Abdul-Latif (2023), reportaron para frutos secos un contenido total de fenólicos de 43.41 mg/100g, un contenido total de flavonoides de 0.86 mg/100g y una actividad antioxidante de 86.32% (DPPH), en frutos secos, observando datos similares a lo obtenido en frutos frescos, aunque con un ligero decremento en fenólicos totales y un incremento en flavonoides totales y en la actividad antioxidante.

### **2.3. Variación del contenido y grupos de metabolitos secundarios en plantas**

La variación de metabolitos secundarios en plantas es un fenómeno estudiado y comprendido en el campo de la botánica y la fitoquímica (Ibarra-Cantún *et al.*, 2018). Esta variación, influenciada por la concentración y la diversidad de metabolitos en el entorno de la planta, puede desencadenar respuestas metabólicas que resultan en la síntesis, acumulación o modificación de metabolitos secundarios, ya sea a través de la adición de nutrientes, cambios en la intensidad lumínica, la aplicación de estímulos químicos o bióticos, u otras intervenciones (Macías *et al.*, 2021).

Por ejemplo, la adición de nutrientes específicos al suelo o al medio de cultivo puede aumentar la disponibilidad de sustratos necesarios para la biosíntesis de ciertos metabolitos secundarios, lo que puede resultar en un aumento en su concentración. Del mismo modo, la exposición a niveles elevados de luz solar o la aplicación de estrés abiótico como la sequía o la salinidad pueden inducir la producción de metabolitos secundarios protectores (Cuadro 4), como los antioxidantes, para contrarrestar el estrés oxidativo desarrollo (Cabrera-Carrión *et al.*, 2017).

Esta variación es importante no solo desde una perspectiva evolutiva y ecológica, sino también debido a las implicaciones que tiene en la biología de las plantas, la agricultura, la medicina y otras aplicaciones (Ojeda *et al.* 2015).

**Cuadro 4.** Variación de metabolitos secundarios en algunas especies por diferentes factores (bióticos y abiótico).

| Especie                       | Factor                                            | Efecto                                                           | Bibliografía                         |
|-------------------------------|---------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------|--------------------------------------|
| <i>Parkinsonia aculeata</i>   | Salinidad del suelo, el calor y el estrés hídrico | Aumento de polifenoles                                           | Herrera <i>et al.</i> , 2023         |
| <i>Moringa oleífera</i>       | Etapas de desarrollo del árbol                    | Máxima producción de alcaloides, polifenoles y taninos           | Cabrera-Carrión <i>et al.</i> , 2017 |
| <i>Quercus</i> spp.           | Ataque de insectos                                | Aumento de taninos                                               | Vaca-Sánchez <i>et al.</i> , 2016    |
| <i>Zataria multiflora</i>     | Temperatura                                       | Variación en terpenos                                            | Karimi <i>et al.</i> 2020            |
| <i>Vanilla planifolia</i>     | Genotipo                                          | Diferencias en concentraciones de terpenos, fenoles y alcaloides | Ibarra-Cantún <i>et al.</i> 2018     |
| <i>Elaeagnus angustifolia</i> | Luz                                               | Aumento de polifenoles                                           | Pía-Beker <i>et al.</i> 2020         |

## 2.4. Producción de metabolitos secundarios *in vitro*

La producción de metabolitos secundarios en cultivos *in vitro* es un campo de investigación prometedor que ha ganado interés en los últimos años. Los cultivos *in vitro* permiten el crecimiento controlado de plantas, tejidos, órganos y células (callos y células en suspensión) en condiciones asépticas bajo un ambiente controlado, lo que facilita el estudio de la biosíntesis de metabolitos secundarios y la optimización de su producción (Barrales-Cureño *et al.*, 2017). La producción de compuestos químicos regulada por el cultivo *in vitro* brinda una excelente oportunidad para el desarrollo de investigaciones bioquímicas relacionadas con las rutas metabólicas bajo un ambiente controlado (Karuppusamy, 2009). La producción *in vitro* de metabolitos secundarios se ha reportado por más de 60 años en diversas especies vegetales, con el cultivo *in vitro* de tejidos u órganos como hojas, tallos, raíces y brotes (diferenciados), de células en suspensión y callos (indiferenciados), así como en plantas completas (Bourgau *et al.*, 2001; Kreis, 2007; Deshmukh *et al.*, 2011; Pérez-Alonso y Jiménez, 2011).

Existen varias ventajas de los cultivo *in vitro* sobre el cultivo convencional de plantas para el estudio y la obtención de metabolitos secundarios, ya que como se mencionó, se realizan en condiciones controladas independientemente de factores ambientales bióticos y abióticos. Además, el proceso de extracción puede ser más simple, rápido y eficiente y así obtener un incremento considerable en el rendimiento de los metabolitos específicos (Pérez-Alonso y Jiménez, 2011).

Diversos grupos de metabolitos secundarios han sido obtenidos en cultivos *in vitro*, el contenido y tipo de metabolitos es dependiente de la especie vegetal, del tipo de cultivo (células, tejidos, órganos o plántulas), del medio de cultivo (nutrientes, pH) y de las condiciones de cultivo (temperatura, horas e intensidad de luz (Niaziam y Sabattini, 2021). Existen diversos reportes en los que se ha definido el tipo de cultivo *in vitro* y el o los metabolitos producidos, con lo reportado en el cultivo *in vitro* de raíces de *Ipomoea carnea*, en el que se identificó la producción de ácidos fenólicos, diversos flavonoides y cumarinas (Rojas-Idrogo *et al.*, 2014); en brotes *in vitro* de *Tanacetum parthenium*, los que acumularon un mayor contenido de fenoles y flavonoides durante la etapa de crecimiento exponencial; y en plántulas de *Diospyros anisandra*, en las que se determinó la presencia de plumbagina,  $\beta$ -sitosterol, vitamina E, estigmasterol y taraxasterol (Aguilar *et al.*, 2023). En tejidos desdiferenciados, se ha obtenido taxol a partir de callos de *Taxus* sp. (Barrales-Cureño y Soto-Hernández, 2012), y en suspensiones celulares de *Piper cernuum* se observaron altos niveles de fenoles a los 6 días de cultivo (Delgado-Paredes *et al.*, 2013).

#### **2.4.1. Variación de metabolitos secundarios *in vitro***

Los cultivos de células, callos, raíces adventicias o brotes generalmente requieren un suministro de reguladores del crecimiento para la proliferación de biomasa y acumulación de metabolitos (Murthy *et al.* 2014). Los cultivos celulares vegetales no siempre producen sustancias de manera cualitativa y cuantitativamente, equivalentes a las producidas por las plantas donantes. La producción y el perfil de compuestos químicos pueden ser inestables, ya que las células vegetales que crecen en medios de cultivo experimentan un entorno bioquímico y fisiológico diferente al de las células que forman parte de la planta completa. A veces es necesario un cierto

nivel de organización en los cultivos para que se sinteticen los metabolitos, ya que requieren un grado de diferenciación celular para su producción (Trejo-Tapia y Rodríguez-Monroy, 2007; Pérez-Alonso y Jiménez, 2011).

Un ejemplo de la relación del nivel de diferenciación celular con el contenido de metabolitos secundarios, se ha reportado en cultivos de *Lallemantia iberica* (cabeza de dragón), donde se encontró un mayor contenido de ácidos fenólicos en callos que en brotes, pero un mayor contenido de flavonoides en brotes que en callos (Pourebadi *et al.*, 2015). Cambios en el perfil químico de metabolitos secundarios como terpenos y polifenoles, también se han observado en algunos tejidos cultivados *in vitro*, demostrando con ello el efecto de las condiciones y medios de cultivo, como lo observado en brotes cultivados *in vitro* de guayaba (*Psidium guajava*), en los que se identificaron nuevos compuestos, al compararlos con los producidos en brotes de plantas cultivadas en campo (Capote *et al.*, 2009).

Así también, se obtuvo una mayor producción de aloína, uno de los principales metabolitos de *Aloe vera* (sábila), en callos y hojas de plántulas *in vitro*, que en hojas de plantas silvestres (Matos-Acurero, 2011). En callos de neem (*Azadirachta indica*), se observó una mayor producción de azadiractina en células obtenidas de callos, derivados de hojas que en aquellas obtenidas de cotiledones (Fernández-Da Silva *et al.*, 2021). Esta variación, tanto del perfil como del contenido de compuestos secundarios, se relacionan con cambios en la actividad antioxidante y otras actividades biológicas, como lo señalado en cultivos *in vitro* de la orquídea *Rhynchosstele rossii* (Gutiérrez-Sánchez *et al.* 2020).

Con las diferentes investigaciones que han utilizado los diferentes sistemas de cultivos *in vitro* como las suspensiones celulares, los callos, los brotes y plántulas, se ha determinado que los reguladores de crecimiento son uno de los factores más importantes que afectan la diferenciación celular y por tanto, el crecimiento celular y la producción de metabolitos secundarios. Una apropiada concentración en el medio de cultivo, de auxinas y citocininas, es un determinante crítico para controlar la producción de este tipo de compuestos *in vitro* (Pan *et al.*, 2020). La multiplicación masiva de plántulas bajo condiciones *in vitro*, proceso denominado micropropagación, es un método considerado de alto valor para producir fuente de biomasa

vegetal para la obtención de metabolitos secundarios (Sharma *et al.*, 2021). Por ello, el cultivo de los diferentes sistemas de cultivos *in vitro* de células, tejido u órganos vegetales, son una buena opción para el estudio de los factores que determinan una óptima producción de metabolitos secundarios, como la diferenciación celular.

## **2.5. Cultivos *in vitro* de zapote blanco**

Aunque son limitadas las investigaciones sobre el cultivo *in vitro* de zapote blanco, Martínez *et al.* (2006) desarrollaron cultivos de callos en diferentes tejidos (hoja, raíz, cotiledones y tallo) de plántulas establecidas *in vitro* mediante el cultivo de semillas. Por otro lado, Alhady y Reda (2017) lograron la regeneración de plantas en el medio de cultivo MS con reguladores de crecimiento, tras seis semanas del establecimiento de los tejidos. Además, Abd-Elmeged *et al.* (2015) informaron sobre un sistema completo de micropropagación de zapote blanco, iniciado a partir del establecimiento *in vitro* de ápices de ramas de árboles. Este sistema alcanzó un óptimo de brotación en medio MS (Murashige y Skoog, 1962) con 1 mgL<sup>-1</sup> de benciladenina (BA) y 0.5 mgL<sup>-1</sup> de ácido naftalenacético (ANA), y el enraizamiento de los brotes se llevó a cabo con 10 mgL<sup>-1</sup> de ácido-3-indolbutírico (AIB) más 1.5 mgL<sup>-1</sup> de ANA. Como resultado, se logró la aclimatación de las plántulas en invernadero.

### 3. JUSTIFICACIÓN

El cultivo *in vitro* de tejidos, órganos vegetales y plantas, es una herramienta con la que se han establecido sistemas indiferenciados como callos y células en suspensión, así como diferenciados (brotes, raíces y plántulas), que son utilizados para el estudio de la producción de metabolitos secundarios.

Respecto a estos últimos, es de gran interés, estudiar la producción de fenoles en cultivos *in vitro* de zapote blanco (*C. edulis*), con fines de evaluar el efecto de los procesos de diferenciación (plántulas) e indiferenciación (callos) sobre el contenido de éstos y relacionarlo con la actividad antioxidante.

#### **4. HIPÓTESIS**

El contenido de fenoles y la actividad antioxidante es dependiente de los procesos de diferenciación en los cultivos *in vitro* de zapote blanco (*C. edulis*).

## 5. OBJETIVOS

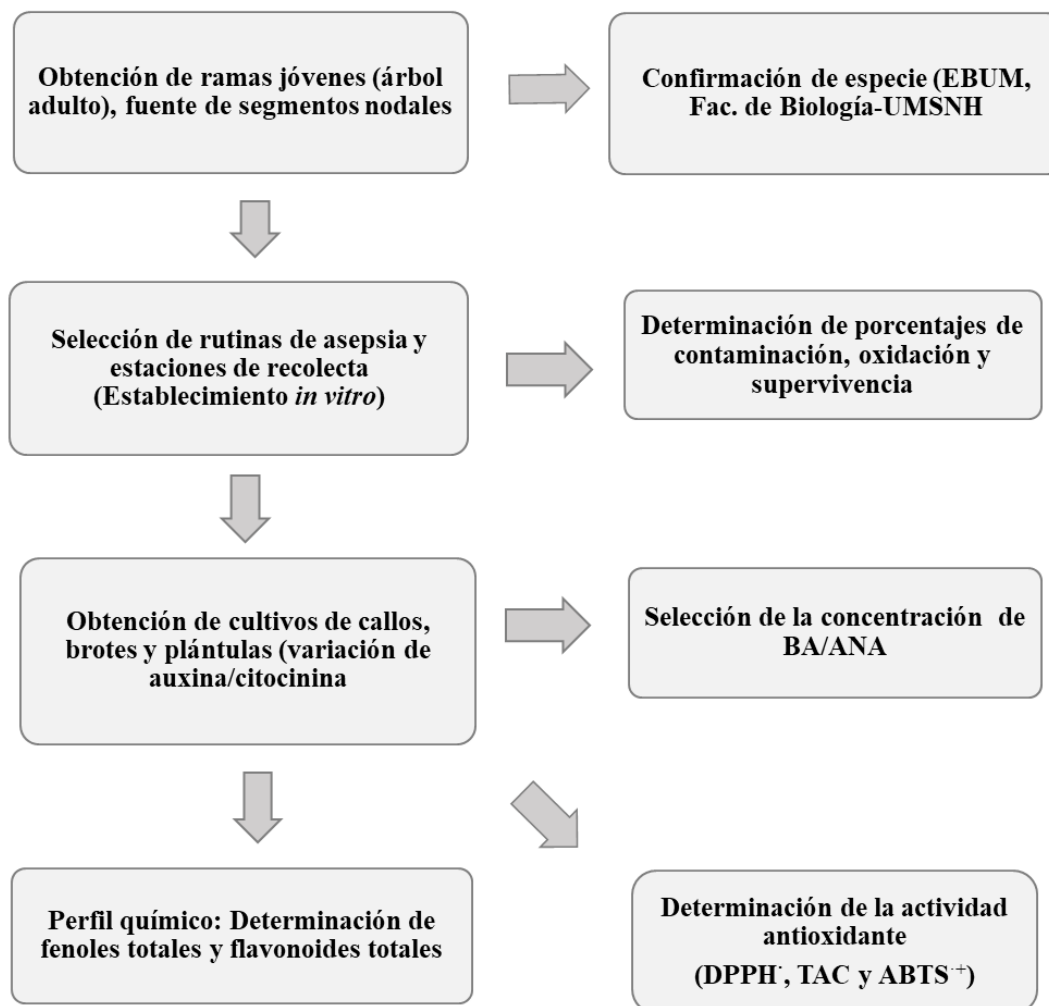
### 5.1. Objetivo general

Determinar el efecto de la diferenciación celular en el contenido de fenoles y en la actividad antioxidante, en cultivos *in vitro* de zapote blanco (*C. edulis*).

#### 5.1.1. Objetivos específicos

1. Establecer cultivos *in vitro* de zapote blanco (*C. edulis*) a partir de segmentos nodales de ramas jóvenes de un árbol adulto, determinando diversas rutinas de asepsia en ramas recolectadas en las cuatro estaciones del año.
2. Determinar las condiciones y medios de cultivo para obtener cultivos indiferenciados (callos) y diferenciados (plántulas), variando la concentración y tipos de reguladores de crecimiento (auxinas/citocininas).
3. Analizar el efecto de la diferenciación sobre el contenido de fenoles (ácidos fenólicos y flavonoides totales) y actividad antioxidante en callos y plántulas de zapote blanco (*C. edulis*).

## 6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



## 7. RESULTADOS

### 7.1 Capítulo I. Efecto de rutinas de asepsia y estación de recolecta de segmentos nodales de ramas jóvenes de un árbol adulto de zapote blanco (*Casimiroa edulis*) durante el establecimiento *in vitro* para la inducción de callos, brotes y plántulas.

#### Resumen

El zapote blanco (*Casimiroa edulis* La Llave et Lex.) (Rutaceae), es un árbol nativo que se distribuye en México, cuyos frutos son una fuente de alimento, importante en nuestra dieta por su actividad antioxidante. Diversas partes de esta planta son utilizadas en la medicina tradicional mexicana, para el tratamiento de hipertensión, insomnio y ansiedad. Debido a su importancia como alimento y medicinal es necesario establecer cultivos *in vitro* con el propósito de realizar estudios de diferenciación e indiferenciación, y el efecto de estos procesos en la producción de metabolitos secundarios, en específico de compuestos fenólicos. El objetivo del presente estudio fue establecer cultivos *in vitro* de zapote blanco a partir de segmentos nodales de ramas de árboles adultos, recolectadas en las cuatro estaciones del año (primavera, verano, otoño e invierno), utilizando cinco rutinas de asepsia, que consistieron en el uso de tres soluciones conteniendo hipoclorito de sodio comercial, detergente neutro y el fungicida Tecto 60®. El establecimiento óptimo se consiguió con la siembra segmentos nodales conteniendo yemas apicales y axilares, en medio nutritivo MS (Murashige y Skoog), con 30 gL<sup>-1</sup> de sacarosa, 7 gL<sup>-1</sup> de agar, 1 gL<sup>-1</sup> de carbón activado, 5 gL<sup>-1</sup> de Tecto60® y 500 mgL<sup>-1</sup> de ampicilina, con 0.05 mgL<sup>-1</sup> de benciladenina (BA) y mantenidas en cuarto de cultivo (25°C, 16 h de luz con fotoperíodo, 32  $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ ). A los 14 días, la mejor rutina de asepsia fue R5 en explantes recolectados en invierno (84.7% de supervivencia, 5% de contaminación y 5% por pardeamiento), que consistió en: Solución 1, hipoclorito de sodio comercial (6% de cloro activo) 10% v/v + 10 gL<sup>-1</sup> Tecto60® por 5 min; Solución 2, detergente neutro (Hyclin®) 20% v/v + 10 gL<sup>-1</sup> Tecto60® por 15 min; Solución 3, hipoclorito de sodio comercial 20% v/v + 10 gL<sup>-1</sup> Tecto60® por 20 min]. A los 28 días se desarrolló el brote inicial, utilizado como fuente de yemas apicales, que fueron cultivadas en medio Murashige y Skoog (MS) con BA (0.5 y 1 mgL<sup>-1</sup>) y ácido naftalenacético (ANA) (0-0.5 mgL<sup>-1</sup>) para inducir la formación y multiplicación de brotes; el enraizamiento de brotes y formación de plántulas se evaluó en MS con ácido indol-3-butírico (AIB) (0-25 mgL<sup>-1</sup>). Para la formación de callo, los explantes se cultivaron en BA (0-0.5 mgL<sup>-1</sup>) y Picloram (ácido 4-amino-3,5,6-tricloropicolínico) en diferentes concentraciones (0, 0.1, 0.25, 0.5, 1 y 2 mgL<sup>-1</sup>). Un óptimo número de brotes se obtuvo en el 0.5 mgL<sup>-1</sup> BA y 0.1 mgL<sup>-1</sup> ANA (6 brotes/explante), la formación de callo se obtuvo en MS con 2 mgL<sup>-1</sup> Picloram con tejido indiferenciado del 40% en promedio de los explantes. A los 28 días del cultivo de los brotes en MS ½ con 15 mgL<sup>-1</sup> AIB, se formaron plántulas (4.5 cm de altura, 3.2 raíces de 3 cm de largo). Con esta investigación se logró el establecimiento *in vitro* de segmentos nodales de un árbol adulto de zapote blanco, seleccionando una óptima rutina de asepsia y época de recolecta, obteniendo los medios de cultivo para el cultivo callos, brotes y plántulas, que fueron utilizados para la determinación de fenoles totales y la actividad antioxidante (Capítulo 2).

**Palabras clave:** Asepsia, callos, cultivos *in vitro*, diferenciación, plántulas, zapote blanco.

## Introducción

El establecimiento *in vitro* de árboles frutales, generalmente se realiza con la siembra de semillas, debido a los bajos índices de contaminación y oxidación que se presentan, pero al usarlas, se obtienen plantas con variabilidad genética y pueden perderse características particulares de los genotipos, o pueden presentarse bajos porcentajes de germinación y las épocas de colecta son anuales, en muchas de las especies. Además, hay árboles que no producen semillas o su producción es muy baja (Abdelnour *et al.*, 2011; Minchala-Patiño *et al.*, 2014). Una alternativa a esta problemática es el uso de explantes vegetativos como los segmentos nodales que contienen yemas apicales y axilares, segmentos de hojas, tallos y de raíces, que son útiles para la conservación de genes de interés comercial debido a que es un sistema de propagación clonal o asexual (López-Gómez *et al.*, 2011).

Sin embargo, una de las desventajas del cultivo *in vitro* de explantes vegetativos, son los altos índices de contaminación, debido a su morfología, los meristemas se encuentran cubiertos por primordios foliares que se encuentran muy cerrados y las soluciones de asepsia no penetran hasta los meristemas, sumando las condiciones climáticas que influyen en la contaminación. En condiciones climáticas en zonas tropicales, favorecen el desarrollo y la multiplicación de los microorganismos, que tienen un efecto negativo sobre los explantes (Gándara-Ledezma *et al.*, 2023). También, al utilizar rutinas de asepsia muy agresivas, se activan enzimas tipo polifenoloxidasas y tirosinasas, y se presenta la oxidación de los tejidos (Hernández y Gonzáles, 2010).

Para disminuir la contaminación o la oxidación en este tipo de explantes y asegurar un óptimo establecimiento *in vitro*, se han desarrollado distintas rutinas de asepsia, como las reportadas en explantes de aguacate (*Persea americana* var. *drymifolia*), en los que se utilizaron combinaciones de detergente, fungicida (Antrak 500 PH) y bactericida (Agry-Gent Plus 800) así como el uso de ácido cítrico y ácido ascórbico, obteniendo solo un 60% de contaminación y un 7 % de oxidación (Ibarra-López *et al.*, 2016). Para el establecimiento *in vitro* de *Myroxylon balsamum*, un árbol de uso maderable y medicinal, se utilizó una solución bactericida (Povidyn®), hipoclorito de sodio (NaClO), Tween y cloruro de mercurio (HgCl<sub>2</sub>), obteniendo

un porcentaje de supervivencia del 90% y ningún tejido oxidado, después de 30 días de su cultivo (Indacochea *et al.*, 2018). En otras investigaciones se ha demostrado también el establecimiento *in vitro* de especies leñosas, frutales o forestales, como campincerán (*Dalbergia congestiflora*) (Hernández-García *et al.*, 2021), coco (*Cocos nucifera*) (Nguyen *et al.*, 2015), plátano (*Musa balbisiana*) (Suman, 2017) y manzana (*Malus domestica*) (Teixeira da Silva *et al.*, 2019). Sin embargo, la eficiencia de establecer cultivos *in vitro* de estos tipos de plantas, depende de la especie, del tipo y etapa fenológica de los explantes, así como de la época de colecta (Zurita-Valencia *et al.*, 2014).

Una vez que se han establecido los cultivos *in vitro* y se obtienen altos porcentajes de supervivencia de los explantes y un óptimo crecimiento y desarrollo de éstos, se utilizan como fuente de tejidos (nudos, entrenudos o yemas apicales) para conseguir la inducción de callos o de brotes, etapa en la que es muy importante utilizar un medio de cultivo y una combinación de citocinina y auxina para la inducción de la formación de brotes o de callos (Larson *et al.*, 2006; Feeney *et al.*, 2007; Rashmi y Trivedi, 2014). Abdelnour *et al.* (2011) logró un óptimo establecimiento *in vitro* del pilón (*Hieronyma alchorneoides*), una especie de valor maderable, obteniendo un 65% de brotación con 0.5 mgL<sup>-1</sup> de BA en medio MS al 50%; Echenique y Calle (2020), establecieron cultivos *in vitro* a partir de pétalos de cacao (*Theobroma cacao*), obteniendo un 34% de callo; y un alto número de brotes (9.6 brotes/explante) se reportó en yemas axilares de *Dalbergia congestiflora*, también un árbol de valor maderable, en MS con 1 mg L<sup>-1</sup> de BA y 0.1 mgL<sup>-1</sup> de ANA (García-Hernández *et al.*, 2021).

La inducción de callos, además de ser útil para la micropropagación por la formación de brotes o de embriones somáticos, pueden ser utilizados para el establecimiento de suspensiones celulares y realizar estudios de producción de metabolitos secundarios. Esta etapa, generalmente se requiere de una elevada concentración de auxinas, para lo cual se utilizan el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), ANA, Dicamba y Picloram, combinadas con citocininas como BA (Trabelsi *et al.*, 2010), como se ha reportado para dos especies de eucalipto (*Eucalyptus globulus* y *E. erythronem*) (Glocke *et al.* 2006; Larson *et al.*, 2006). En cotiledones de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*, el uso de Picloram fue determinante para la inducción rápida y eficiente en la formación de callos, al compararse con Dicamba y 2,4-D (Coelho de Moura *et al.*, 2017). Así

mismo, en explantes de inflorescencias de la palma de aceite (*Elaeis guineensis*) cultivados en MS adicionado con Picloram, no solo se obtuvo el mayor porcentaje de explantes con callo (77.78%), sino que la inducción fue muy rápida, después de 10 días del cultivo (Kartika *et al.*, 2019).

El zapote blanco (*C. edulis* La Llave et Lex.), un árbol frutal de la familia Rutaceae, es una especie con pocos estudios de cultivos *in vitro*, posiblemente a la problemática antes mencionada que este tipo de plantas presenta. Debido a que posee propiedades medicinales, ya que es utilizada en la medicina tradicional mexicana, cuyo uso se remonta desde los pueblos prehispánicos (Vidal-López *et al.*, 2008), por sus efectos hipnóticos y para el tratamiento de la hipertensión, el insomnio y ansiedad (Awaad *et al.*, 2007), y a que también existe poca información sobre cultivos *in vitro* encaminados para su propagación clonal (micropropagación), es importante establecer las condiciones óptimas del cultivo *in vitro* con fines de realizar estudios para la inducción de callos, suspensiones celulares, brotes y plántulas (Martínez *et al.*, 2006; Abd-Elmeged *et al.*, 2015; Alhady y Reda, 2017).

En nuestro grupo de trabajo existe el interés de establecer cultivos *in vitro* de esta especie con fines de estudiar el efecto de la diferenciación y la indiferenciación celular en la producción de sus compuestos principales como los fenólicos, que se reportan en las diferentes partes de la planta (Martínez, 1989; Berdonces, 2009; Jiménez, 2012; Argueta, 2014). Por lo tanto, el objetivo de esta etapa de la investigación, fue determinar una óptima rutina de asepsia y definir la época de la recolecta de los explantes, para asegurar un óptimo establecimiento *in vitro* de zapote blanco a partir de segmentos nodales de ramas jóvenes, para realizar la inducción de la formación de callos (callogénesis) y de brotes (organogénesis directa) para el desarrollo de plántulas.

## **Materiales y métodos**

### **Material biológico**

Los cultivos *in vitro* se establecieron de ramas jóvenes de árboles adultos de zapote blanco (*C. edulis*) a inicios de las cuatro estaciones del año (primavera, verano, otoño e invierno),

cultivados en un huerto urbano de la ciudad de Morelia, Michoacán, México (19°41'16.0"N 101°13'11.6"O). La clasificación taxonómica fue realizada por el Herbario de la Facultad de Biología (EBUM) de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, con el número de folio EBUM 2200 (Figura 2).

### Medios y condiciones de cultivo

Se utilizaron frascos de cultivo de vidrio de un volumen de 100 mL con 20 mL de medio de cultivo, con tapa tipo magenta. La incubación se realizó en condiciones de cuarto de cultivo: 25° C de temperatura, un fotoperiodo de 16 horas/luz, lámparas de luz blanca fluorescente con una intensidad de  $32 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (~2000 luxes). Para el establecimiento *in vitro* se utilizó el medio basal de Murashige y Skoog (MS) (Murashige y Skoog, 1962), con  $30 \text{ g L}^{-1}$  de sacarosa,  $7 \text{ g L}^{-1}$  de agar bacteriológico,  $1 \text{ g L}^{-1}$  de carbón activado,  $500 \text{ mg L}^{-1}$  de ampicilina (AMSA Lab., México),  $5 \text{ g L}^{-1}$  del fungicida Tecto60® (Tiabendazol 600, Syngenta, México) y  $0.05 \text{ mg L}^{-1}$  de benciladenina (BA), con un ajuste de pH de 5.75. Se utilizaron soluciones concentradas (stocks), mantenidas en refrigeración o congelación.



**Figura 2.** Ejemplar de herbario de zapote blanco (A) y ficha de confirmación de especie (Folio 2200 EBUM) (B).

Todas las sales son de Meyer® (México); las vitaminas, myo-inositol, glicina y los reguladores de crecimiento (benciladenina, BA; ácido  $\alpha$ -naftalenacético, ANA; ácido indol-3butírico, AIB; y ácido 4-amino-3,5,6-tricloropicolínico (Picloram), son de Sigma-Aldrich® (México). La sacarosa y agar de Bioxón®, México.

### Establecimiento del cultivo *in vitro*

El establecimiento *in vitro* se realizó a partir de segmentos nodales de ramas de 4 a 5 cm de largo con yemas apicales y axilares (Figura 3A), recolectadas en las cuatro estaciones del año, que fueron tratadas con diversas rutinas de asepsia (Cuadro 5). A los 14 días se determinaron los porcentajes de contaminación, oxidación y supervivencia de los explantes.

### Inducción de la formación de callos, brotes, raíces y plántulas

Para la respuesta de diferenciación e indiferenciación *in vitro*, se cultivaron yemas apicales del brote inicial de 28 días de cultivo en el medio MS con 1 gL<sup>-1</sup> de carbón activado, 10 gL<sup>-1</sup> de fungicida (Tecto60®) y 250 mgL<sup>-1</sup> de ampicilina.

**Cuadro 5.** Rutinas de asepsia para el establecimiento *in vitro* de segmentos nodales de zapote blanco (*C. edulis*).

| No.<br>Rutina | Soluciones de Asepsia              |                             |                  |                       |                  |                                    |                             |                  |
|---------------|------------------------------------|-----------------------------|------------------|-----------------------|------------------|------------------------------------|-----------------------------|------------------|
|               | Solución 1                         |                             |                  | Solución 2            |                  | Solución 3                         |                             |                  |
|               | Hipoclorito de sodio comercial (%) | Tecto60 (gL <sup>-1</sup> ) | Exposición (min) | Detergente neutro (%) | Exposición (min) | Hipoclorito de sodio comercial (%) | Tecto60 (gL <sup>-1</sup> ) | Exposición (min) |
| <b>R1</b>     | 10                                 | 5                           | 10               | 20                    | 5                | 20                                 | 5                           | 15               |
| <b>R2</b>     | 10                                 | 5                           | 15               | 20                    | 5                | 20                                 | 5                           | 20               |
| <b>R3</b>     | 10                                 | 10                          | 10               | 20                    | 5                | 20                                 | 10                          | 15               |
| <b>R4</b>     | 10                                 | 10                          | 15               | 20                    | 5                | 20                                 | 10                          | 20               |
| <b>R5</b>     | 10                                 | 25                          | 5                | 20                    | 15               | 20                                 | 25                          | 20               |

En el cuadro 6 se muestran las combinaciones de BA y Picloram para la inducción de la formación de callo; para la formación de brotes, se utilizaron las combinaciones de BA y ANA que se describen en el cuadro 7.

El enraizado se determinó con la siembra de brotes micropropagados en MS  $\frac{1}{2}$  (a la mitad de nutrientes y vitaminas) con AIB en concentraciones de 0, 1, 5, 10, 15 y 25 mgL<sup>-1</sup>. Cada 7 días se realizaron observaciones para determinar los porcentajes de formación de callos, de brotes, así como del número de brotes, de raíces y su tamaño (cm). Las plántulas desarrolladas en el medio óptimo de enraizado, fueron cultivadas en MS con 0.05 mgL<sup>-1</sup> por 28 días.

**Cuadro 6.** Tratamientos para la inducción de callos en segmentos de tallos de zapote blanco (*C. edulis*).

| Tratamiento | Benciladenina (mgL <sup>-1</sup> ) | Picloram (mgL <sup>-1</sup> ) |
|-------------|------------------------------------|-------------------------------|
| T1          | 0.05                               | 0.1                           |
| T2          | 0.1                                | 0.1                           |
| T3          | 0.05                               | 1.0                           |
| T4          | 0.1                                | 1.0                           |
| T5          | 0                                  | 0.1                           |
| T6          | 0                                  | 1.0                           |
| T7          | 0                                  | 0.5                           |
| T8          | 0                                  | 2.0                           |

**Cuadro 7.** Tratamientos para la inducción de brotes en yemas apicales del brote inicial *in vitro* de zapote blanco (*C. edulis*).

| Tratamiento | Benciladenina (mgL <sup>-1</sup> ) | Ác. naftalenacético (mgL <sup>-1</sup> ) |
|-------------|------------------------------------|------------------------------------------|
| T1          | 0.5                                | 0.05                                     |
| T2          | 0.5                                | 0.25                                     |
| T3          | 0.5                                | 0.5                                      |
| T4          | 0.5                                | 0.1                                      |
| T5          | 1.0                                | 0                                        |
| T6          | 1.0                                | 0.1                                      |
| T7          | 1.0                                | 0.25                                     |

## **Cinética de crecimiento de callos**

A los 30 días del cultivo inicial se obtuvo callo debidamente formado, por lo cual se subcultivaron 0.5 g de callo (peso fresco, p.f.) procedente del mejor medio de cultivo de inducción de callo. Para obtener el peso, se tomaron muestras de callo durante 5 días por 35 días y se pesaron en una balanza analítica.

## **Análisis estadístico**

Los resultados se expresan como la media  $\pm$  desviación estándar, el número de muestra (n) fue dependiente de cada etapa de la investigación: para el establecimiento *in vitro* y para el trasplante, aclimatación y cultivo en invernadero, se utilizó una n=25; para la formación de callos, inducción de brotes y enraizado la n fue de 5. Los datos se procesaron mediante un análisis de varianza de una vía y las medias se compararon con la prueba de Tukey con un nivel de significación de  $p \leq 0.05$ , utilizando el paquete estadístico JMP8.

## **Resultados**

### **Selección de la rutina de asepsia óptima para el establecimiento *in vitro***

La contaminación microbiana y la oxidación de explantes son las mayores dificultades para el establecimiento *in vitro* de árboles o especies leñosas (Hernández y Gonzáles, 2010), aunque se ha observado éxito en diversas especies (Abdelnour *et al.*, 2011; Ibarra-López *et al.*, 2016; Perales *et al.*, 2016; Hernández-García *et al.*, 2021). Durante el establecimiento *in vitro* de explantes de zapote blanco (Figura 3), la oxidación (Figura 3B) y la contaminación (Figura 3C) de los explantes se observaron en altos porcentajes en los provenientes de las ramas colectadas en las estaciones de verano y otoño. Sin embargo, los colectados en primavera e invierno mostraron los más altos porcentajes de supervivencia con una de las rutinas utilizadas, obteniendo explantes con baja proporción de oxidación y que mantuvieron su color verde y óptima apariencia para conseguir la formación de brote inicial, ya que las yemas se observaron activas (Figura 3D).

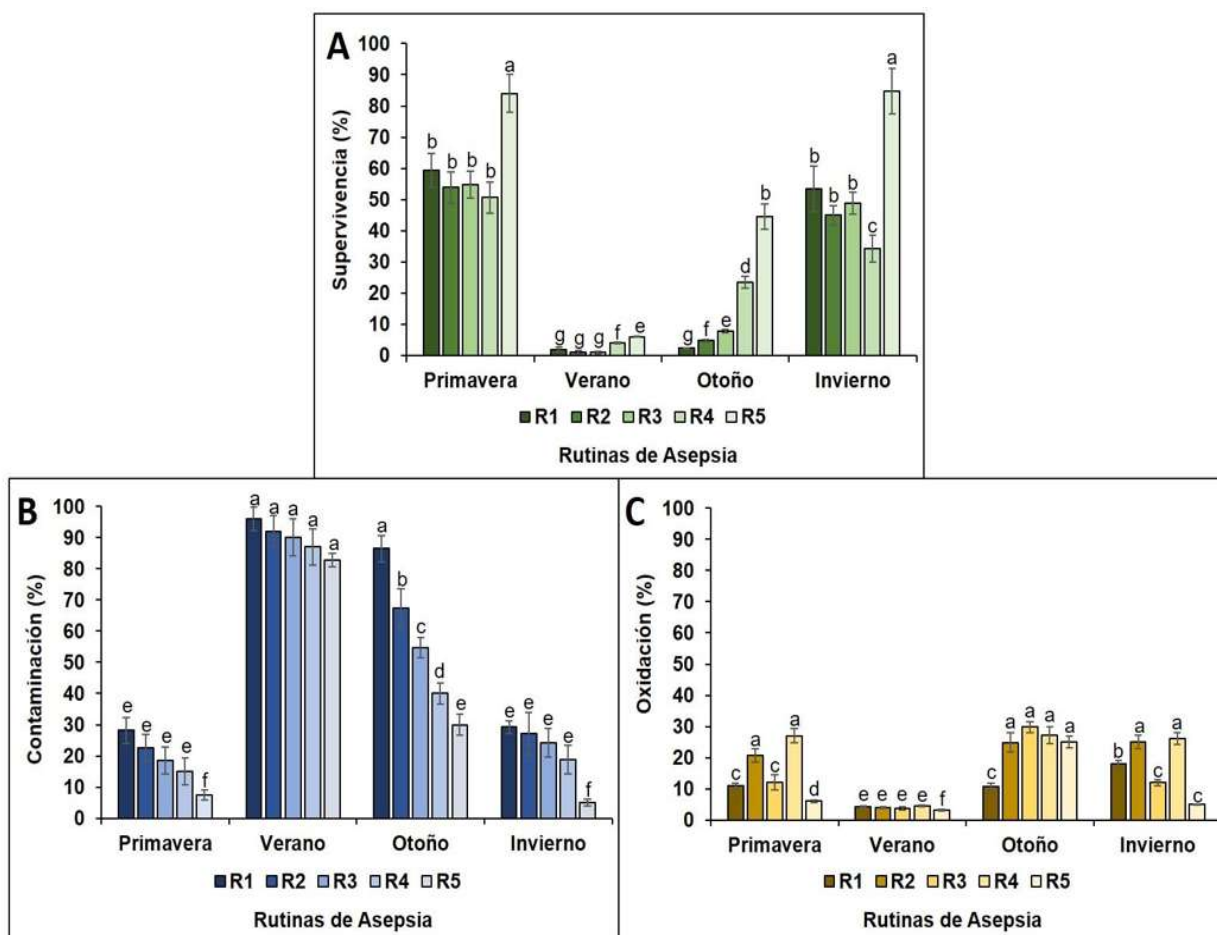


**Figura 3.** Explantes de zapote blanco (*C. edulis*) durante el establecimiento *in vitro*: A) Segmento nodal con yemas apicales y axilares; B) Oxidación del explante; C) Contaminación fúngica en explante; D) Explante superviviente. A los 14 días de cultivo.

Durante el establecimiento *in vitro* de los explantes de zapote blanco, la contaminación fue más baja en los explantes de ramas recolectadas en primavera e invierno, ya que, con todas las rutinas de asepsia utilizadas, los porcentajes fueron menores al 30%, presentando los valores más bajos con el uso de la rutina 5 (R5) con solamente un 7.5% de contaminación en explantes de primavera y un 5% en los de invierno, sin diferencias significativas entre éstos (Figura 4). Los mayores porcentajes de contaminación (82.8-96%) se presentaron en los explantes recolectados a inicios del verano, independientemente de las rutinas de asepsia utilizadas, resultados similares se obtuvieron en otoño, aunque con porcentajes más bajos de contaminación (30-85.5%), obteniendo el valor más bajo en los explantes tratados con R5 (Figura 4A). La contaminación de los explantes fue por hongos (Figura 3C), aún con la adición de fungicida en el medio de cultivo, debido a que el medio fue suplementado con antibiótico, no hubo la presencia de bacterias.

Los porcentajes de oxidación fueron menores al 30% en todos los explantes cultivados, aunque en los recolectados en otoño se presentaron los valores más altos con las rutinas R2, R3, R4 y R5, con porcentajes sin diferencias significativas entre los valores obtenidos en explantes de primavera e invierno, con las rutinas R2 y R4. En los explantes de primavera e invierno, los porcentajes de oxidación fueron más bajos con el uso de la rutina R5, con un 6% y 5%, respectivamente, sin diferencias significativas entre estos valores (Figura 4B). Los explantes de

ramas recolectadas en verano mostraron los porcentajes bajos de oxidación (3.2-4.5%) debido a que un alto porcentaje de los explantes presentaron contaminación fúngica.



**Figura 4.** Porcentajes de contaminación (A), oxidación (B) y supervivencia (C) de explantes de segmentos nodales de zapote blanco (*C. edulis*) de ramas recolectadas en primavera, verano, otoño e invierno, tratados con cinco diferentes rutinas de asepsia (R1, R2, R3, R4 y R5). A los 14 días del cultivo. Letras distintas indican que existe diferencia significativa ( $p \leq 0.05$ ,  $n=25$ , prueba de Tukey).

Debido a la alta contaminación fúngica en los explantes de ramas recolectadas en verano y otoño, así como por la oxidación de éstos, los porcentajes de supervivencia fueron los más bajos, con un 1 a 6% en los de verano y con un 2.4 a 44.5% en los de otoño. En éstos, el uso de la rutina R5 favoreció la supervivencia más alta de los explantes (Figura 4C). Con esta rutina (R5), los explantes de primavera e invierno, mostraron los más altos porcentajes de supervivencia con 84 y 84.7%, respectivamente, sin diferencias significativas entre ambos valores. En los

explantes de primavera, la supervivencia fue igual independientemente de las rutinas R1 a R4, con porcentajes de 50.72 a 59.5%. Sin embargo, en las de invierno, con la rutina R4 se obtuvo un porcentaje de supervivencia de 34.2% (Figura 4C). En los explantes de ramas de zapote blanco recolectadas en primavera e invierno, la disminución de la contaminación fúngica y los altos porcentajes de supervivencia se relacionó con los mayores tiempos de exposición de las soluciones de asepsia, en las que se adicionó el fungicida en altas concentraciones.

Resultados similares de porcentajes de contaminación fueron reportados durante el establecimiento *in vitro* de aguacate (*Persea americana* var. *drymifolia*), al utilizar combinaciones de detergentes, fungicida (Antrak 500 PH) y bactericida (Agry-Gent Plus 800), en agitación constante por 1.5 horas para obtener un 73% de supervivencia de tejido libre de contaminación (Ibarra-López *et al.*, 2016). En el establecimiento *in vitro* de *Myroxylon balsamum*, un árbol de uso maderable y medicinal, utilizaron una solución bactericida (Povidyn® al 1%) por 20 min, después, NaClO al 15% v/v, 2 gotas de Tween por 5 min y al final HgCl<sub>2</sub> por 5 min, obteniendo un porcentaje de supervivencia del 90% (Indacochea *et al.*, 2018).

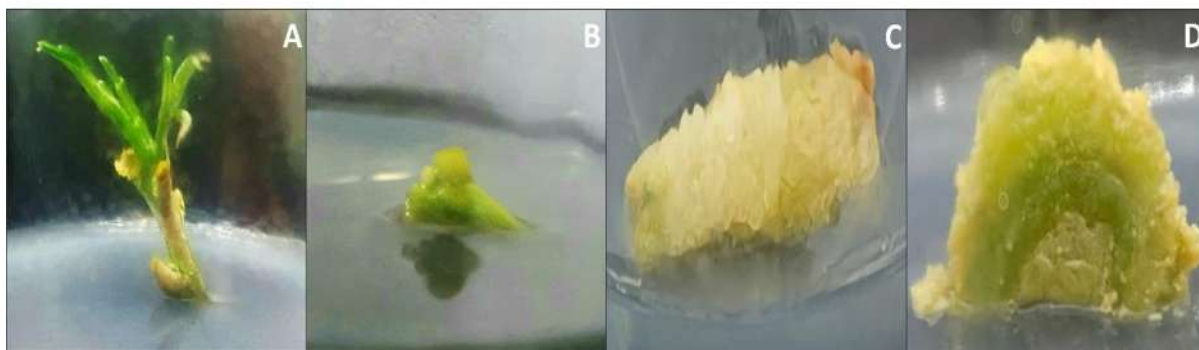
El uso de hipoclorito de sodio en el cultivo de tejidos vegetales es el más empleado para el control de contaminación microbiana, en inmersiones con un porcentaje que va del 1 al 20% (Mroginski *et al.*, 2010). La oxidación, mayormente en el cultivo de tejidos es causada por la acción de la enzima polifenol oxidasa que se libera o sintetiza cuando los tejidos sufren lesiones, principalmente en especies leñosas (Azofeifa, 2009). Debido a esto, los explantes se oxidan, tomando una tonalidad oscura o marrón en los tejidos y perjudicando su crecimiento en el cultivo *in vitro* (De Filippis, 2013). El carbón activado en el medio de cultivo ayudó en reducir los niveles de oxidación de los explantes de zapote blanco, como lo reportado en aguacate, donde combinaron el carbón activado y el ácido cítrico al medio de cultivo, lo cual permitió reducir hasta un 70% el proceso de oxidación (Cortés-Rodríguez *et al.*, 2011).

El uso del medio de establecimiento, que consistió en un medio MS con 30 gL<sup>-1</sup> de sacarosa, 1 gL<sup>-1</sup> de carbón activado, 10 gL<sup>-1</sup> de Tecto60®, 250 mgL<sup>-1</sup> de ampicilina y 0.05 mgL<sup>-1</sup> de BA, junto con la rutina óptima de asepsia R5, en los explantes de segmentos nodales recolectados

tanto en primavera como invierno, permitió el obtener explantes aptos para los estudios de callogénesis, brotación y desarrollo de plántulas, obteniendo el desarrollo de brote inicial en éstos, desde los 14 días de cultivo (Figura 5A).

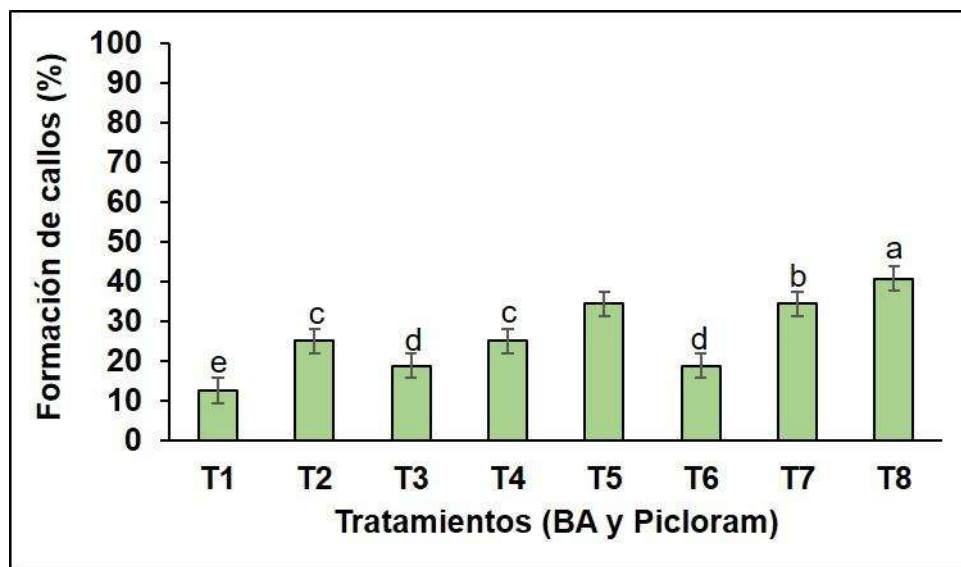
### Medio de cultivo para la formación y desarrollo de callo

Segmentos de tallo de los brotes regenerados de 28 días de cultivo, de la colecta de invierno (Figura 5B), fueron cultivados en los diferentes tratamientos con BA y Picloram, obteniendo la formación de callo en todos los tratamientos, con porcentajes de explantes que desarrollaron el proceso de indiferenciación desde un 12.5% (T1, 0.5 BA mgL<sup>-1</sup> y 0.05 Picloram mgL<sup>-1</sup>) hasta un 40.6 % (T8, 2 mgL<sup>-1</sup> Picloram) (Figura 6), a los 28 días del cultivo (Figura 5C). En los tratamientos que solo contenían Picloram, a excepción del T6, se obtuvieron porcentajes similares de formación de callo con 34.4% tanto en T5 (0.1 mgL<sup>-1</sup>) como en T7 (0.5 mgL<sup>-1</sup>).



**Figura 5.** Desarrollo de brote inicial (A) en explantes de zapote blanco (*C. edulis*), a los 28 días del cultivo; B), explante de brote inicial para la inducción de la formación de callo; C) Callo a los 14 días del cultivo en MS con 2 mgL<sup>-1</sup> de Picloram (T8); y, D) Callo de 28 días de recultivo en T8.

Aunque el porcentaje de formación de callo en los explantes de zapote blanco es menor al 50%, después de 28 días de su cultivo, se realizó el subcultivos de callos con fragmentos de 0.5 cm de diámetro en el medio T8, obteniendo un óptimo crecimiento, con el crecimiento de callo friable de color amarillo-verdoso hasta los 28 días del cultivo, sugiriendo la óptima selección del medio de cultivo para el mantenimiento y proliferación de los callos (Figura 5D).



**Figura 6.** Porcentajes de formación callos en explantes de zapote blanco (*C. edulis*) a los 28 días del cultivo en MS con diferentes tratamiento de BA y Picloram. Letras distintas indican que existe diferencia significativa ( $p \leq 0.05$ ,  $n=5$ , prueba de Tukey).

Para la inducción de la formación de callo, se ha determinado que factores como el tipo de explante, la posición durante el cultivo, de la especie vegetal y de la combinación y tipos de reguladores de crecimiento, así como la luz, son importantes, aunque la adición de auxina al medio de cultivo inductor de callo es lo esencial para lograr la indiferenciación del tejido y lograr una óptima formación de callo y que se mantenga bajo crecimiento *in vitro* (Trabelsi *et al.*, 2010). El Picloram se ha utilizado para la obtención de callos con estabilidad genética a comparación del Dicamba, o del 2,4-D, tanto en especies medicinales como forestales. En explantes de *Dioscorea tokoro* se usó  $2.4 \text{ mgL}^{-1}$  de Picloram para la inducción y formación de callo (Ishizak, 2021), en *Verbena bipinnatifida*, el mejor desarrollo del callo se obtuvo con una concentración de  $2 \text{ mgL}^{-1}$  de Picloram (Genady, 2017).

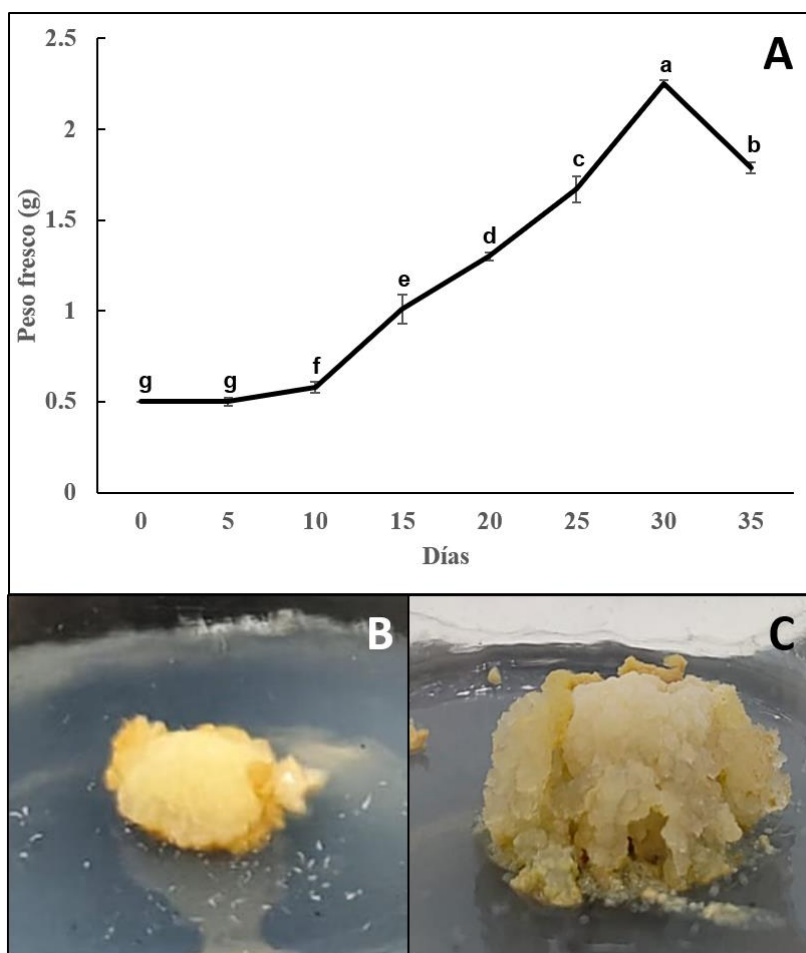
Fonseca-Carrasco *et al.* (2020) demostraron que el tipo de explantes y la posición de cultivo (limbos foliares en posición abaxial y adaxial, tallos seccionados transversal y longitudinalmente y pecíolos) de *Morus alba* (morera), no tuvo un efecto directo en la formación de callos, ya que con éstos se obtuvieron valores superiores al 86 %, a los 30 días de cultivo, en medio con  $2.0 \text{ mgL}^{-1}$  de BA y  $0.5 \text{ mgL}^{-1}$  de 2,4-D.

Aunque con BA y Picloram se obtuvo la formación de callos en explantes de zapote blanco, el Picloram ejerció un mayor efecto tanto en la indiferenciación como en mantener el crecimiento de los callos de una manera óptima durante el desarrollo de la investigación.

### **Determinación del crecimiento de callo**

Se realizó la determinación del crecimiento de callo con base en peso fresco (p.f), mediante una cinética de crecimiento de 35 días, con callos cultivados en el medio T8. En la figura 7A se observa que la mayor producción de biomasa de peso fresco, se registró al día 30 de cultivo, a partir del cual el peso disminuye. En esta cinética de crecimiento se observa una etapa de adaptación de diez días, en seguida de la cual inicia la etapa de crecimiento exponencial, en la que, se observan los valores de peso fresco crecientes, hasta el día 30, en el que se obtuvo el máximo valor con 2.25 g p.f., lo cual indicó un incremento de hasta 4.5 veces, el inóculo inicial. A este tiempo se observó un decremento fuerte del crecimiento de callo (Figura 7A). En las figuras 7B y 7C se observa el fragmento de callo al inicio de la cinética de crecimiento y a los 30 días de ésta, respectivamente.

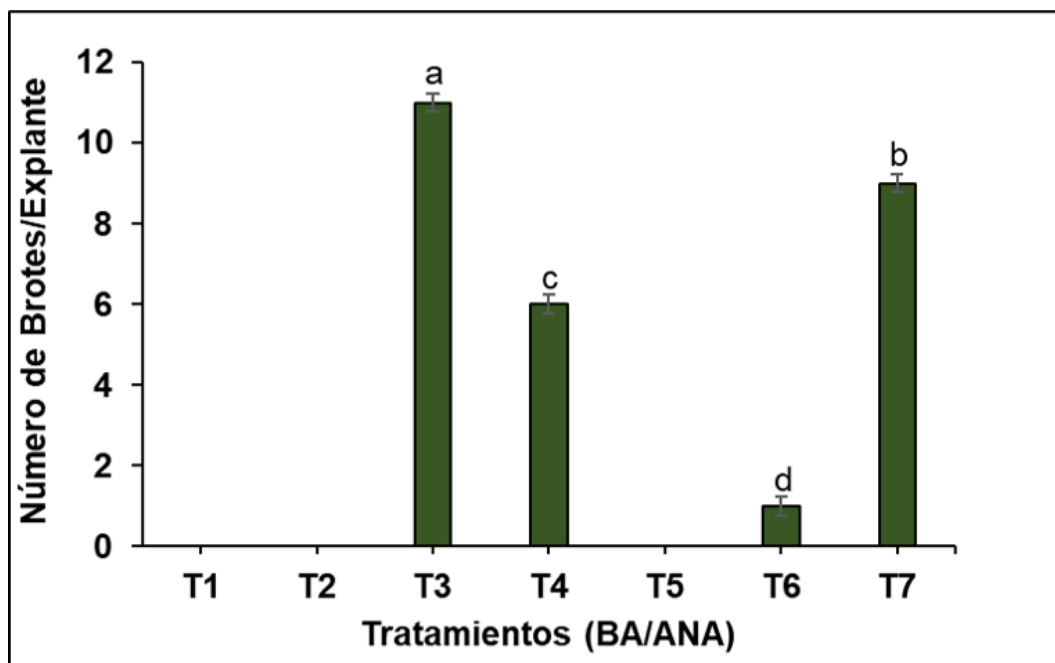
La importancia de inducir a la formación de callo en explantes de plantas con interés medicinal, es por el potencial para formar órganos (organogénesis) o embriones somáticos (embriogénesis somática), si el interés es la micropropagación y el mejoramiento genético, pero también para la producción de metabolitos secundarios (Rashmi y Trivedi, 2014; Rodríguez-Beraud *et al.*, 2014; Ochoa-Villarreal *et al.*, 2016). En cinéticas de crecimiento de callos como *Bletilla striata*, se presentó un peso máximo a los 33 días tanto en peso fresco como peso seco (Pan *et al.*, 2022), para *Angelica sinensis* el peso máximo fue a los 21 días (Huang *et al.*, 2015), en *Zingiber officinale* se utilizaron 8 mgL<sup>-1</sup> de Picloram, estudio en el que, los callos alcanzaron su peso máximo de 3.68 g p.f. a los 45 días (Gnasekaran *et al.*, 2023). La cantidad de biomasa producida por los callos de zapote blanco puede considerarse óptima ya que un aumento de 4.5 veces en 30 días se ha reportado en promedio en otras especies vegetales como las antes mencionadas.



**Figura 7.** Crecimiento de callo (peso fresco) (A) de zapote blanco (*C. edulis*) durante 35 días de cultivo, cultivados en MS con 2 mgL<sup>-1</sup> de Picloram; B) Callo al inicio de la cinética de crecimiento; C) Callo a los 30 días de la cinética de crecimiento. Letras distintas indican que existe diferencia significativa ( $p \leq 0.05$ ,  $n=3$ , prueba de Tukey).

### Medio de cultivo para la formación y desarrollo de brotes

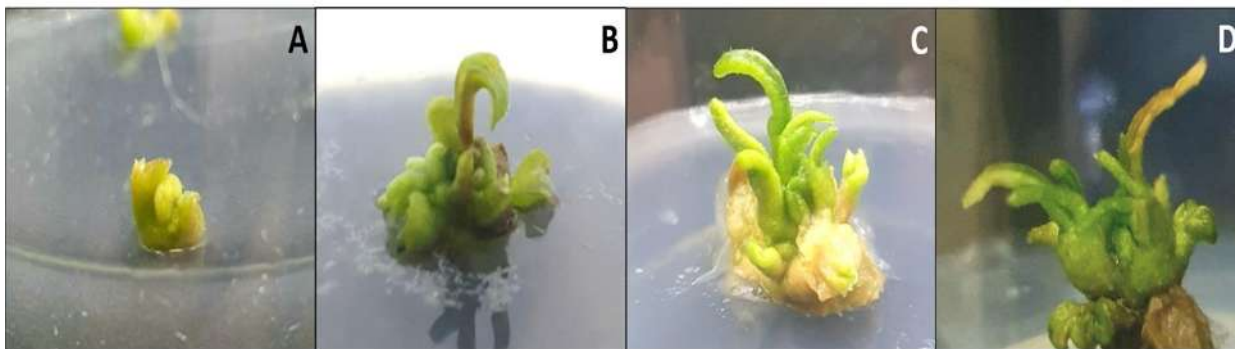
Para establecer las condiciones de inducción de formación y multiplicación de brotes, yemas apicales de los brotes iniciales de los segmentos nodales de zapote blanco, fueron cultivados en los diferentes tratamientos con BA/ANA (Figura 9A), presentándose la brotación solo en 4 de los tratamientos evaluados, con el mayor número de brotes (11 brotes/explante) en el tratamiento T3 (0.5 mgL<sup>-1</sup> BA y 0.5 mgL<sup>-1</sup> ANA) a los 28 días del cultivo y en el tratamiento T7, con 9 brotes/explante (1 mgL<sup>-1</sup> BA y 0.25 mgL<sup>-1</sup> ANA) (Figura 8).



**Figura 8.** Número de brotes obtenidos en yemas apicales del brote inicial *in vitro* de zapote blanco (*C. edulis*) obtenidos en diferentes concentraciones de BA/ANA, a los 28 días del cultivo. Letras distintas indican que existe diferencia significativa ( $p \leq 0.05$ ,  $n=5$ , prueba de Tukey).

Aunque a los 28 días, el mayor número de brotes se observó en los tratamientos T3 y T7, éstos mostraron un desarrollo con pequeños brotes y cloróticos (Figuras 9B, 9C), a comparación del tratamiento T4 ( $0.5 \text{ mgL}^{-1}$  BA y  $1 \text{ mgL}^{-1}$  ANA), donde se obtuvo una respuesta promedio en el número de brotes (6 brotes/explante), pero con un mejor desarrollo, mostrando una mayor apariencia de crecimiento (Figura 9D). Este medio de cultivo se utilizó para realizar de forma masiva la brotación múltiple y posteriormente llevarlos al enraizado para la producción de plántulas.

El uso de BA y ANA son los más utilizados para la obtención de brotes, reportado con una combinación de  $0.5 \text{ mgL}^{-1}$  de BA y  $0.2 \text{ mgL}^{-1}$  de ANA a los 42 días de siembra, una óptima producción de brotes de zapote blanco (Abd-Elmeged *et al.*, 2015). Para la obtención de brotación *in vitro* de *Paeonia rockii* utilizaron concentraciones parecidas a las utilizadas en esta investigación, que va de  $0.5$  a  $1 \text{ mgL}^{-1}$  de BA y  $0.5$  a  $2.5 \text{ mgL}^{-1}$  de ANA (Teixeira da Silva *et al.*, 2012).



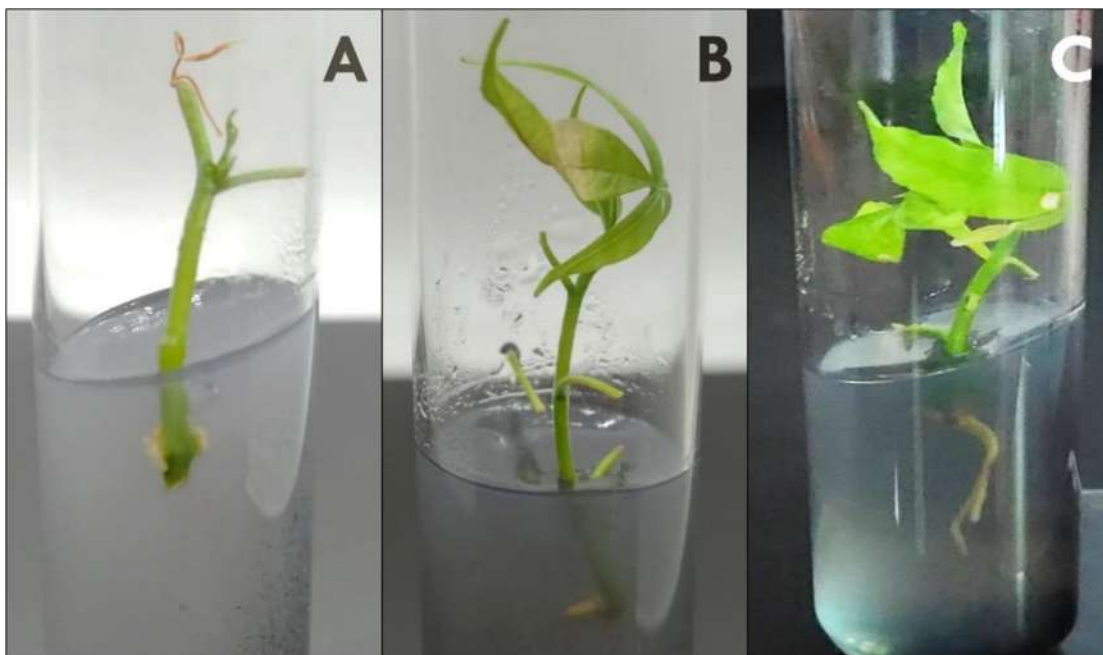
**Figura 9.** Formación y desarrollo de brotes en yemas apicales de zapote blanco (*C. edulis*) en diferentes concentraciones BA/ANA: A) Explante inicial; B) Brotes en T3; C) Brotes en T7; y, D) Brotes en T4. A los 28 días de cultivo.

### Medio de enraizamiento de brotes y formación de plántulas

Los brotes de 2 cm de longitud se colocaron en las diferentes concentraciones de AIB y cada 7 días se observó la presencia de raíz. Solamente en los tratamientos con  $10 \text{ mgL}^{-1}$  y  $15 \text{ mgL}^{-1}$  se obtuvieron brotes con respuestas, con porcentajes que desarrollaron raíces del 33.33% y 66.66%, respectivamente. Desde los siete días del cultivo, los brotes presentaron la formación de primordios de raíz (Figura 10A), con un leve crecimiento a los 14 días (Figura 10B), con la formación de plántulas a los 28 días, de 4.5 cm de altura, 3.2 raíces de 3 cm de largo) (Figura 10C).

En trabajos antes reportados de cultivos *in vitro* de zapote blanco, para el enraizamiento, se utilizó  $4 \text{ mgL}^{-1}$  de AIB y  $0.5 \text{ mgL}^{-1}$  de AIA, obteniendo el 44.44% de presencia de raíz en los explantes (Abd-Elmeged, *et al.*, 2015). En otras investigaciones, se ha reportado que los brotes inducidos en segmentos nodales de *Prosopis cineraria*, el enraizamiento fue mejor en el medio de cultivo MS con las sales reducidas al 50%, con 3.0 y  $5.0 \text{ mgL}^{-1}$  de AIB (Kumar y Singh, 2009), Resultados similares se han obtenido durante el enraizamiento de *Pithecellobium dulce* (Roxb.), con medio de cultivo compuesto por el 50% de las sales MS más  $0.5 \text{ mgL}^{-1}$  de AIB,  $2.0 \text{ gL}^{-1}$  de carbón activado, con lo que se permitió obtener un 80% de plantas enraizadas (Goyal *et al.*, 2012). Mientras, en *Caesalpinia pulcherrima* se obtuvo igual porcentaje de brotes enraizados

*in vitro* con un medio de cultivo que contenía el 50% de las sales MS adicionado con  $0.5 \text{ mgL}^{-1}$  de AIB (Jahan *et al.*, 2014).



**Figura 10.** Enraizamiento de brotes de zapote blanco (*C. edulis*) con  $15 \text{ mgL}^{-1}$  a los 28 días del cultivo. A) Brote con desarrollo de primordios de raíz (7 días); B) Brote con desarrollo de raíz (14 días); C) Plántula con raíces de 3 cm de longitud, con hasta dos pares de hojas.

## Conclusiones

Un óptimo establecimiento *in vitro* de segmentos nodales de ramas jóvenes de un árbol adulto de zapote blanco (*C. edulis*) se logró mediante el uso de la rutina de asepsia R5, que consistió en tres soluciones de asepsia, conteniendo hipoclorito de sodio, fungicida y detergente neutro, con la concentración más alta del fungicida y mayores tiempos de exposición. Con esto, se disminuyó la contaminación y la oxidación de los explantes, incrementando la supervivencia de éstos, en específico de los provenientes de las ramas recolectadas tanto en primavera como en invierno.

Se establecieron los cultivos de callos, de brotes y la formación de plántulas, a partir de la siembra de yemas apicales del brote inicial desarrollado en los segmentos nodales, lo que fue dependiente de las concentraciones y tipos de reguladores de crecimiento (auxinas y citocininas).

## Referencias

- Abd-Elmeged M.R., Abo El-fadl R.E. y Hassanen S.A. (2015). Propagation of sapota (*Casimiroa edulis*) trees by using tissue culture technique. *Egyptian Journal Desert Res.* 65 (2):257-266.
- Abdelnour A., Aguilar M. Valverde L. (2011). Micropropagación de pilón (*Hieronyma alchorneoides*). *Agronomía Costarricense.* 35(2): 9-19.
- Argueta A. (2014). Plantas Medicinales de Uso Tradicional en la Ciudad de México. 210 p.
- Awaad A.S., Maitland D.J. y Moneir S.M. (2007). New alkaloids from *Casimiroa edulis* fruits and their pharmacological activity. *Chemistry of Natural Compounds.* 43(5): 576-580.
- Azofeifa Á. (2009). Problemas de oxidación y oscurecimiento de explantes cultivados *in vitro*. *Agronomía Mesoamericana.* 20(1): 153-175.
- Berdonces J.L. (2009). Gran Diccionario de las Plantas Medicinales. Barcelona, Spain: Editorial Océano. 1192.
- Coelho L., Xavier A., Ferreira A. C., Gallo R., Gatti K. C., Amaral N., Wagner M y Otoni C. (2017). Effects of explant type, culture media and picloram and dicamba growth regulators on induction and proliferation of somatic embryos in *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*. *Revista Árvore.* 41(5):e410502, 10 p.
- Cortés-Rodríguez M.A., López-Gómez R., Martínez-Pacheco M.M., Suárez-Rodríguez L.M., Hernández-García A. y Salgado-Garciglia R. (2011). *In vitro* propagation of Mexican race avocado (*Persea americana* Mill. var. *drymifolia*). *Acta Horticultura.* 9(23):47-52.
- Da Silva R.F. y Montilla V. (2022). Establecimiento del sistema de embriogénesis somática en *Azadirachta indica* A. Juss a partir de suspensiones celulares, acoplado a la producción de azadiractina *in vitro*. *Revista Ingeniería UC.* 29(2): 156-167.
- De Filippis L.F. (2013). Crop improvement through tissue culture. In: P. Ahmad, M. Wani, M. Azooz y L. Tran (eds.). *Improvement of crops in the era of climatic changes.* Springer. NY. (1):289-346.

- Echenique M. y Calle D. (2020). Efecto de diferentes métodos de desinfección en el establecimiento *in vitro* de cacao (*Theobroma cacao* L.) en la estación experimental Sapecho – Bolivia. Revista de Investigación e Innovación Agropecuaria y de Recursos Naturales. 7 (1): 48-54.
- Fonseca-Carrasco Y.Y., Brizuela-Fuentes L. y Silva-Pupo J.J. (2020). Obtención de callos de *Morus alba* L. variedad acorazonada con medios de cultivo y tipos de explantes diferentes. Pastos y Forrajes. 43(1): 66-73.
- Gándara-Ledezma V., Tineo-García L., Castro-Espinoza L., Ruiz-Cru S., Márquez-Cervantes A. y Gutiérrez-Coronado M.A. (2023). Disinfection of adult pecan leaflets, and *in vitro* callogenesis induction. Polibotánica. (55), 121-144.
- Genady E.A. (2017). Influence of 2, 4-D and picloram on *in vitro* callus induction from *Verbena bipinnatifida* Nutt. and evaluation of *in vivo* anti-inflammatory activity of callus extract. Australian Journal of Basic and Applied Sciences. 11(2), 146-150.
- Glocke P., Collins G. y Sedgley M. (2006). Effects of auxins on organogenesis and somatic embryogenesis from juvenile explants of *Eucalyptus erythronema*, *E. stricklandii*, and two inter-specific hybrids. Journal of Horticultural Science and Biotechnology. 81(6): 1009-1014.
- Gnasekaran P., Rahman Z.A., Chew B.L., Uddain J., Solayappan M., Chear N.J.Y. y Subramaniam S. (2023). Picloram enhanced the callus induction, growth kinetics, antioxidant potentials, and secondary metabolites production of *Zingiber officinale* var. *rubrum* callus cultures. Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC). 155(3): 843-859.
- Goyal P., Kachhwaha S. y Kothari S.L. (2012). Micropropagation of *Pithecellobium dulce* (Roxb.) Benth a multipurpose leguminous tree and assessment of genetic fidelity of micropropagated plants using molecular markers. Physiol Molecular Biology Plants. 18(2): 169-176.
- Hernández-García A., Ambriz-Parra E., López-Albarrán P., Cruz-de León J. y Salgado-Garciglia R. (2021). *In vitro* propagation from axillary buds of the endangered tree *Dalbergia congestiflora* Pittier (Fabaceae). Plant Biotechnol (Tokyo). 38(4):409-414.
- Hernández Y. y González M. (2010). Efectos de la contaminación microbiana y oxidación fenólica en el establecimiento *in vitro* de frutales perennes. Cultrop. 31 (4): 00-00.
- Huang B., Han L., Li S. y Yan C. (2015). Optimization of induction, subculture conditions, and growth kinetics of *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels. callus. Pharmacognosy Magazine. 11(43): 574.
- Ibarra-López A., Ojeda-Zacarías M., García-Zambrano E. y Gutiérrez-Diez A. (2016). Inducción *in vitro* de brotes de dos cultivares de aguacate raza mexicana *Persea*

- americana* var. *drymifolia* Schltdl. & Cham. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas. 7 (2): 337-347.
- Indacochea B., Parrales J., Hernández A., Castro C., Vera M., Zhindón A., Gabriel J. (2018). Evaluación de medios de cultivo *in vitro* para especies forestales nativas en peligro de extinción en Ecuador. Agronomía Costarricense. 42(1): 63-89.
- Ishizak T. (2021). A tissue culture system for callus formation and plant regeneration using tuber discs of *Dioscorea tokoro* Makino, a pharmaceutical yam species. Biologia. 76:1141-1145.
- Jahan N., Bin S., Javed B. y Anis M. (2014). *In vitro* regeneration from nodal explants in *Caesalpinia pulcherrima* L.- An anticancerous woody legume. Agrotechnol. 2 (4): 288.
- Jiménez A. (2012). Herbolaria mexicana 2a ed. Madrid: Mundi-Prensa. 458 p.
- Kartika E., Lizawati L. y Zulkarnain Z. (2019). *In vitro* callus formation from male inflorescences of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) by the application of Picloram. Analele Universității din Oradea, Fascicula Biologie. 26(1): 57-61
- Kumar S. y Singh N. (2009) Micropropagation of *Prosopis cineraria* (L.) Druce—A multipurpose desert tree. Researcher. 1(3): 28-32.
- Larson C., Gómez C., Sánchez M. y Ríos D. (2006). Inducción de caulogénesis indirecta en *Eucalyptus globulus*. Bosque. 27(3): 250-257.
- López-Gómez P., Iracheta-Donjuan L., Castellanos-Juárez M., Méndez-López I., Aguirre-Medina J., Gutiérrez-Díez A., Ojeda-Zacarías M. y Pérez-Pérez B. (2011). Variación en la tolerancia a desinfectantes de genotipos élite de *Coffea* spp. cultivados *in vitro*. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas. 2(5): 645-657.
- Martínez M. (1989). Plantas Medicinales de México. México, D.F.: Editorial Botas. 349-355 p.
- Martínez M., Mary K., Rico R. y Silva T. (2006) Cultivo *in vitro* de cuatro diferentes tejidos de *Casimiroa edulis* Llave et Lex. para identificación de alcaloides totales. Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas. 37(4):5-11.
- Mello T., Correia L. N.F., Hegedus C.E.N., Schmildt E.R., Ferreira A., Lopes J.C. y Alexandre R.S. (2023). Cell reprogramming via direct somatic embryogenesis in an Atlantic Forest species vulnerable to extinction: *Euterpe edulis* stem segments induced with picloram. Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC). 154: 1-10.
- Minchala-Patiño J., Poma-Angamarca R., Muñoz-Chamba L., Yaguana- Arévalo M., González-Zaruma, D., Eras-Guamán V.H., Rojas-Idrogo C. y Delgado-Paredes G.E. (2014). Propagación *in vitro* de *Prosopis limensis* Benth. in Hook. (Fabaceae - Mimosoideae). Revista de Ciencias Forestales. 22 (1-2): 88-99.

- Mroginski L., Sansberro P. y Flaschland E. (2010). Establecimiento de cultivos de tejidos vegetales. Capítulo 1. In: G. Levitus, V. Echenique, C. Rubinstein, E. Hopp y L. Mroginski (eds.). *Biotecnología y Mejoramiento Vegetal II*. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. 17-25 p.
- Murashige T. y Skoog F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiology Plant*. 15(3): 473-497.
- Nguyen Q., Bandupriya H.D., López-Villalobos A., Sisunandar S., Foale M. y Adkins S. (2015). Tissue culture and associated biotechnological interventions for the improvement of coconut (*Cocos nucifera* L.): a review. *Plant*. 242(5): 1059-1079.
- Ochoa-Villarreal M., Howat S., Hong S.M., Jang M.O., Jin Y.W., Lee E.K. y Loake G.J. (2016) Plant cell culture strategies for the production of natural products. *Biochemistry and Molecular Biology*. 49(3):149-158.
- Pan Y., Li L., Xiao S., Chen Z., Sarsaiya S., Zhang S. y Xu D. (2020). Callus growth kinetics and accumulation of secondary metabolites of *Bletilla striata* Rchb. f. using a callus suspension culture. *PLoS One*. 15(2): e0220084.
- Perales L., Silos H., Valera L.L., Perales C. y Flores S. (2016). Propagación *in vitro* de guayaba (*Psidium guajava* L.) a partir de segmentos nodales. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*. 7 (2):375-386.
- Rashmi R. y Trivedi M. (2014). Effect of various growth hormone concentration and combination on callus induction, nature of callus and callogenic response of *Nerium odorum*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 172(5):2562-2570.
- Rodríguez-Beraud M.M, Latsague-Vidal M.I., Chacón-Fuentes M.A. y Astorga-Brevis P.K. (2014). Inducción *in vitro* de callogénesis y organogénesis indirecta a partir de explantes de cotiledón, hipocótilo y hoja en *Ugni molinae*. *Bosque*. 35(1): 111-118.
- Sharma S., Sharma S. y Sharma V. (2021) Exploring In-vitro micropropagation and secondary metabolite production in *Desmodium gangeticum* (L.) D.C. *Plant Cell Biotechnology and Molecular Biology*. 22:231–240
- Suman S. (2017). Plant tissue culture: a promising tool of quality material production with special reference to micropropagation of banana. *Biochem. Cell. Arch*. 17(1): 1-26.
- Teixeira da Silva J.A., Shen M. y Yu X. (2012). Tissue culture and micropropagation of tree peony (*Paeonia suffruticosa* Andr.). *Journal of Crop Science and Biotechnology*. (15):159-168.
- Teixeira da Silva J., Gulyás A., Magyar-Tábori K., Wang M. y Wang Q. (2019). In vitro tissue culture of apple and other *Malus* species: recent advances and applications. *Planta*. 249(4):975-1006.

- Trabelsi E.S., Naija N., Elloumi Z., Belfeleh M., Msellem R., Ghezel S. y Bouzid. (2010). Somatic embryogenesis in cell suspension cultures of olive *Olea europaea* (L.) 'Chetoui'. *Acta Physiologiae Plantarum*. 33(2): 319-324.
- Vidal-López D.G., Schlie-Guzmán M.A., Gonzalez-Esquinca A.R. y Luna-Cazáres L. (2008). El zapote blanco (*Casimiroa edulis* Llave & Lex, Rutaceae): Un recurso medicinal de México. *Lacandonia*. 2(1):155-122.
- Zurita-Valencia W., Gómez-Cruz J. E., Atrián-Mendoza E., Hernández-García A., Granados-García M.E., García-Magaña J.J., Salgado-Garciglia R. y Sánchez-Vargas N.M. (2014). Establecimiento de un método eficiente de germinación *in vitro* y micropropagación del cirimo (*Tilia mexicana* Schlecht.) (Tiliaceae). *Polibotánica*. (38):129-144.

## 7.2. Capítulo II. Actividad antioxidante y contenido de compuestos fenólicos en hojas y tallos de una planta adulta y de cultivos *in vitro* (callos y plántulas) de zapote blanco (*Casimiroa edulis*).

### Resumen

El zapote blanco (*Casimiroa edulis*) es un fruto de consumo en México, pero es más utilizado como planta medicinal, principalmente sus hojas como infusión, controlando enfermedades degenerativas como la hipertensión, diabetes, estrés, entre otras, que cursan con procesos de estrés oxidante. El objetivo de este estudio fue evaluar la actividad antioxidante y el contenido de fenoles totales (ácidos fenólicos y flavonoides) en extractos metanólicos de callos y plántulas *in vitro*, así como de hojas y tallos de una planta adulta de zapote blanco. La actividad antioxidante se determinó mediante los métodos de DPPH<sup>•</sup>, ABTS<sup>•+</sup> y TAC, y la determinación de fenoles y flavonoides totales se utilizó el reactivo Folin-Ciocalteu y el método con cloruro de aluminio, respectivamente. En callos se mostró una mayor actividad antioxidante tanto con el método DPPH<sup>•</sup> como el de ABTS<sup>•+</sup> con porcentajes de 76.99% y de 89.73%, respectivamente. Estos valores fueron similares a los presentados por tallos de planta adulta (ABTS<sup>•+</sup>, 87.25%), seguido del de hojas (ABTS<sup>•+</sup>, 66.53%) y de plántulas *in vitro* (ABTS<sup>•+</sup>, 53.08%). Con el método de capacidad antioxidante total (TAC), los porcentajes más altos fueron del 97% en los extractos metanólicos de hojas y tallos de planta adulta, así como de plántulas cultivadas *in vitro* (96%), observando el valor más bajo en callos con un 68.73%. El mayor contenido de fenoles se obtuvo en el extracto de hoja de planta adulta (1.89 mg Eq. AG/g E.S.), con valores cercanos a lo mostrado en tallo (1.57 mg Eq. AG/g E.S.), en plántulas *in vitro* (1.52 mg Eq. AG/g E.S.) y en callo (1.51 mg Eq. AG/g E.S.). En cuanto al análisis de flavonoides totales, también el extracto de hojas presentó el mayor contenido (2.95 mg Eq. Q/g E.S.), un valor similar al obtenido en plántulas *in vitro* (2.95 mg Eq. Q/g E.S.) pero más alto que el de tallos (1.76 mg Eq. Q/g E.S.), siendo el contenido en callos, el más bajo (0.36 mg Eq. Q/g E.S.). Con estos resultados, se concluye que los cultivos de callos y plántulas *in vitro* producen tanto ácidos fenólicos como flavonoides y su contenido se relacionó con el nivel de diferenciación celular y con la actividad antioxidante. Los valores tanto de la actividad antioxidante como del contenido de fenoles, demuestran que los cultivos *in vitro* de zapote blanco, producen compuestos fenólicos similares a los producidos en hojas y tallos de planta adulta de zapote blanco, quedando como perspectiva el análisis de identificación y cuantificación de los compuestos mayoritarios.

**Palabras clave:** Actividad antioxidante, callos, fenoles y flavonoides totales, plántulas *in vitro*, zapote blanco.

### Introducción

Existe un gran interés por la búsqueda de compuestos que brinden beneficios a la salud, principalmente de origen vegetal, en específico aquellos componentes fitoquímicos con una variedad de estructuras químicas que presentan efectos fisiológicos en el organismo humano (Lustre, 2022). El uso de hojas, tallos y corteza de árboles medicinales se ha estudiado por su

efecto en la prevención y mejoría de enfermedades crónico-degenerativas, que cursan con estrés oxidante (López-Alarcona y De Nicola, 2103). Estudios en metabolitos secundarios, principalmente con fenoles, han demostrado sus propiedades antioxidantes, por lo que son considerados como preventivos y/o curativos de enfermedades relacionadas con el desbalance del sistema oxidativo como la obesidad, la diabetes y el cáncer, entre otras (Scarpa y Ninfali, 2015).

Las especies del género *Casimiroa*, de la familia de Rutaceae, son de gran importancia económica y cultural, y se cultivan principalmente por sus propiedades curativas, como el zapote blanco (*Casimiroa edulis*), que habita en el centro y norte de América, y por estas características fue llevado a otras partes del mundo donde ahora se cultiva (Mabberley, 2008; Vidal-López *et al.*, 2008, Ahlawat *et al.*, 2016, Segura *et al.*, 2018). En el código Florentino se ha confirmado su uso en la población mexicana como planta medicinal, remontando a la época precolombina, por su uso como somnífero (Zepeda y White, 2008). Diferentes partes de la planta (hojas, raíz, cáliz y frutos) se utilizan en la medicina tradicional (Jiménez, 2012; Argueta, 2014).

En estudios fitoquímicos de este árbol se ha identificado la presencia de fenoles, como los flavonoles y diversos ácidos fenólicos con propiedades antioxidantes (Bertin *et al.* 2014). Los frutos de zapote blanco son las más estudiadas, ya que tienen altos niveles de actividad antioxidante entre los frutos tropicales (404.75  $\mu\text{m}$  equivalente de Trolox/100 g) (Moo-Huchin *et al.*, 2014; Ribeiro da Silva *et al.*, 2014), debido a la presencia de captadores de radicales libres, como el ácido ascórbico, los carotenoides y los compuestos fenólicos D-quercitol, quercetina, miricitrina, ácido gálico y apigenina, entre otros (Satheesh, 2015). Hay varios factores bióticos y abióticos que hacen que la producción de metabolitos secundarios varíe en sus concentraciones o que simplemente no se produzcan como en el caso de *Physalis chenopodifolia*, que trabajaron con especies silvestres y domesticadas, siendo la especie silvestre la que presentó el mayor contenido de polifenoles y flavonoides en hojas (Barrientos *et al.* 2018). En *Diospyro digyna* y *Diospyro rekoi* se evaluó la variación de metabolitos secundarios en hojas durante dos años, demostrando un aumento en la época de primavera en comparación con las otras estaciones (Ramírez-Briones *et al.*, 2019).

Una alternativa para el estudio de la producción de compuestos fenólicos y determinar su relación con la actividad antioxidante, es la aplicación de las técnicas del cultivo de tejidos como la inducción de callos, el establecimiento de suspensiones celulares, el cultivo de brotes y de plántulas, en especial en plantas medicinales. Con esta técnica, se tiene la ventaja de producir compuestos bajo condiciones controladas puesto que las células pueden multiplicarse fácilmente y producir metabolitos secundarios específicos, aunque esto es dependiente del nivel de diferenciación celular, por lo que puede ocurrir variación en el perfil químico de los compuestos debido a las condiciones del cultivo *in vitro*, y a la diferenciación celular (Rivas, 2015).

Por ejemplo, en cultivos de raíces de *Ipomoea carnea* se determinó una mayor producción de fenoles, diversos flavonoides y cumarinas, que en plantas *in situ* (Rojas-Idrogo *et al.* 2014); o como en el cultivo *in vitro* de brotes de *Tanacetum parthenium*, en los que se obtuvo un mayor contenido de fenoles y flavonoides en la etapa de crecimiento exponencial. En tejidos indiferenciados, se ha obtenido taxol a partir de callos de *Taxus* sp. (Barrales-Cureño y Soto-Hernández, 2012) y las suspensiones celulares de *Piper cernuum* presentaron altos niveles de fenoles a los 6 días de su cultivo (Delgado-Paredes *et al.*, 2013).

Aunque son escasas las investigaciones sobre el cultivo *in vitro* y obtención de metabolitos secundarios de zapote blanco, Martínez *et al.* (2006) obtuvieron un sistema de callos de diferentes tejidos (hoja, raíz, cotiledones y tallo) y plántulas a partir de semilla, para la obtención de alcaloides, aunque no reportaron el contenido de compuestos en específico y su relación con alguna actividad biológica, así como la comparación con lo producido en tejidos vegetales de plantas silvestres.

En este capítulo, se determinó la actividad antioxidante y el contenido de compuestos fenólicos y flavonoides totales, en callos, plántulas *in vitro*, lo que se comparó con lo mostrado en hojas y tallos de ramas recolectadas en invierno, de una planta adulta de zapote blanco.

## **Materiales y métodos**

### **Material biológico**

Las hojas y tallos se obtuvieron de ramas de una planta adulta de zapote blanco (*C. edulis*) en un huerto urbano de la ciudad de Morelia, Michoacán, México (19°41'16.0"N 101°13'11.6"O), en la estación de invierno. Los callos y plántulas se obtuvieron a los 30 días de su cultivo *in vitro*, de acuerdo a las condiciones y medios de cultivo, descritos en materiales y métodos del capítulo I.

### **Obtención de los extractos**

Los extractos fueron obtenidos de hojas y tallos, así como de callos y plántulas *in vitro* de zapote blanco, utilizando 5 g de cada muestra (peso fresco), por el método de maceración en frío (10 °C por 5 días, adicionando 50 mL de metanol. Posteriormente, cada extracto fue filtrado en embudo con papel filtro Whatman No. 1 y se llevó a sequedad al vacío en un rotavapor marca Büchi R-124 a 45 °C, para posteriormente determinar el peso seco de cada uno y resuspender con metanol a una concentración de 1 mgmL<sup>-1</sup>.

### **Determinación de fenoles totales**

El contenido de fenoles totales se determinó de acuerdo con la reacción que presentaron los compuestos fenólicos con el reactivo Folin-Ciocalteu (Rodríguez-Valdovinos *et al.*, 2021) modificado de Singleton *et al.* 1999, se tomaron 50 µL de la muestra preparada, se adicionaron 75 µL de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> de concentración del 20% (p/v), 500 µL de agua destilada y 25 µL del reactivo Folin-Ciocalteu (1N). La mezcla de reacción se dejó dos horas en reposo en obscuridad en condiciones controladas (23 °C y 65% humedad), para finalmente obtener la absorbancia a 760 nm en un espectrofotómetro (VE-5100UV) ultravioleta-visible (UV/VIS). Para la curva de referencia, se utilizó ácido gálico, en un rango de concentraciones de 0.05 mL<sup>-1</sup> a 0.5 mgL<sup>-1</sup>, el contenido de ácidos fenólicos totales fue expresado en mg equivalentes de ácido gálico por gramo de extracto seco (mg Eq. AG/g E.S.).

## Determinación de flavonoides totales

Los flavonoides totales fueron cuantificados de acuerdo al método de Mahboubi *et al.* (2013), que consistió en lo siguiente: se tomaron 100  $\mu\text{L}$  de cada muestra o extracto, se adicionaron 300  $\mu\text{L}$  de etanol absoluto, 40  $\mu\text{L}$  de cloruro de aluminio ( $\text{AlCl}_3$ , 10% p/V), 40  $\mu\text{L}$  de acetato de potasio ( $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{K}$ , 1M) y 560  $\mu\text{L}$  de agua destilada. La mezcla de reacción se dejó 30 min en reposo en obscuridad en condiciones controladas (23 °C y 65% humedad) y se obtuvieron las absorbancias a 415 nm en un espectrofotómetro (VE-5100UV) de ultravioleta-visible (UV/VIS). Para la curva de referencia, se utilizó quercetina, en un rango de concentración de 0.01  $\text{mgL}^{-1}$  a 0.5  $\text{mgL}^{-1}$ , el contenido de flavonoides totales fue expresado en mg de quercetina/g extracto seco (mg Eq. Q/g E.S.).

## Actividad antioxidante por DPPH<sup>•</sup>

La medición de la capacidad de reducción del radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH<sup>•</sup>) se llevó a cabo de acuerdo al método reportado por Rodríguez-Valdovinos *et al.* (2021) con modificaciones de Barriada-Bernal *et al.* (2014). Se pesaron 9.8 mg de DPPH<sup>•</sup> y se disolvió en 100 mL de etanol al 96%. Posteriormente, se colocaron 450  $\mu\text{L}$  de DPPH<sup>•</sup> del reactivo previamente preparado y se mezcló con 50  $\mu\text{L}$  de cada uno de los extractos en una concentración de 1 mg/mL. Se incubaron en obscuridad durante 20 min a temperatura ambiente, para posteriormente determinar las absorbancias a 523 nm, usando un espectrofotómetro (VE-5100UV) ultravioleta-visible (UV/VIS). La capacidad de reducción de radicales libres se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Capacidad reductora de radicales (\%)} = (\text{Ablanco} - \text{Amuestra}) / \text{Ablanco} * 100$$

Donde Amuestra es la absorbancia de DPPH<sup>•</sup> mezclado con el extracto metanólico y Ablanco es la absorbancia de DPPH<sup>•</sup>, en la que la muestra ha sido reemplazada con metanol. Todas las mediciones se realizaron por triplicado y se informaron como el valor promedio. Se utilizó ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico (Trolox), butilhidroxitolueno (BHT) y ácido ascórbico como controles positivos.

### **Actividad antioxidante por ABTS<sup>•+</sup>**

La capacidad reductora de cada uno de los extractos metanólicos de zapote blanco se analizó con el método de ácido 2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico (ABTS<sup>•+</sup>) de acuerdo con el protocolo de Rodríguez-Valdovinos *et al.* (2021), modificado de Lee *et al.* (2015). La solución de radicales ABTS<sup>•+</sup> se preparó, mezclando 7.4 mmolL<sup>-1</sup> de ABTS<sup>•+</sup> y 2.6 mmolL<sup>-1</sup> de persulfato de potasio. Posteriormente se mezclaron 50 µL de muestra con 450 µL de solución de radicales ABTS<sup>•+</sup> y se determinaron las absorbancias de las mezclas resultantes después de 5 min en obscuridad a 734 nm en un espectrofotómetro (VE-5100UV, UV/VIS). La capacidad de reducción de radicales libres se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Reducción de radical (\%)} = (\text{Amuestra} - \text{Ablanco}) / \text{Ablanco} * 100$$

Donde Amuestra es la absorbancia del ABTS<sup>•+</sup> mezclado con la muestra, Ablanco es la absorbancia de la muestra mezclada con metanol. Todas las mediciones se realizaron por triplicado y se informaron como el valor promedio. Se utilizó ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico (Trolox), butilhidroxitolueno (BHT) y ácido ascórbico como controles positivos.

### **Actividad antioxidante total por método de fosfomolibdeno**

La capacidad antioxidante total (TAC) de los extractos metanólicos, se evaluó de acuerdo al método descrito por Prieto *et al.* (1999). Se combinó una alícuota de 50 µL de solución de muestra con 450 µL de solución reactiva (ácido sulfúrico concentrado, fosfato de sodio 28 mM y molibdato de amonio 4 mM). Para el blanco, se utilizaron 100 µL de metanol en lugar de la muestra. Los tubos se incubaron en un baño de agua hirviendo a 95°C durante 90 min. Después de mantener las muestras a temperatura ambiente, se determinaron las absorbancias de la solución acuosa de cada muestra a 695 nm en el espectrofotómetro (VE-5100UV, UV/VIS). La actividad antioxidante total se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$\text{TAC (\%)} = (\text{Amuestra} - \text{Ablanco}) / \text{Amuestra} * 100$$

Donde Amuestra es la absorbancia de la muestra mezclada con la solución reactiva, Ablanco es la absorbancia de la solución reactiva mezclada con metanol. Todas las mediciones se realizaron por triplicado y se informaron como el valor promedio. Se utilizó ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico (Trolox), butilhidroxitolueno (BHT) y ácido ascórbico como controles positivos.

### **Análisis estadístico**

Los resultados se expresan como la media  $\pm$  desviación estándar ( $n=3$ ) y se procesaron mediante un análisis de varianza de una vía; las medias se compararon con la prueba de Tukey con un nivel de significación de  $p \leq 0.05$ .

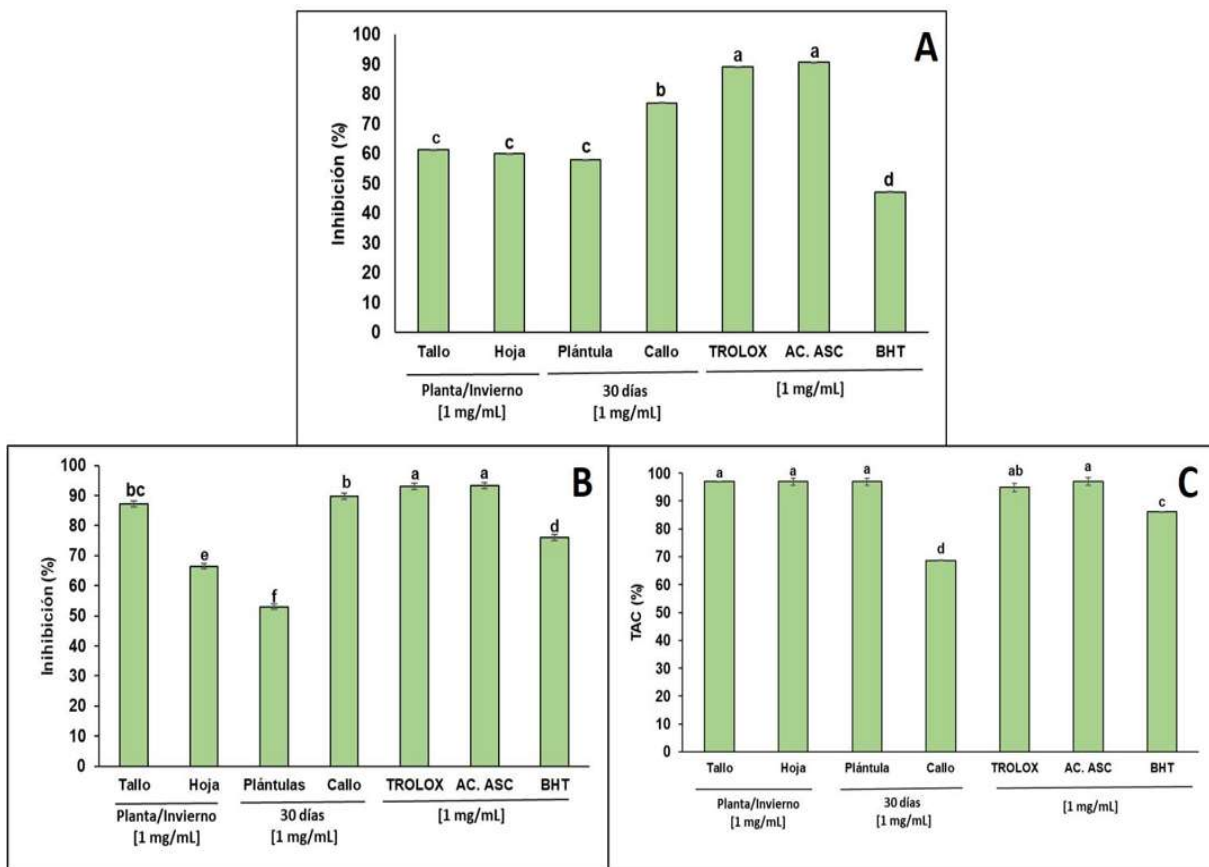
### **Resultados**

#### **Actividad antioxidante**

El porcentaje de captación de radicales libres entre los diferentes extractos fue dependiente de cada muestra y del método utilizado (Figura 11). Los extractos de callos mostraron el porcentaje más altos tanto con el método DPPH $^{\bullet}$  como el de ABTS $^{+\bullet}$ , con valores de 76.99% y de 89.73%, respectivamente (Figura 11A, 11B), valores mayores al presentado por 1 mgmL $^{-1}$  de BHT y ligeramente menor al de Trolox y ácido ascórbico. Los extractos de hoja y tallo de planta adulta, y de plántula *in vitro* presentaron porcentajes entre 57.99% y 61.35% con DPPH $^{\bullet}$ , sin diferencias significativas entre ellos, más bajos que lo observado por Trolox (89.16%) y ácido ascórbico (90.53%), pero mayores al de BHT (47.09%) (Figura 11A).

El extracto metanólico de callos (89.73%) no mostró diferencia significativa con el valor mostrado por el extracto de tallos (87.25%) obtenidos por el métodos de ABTS $^{+\bullet}$ , mayores a lo obtenido en hojas (66.53%) y plántulas *in vitro* (53.08%) y al mostrado por el BHT (76.1%). Los valores obtenidos por Trolox y ácido ascórbico fueron 93.05% y 93.19%, respectivamente (Figura 11B).

A diferencia de los resultados de actividad antioxidante con los métodos anteriores, con el método TAC, los extractos de hoja y tallo de planta adulta, y de plántulas *in vitro* de zapote blanco, mostraron porcentajes de actividad cercanos al 100% (96.95%, 96.93% y 95.95%, respectivamente), sin diferencia significativa con los presentados por Trolox y el ácido ascórbico. Con TAC, el porcentaje de actividad antioxidante fue menor en callos, con 68.73%, incluso más bajo que el mostrado por el BHT (86.08%) (Figura 11C).



**Figura 11.** Porcentaje de actividad antioxidante por DPPH<sup>•</sup> (A), ABTS<sup>•+</sup> (B) y TAC (C), de los extractos metanólicos de hojas y tallos de una planta adulta, plántulas y callos *in vitro* de zapote blanco (*C. edulis*), y de los controles positivos Trolox, ácido ascórbico (AC. ASC) y butilhidroxitolueno (BHT). Letras distintas indican que existe diferencia significativa ( $p \leq 0.05$ ,  $n=3$ , prueba de Tukey).

Con estos resultados se demuestra que los extractos metanólicos tanto de los cultivos *in vitro* como de hojas y tallos de plantas adultas de zapote blanco, contienen compuestos con actividad antioxidante, y aunque hay diferencias significativas entre algunos de ellos, los valores mayores

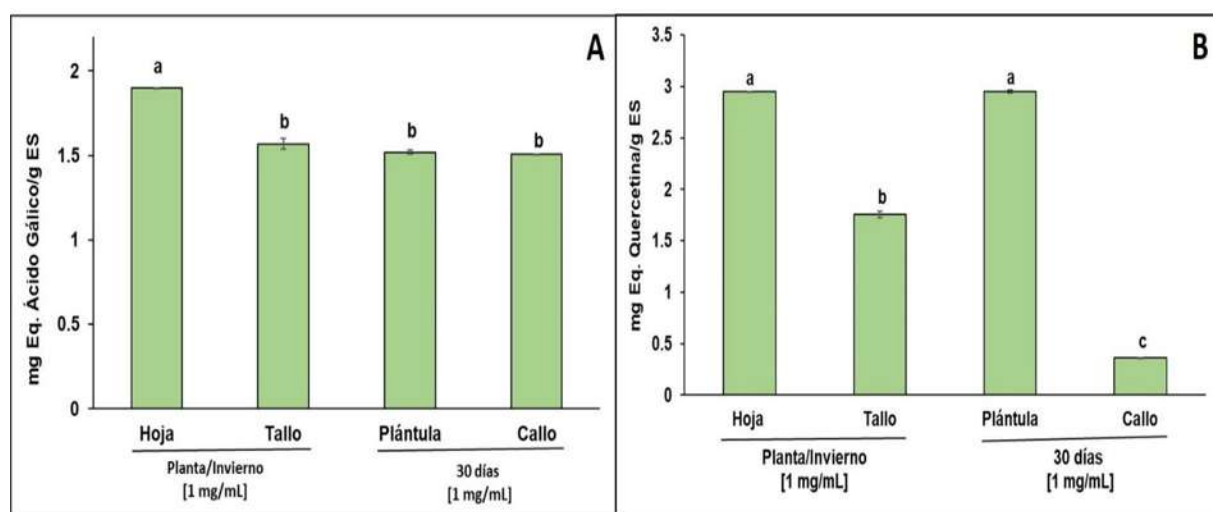
del 50% de la actividad antioxidante sugieren una óptima actividad biológica, como se ha reportado para diversos extractos de plantas, pero que depende de la parte de la planta, del tipo de extracto, de la concentración y del método utilizado (Castañeda *et al.*, 2008). Los callos presentaron una alta actividad antioxidante determinada con DPPH<sup>•</sup> y ABTS<sup>•+</sup>, pero no, así como el método TAC, sugiriendo que los extractos de callos no actúan a nivel de la oxidación de moléculas por los metales de transición, teniendo una actividad captadora de radicales libre DPPH<sup>•</sup> y de eliminación del radical ABTS<sup>•+</sup>. Este resultado se compara con lo mostrado por el extracto metanólico de tallos de zapote blanco. Sin embargo, el obtener valores altos de actividad antioxidante con el método de TAC en hojas, tallos y plántulas *in vitro*, indica que una estimación eficaz y precisa de la capacidad reductora o antioxidante de la biomoléculas presentes en los extractos.

Estos valores de actividad antioxidante son comparables con diversos tipos de extractos como el del hidrodestilado de *Satureja macrostema* con 53.1% de actividad con DPPH<sup>•</sup> con 1 mgmL<sup>-1</sup>, que mostró un 92.12% con ABTS<sup>•+</sup> y un 98% con TAC, actividad antioxidante mayor que el mostrado por BHT (Torres-Martínez *et al.*, 2018). Así mismo, con 1 mgmL<sup>-1</sup> de los extractos de *Flourensia cernua*, *Turnera diffusa* y *Eucalyptus camaldulensis* se obtuvo una alta actividad antioxidante con DPPH<sup>•</sup>, del 80% (Wong-Paz *et al.*, 2014).

### **Determinación de fenoles y flavonoides totales**

Con la determinación tanto de fenoles como de flavonoides totales en los diferente extractos de tallos y hojas de planta adulta, y de callos y plántulas *in vitro* de zapote blanco, se observó un mayor contenido en el extracto de hoja de planta adulta, con 1.89 mg Eq. AG/g E.S., con diferencia significativa sobre los demás extractos, en los que se cuantificó 1.57 mg Eq. AG/g E.S. de tallo, 1.52 mg Eq. AG/g E.S. de plántula *in vitro* y 1.51 mg Eq. AG/g E.S. de callo, sin diferencias significativas entre éstos (Figura 12A). Sin embargo, el contenido de flavonoides totales mostró variación entre los diferentes extractos, con el mayor valor en el extracto de hojas 2.95 mg Eq. Q/g E.S.), sin diferencia significativa con el mostrado por el plántulas *in vitro* (2.95 mg Eq. Q/g E.S.), pero con diferencia significativa con los extractos de tallo (1.76 mg Eq. Q/g E.S.) y callos (0.36 mg Eq. Q/g E.S.) (Figura 12B).

La cuantificación de fenoles y flavonoides en cultivos indiferenciados (callos y suspensiones celulares) suele ser más bajo que en los tejidos diferenciados, lo que explica la asociación de la diferenciación celular con un mayor rendimiento de metabolitos secundarios (Queiroz Braga *et al.*, 2015).



**Figura 12.** Contenido de fenoles (A) y flavonoide totales (B) de hojas y tallos de una planta adulta, y de plántulas y callos *in vitro* de zapote blanco (*C. edulis*) expresados en miligramos equivalente de ácido gálico (mg Eq. AG/g E.S.) y quercetina (mg Eq. Q/g E.S.), respectivamente. Letras distintas indican que existe diferencia significativa ( $p \leq 0.05$ ,  $n=3$ , prueba de Tukey).

En extractos metanólicos de hojas de plantas de invernadero, hojas obtenidas de plántulas *in vitro* y de callos de *Fragaria vesca*, se obtuvo un mayor contenido de ácidos fenólicos en el extracto de hojas de plantas de invernadero, hasta cinco veces más que los cultivos *in vitro* (Birinci y Ucar, 2014). Así mismo, en extractos de hojas de *Ilex paraguariensis* se demostró un mayor contenido de ácidos fenólicos (157.35 mg Eq. AG/g E.S.) que en el de callos (43.3 mg Eq. AG/g E.S.) (Grunenvaldt *et al.*, 2022). Lo anterior también se reflejó en los resultados del contenido de fenoles totales entre los extractos de zapote blanco, ya que los de planta adulta, en específico los de hoja, fue mayor que el de los cultivos *in vitro* de zapote blanco. Algo similar fue determinado con el contenido de flavonoides, obteniendo el contenido más bajo en los extractos de callo, demostrando con esto, que el nivel de diferenciación celular afectó

drásticamente la producción de flavonoides y ligeramente el de fenoles totales (Figura 12). Así mismo, se presentó un mayor contenido tanto de fenoles como de flavonoides totales en hojas que en tallos de planta adulta de zapote blanco, lo que ha sido reportado en diversas especies de plantas como en *Labisia pumila* y *Litsea glaucescens* (laurel) (Karimi *et al.*, 2013; Tapia-Torres *et al.*, 2014).

Sin embargo, hay reportes que indican que algunos cultivos *in vitro*, como callos, brotes o plántulas, presentan un mayor contenido de fenoles que partes de plantas cultivadas *ex vitro*. Los extractos de callos de *Acalypha californica* mostraron un alto contenido de ácidos fenólicos totales (2.6 mg Eq. AG/g E.S.) y también de flavonoides totales (1.56 mg Eq. Q/g E.S.) en comparación a la planta fuente (Hechavarría-Pérez *et al.*, 2023); también en callos de *Ageratina pichichensis* se demostró que estos produjeron tanto terpenos totales como flavonoides totales, en concentraciones similares a lo producido en las plantas silvestres, recolectados a los 20 días de su cultivo, correspondiente a la fase estacionaria (Motolinia-Alcántara *et al.*, 2023); en brotes de *Dallota nigra*, la producción de ácidos fenólicos y de flavonoides fue mayor que el determinado en brotes obtenidos por germinación en invernadero (Makowczynska *et al.*, 2015).

Con los resultados de esta investigación se determinó que los callos y las plántulas *in vitro* de zapote blanco producen una cantidad de ácidos fenólicos igual al producido en tallos de la planta adulta y con valores muy cercanos a lo que se obtuvo en las hojas de la misma planta. En cuanto al contenido de flavonoides, los callos presentaron el más bajo, indicativo de que el nivel de diferenciación celular afecta la síntesis o acumulación de flavonoides, ya que las plántulas (cultivo diferenciado) mostró una cantidad igual al producido en hojas de la planta adulta y mayor que el de tallos.

Los estudios de actividad antioxidante realizados en el zapote blanco, principalmente se enfocan en los frutos y las semillas, reportando que tienen un mayor contenido de ácidos fenólicos lo que se relaciona con la mayor actividad antioxidante, si se compara con las hojas y tallo, debido a que estos frutos son ricos en vitamina C, ácidos oleicos y ácidos fenólicos (Moo-Huchin *et al.* 2014; Elkady *et al.* 2017). En el extracto metanólico de semillas de zapote blanco, se observó la presencia de ácidos fenólicos (55.89 mg Eq. AG/g E.S.), de flavonoides (1.87 mg Eq. Q./g

E.S.), lo que se relacionó con la actividad antioxidante. Lo anterior es muy claro de observarse con el contenido tanto de fenoles como de flavonoides presentado por los callos de zapote blanco, por los métodos de DPPH<sup>•</sup> y ABTS<sup>•+</sup>, a los cuales se les infiere como los responsables de la actividad antioxidante.

## Conclusiones

Se determinó la actividad antioxidante en todos los extractos evaluados de zapote blanco, que fue dependiente de las partes de la planta y de los cultivos *in vitro*, obteniendo los porcentajes más altos en callos (DPPH<sup>•</sup> y ABTS<sup>•+</sup>) y sin diferencias entre los valores obtenidos por el método TAC.

El contenido de fenoles en todos los extractos fue similar en una rango de 1.5 y 1.89 mg Eq. AG/g E.S., con el valor más alto en hojas, y el de flavonoides totales fue igual en hojas y en plántulas *in vitro* (2.95 mg Eq. Q./g E.S.) pero con valores más bajos en tallos y callos. Esos resultados sugieren que no existe una relación estrecha entre la producción de fenoles totales con la diferenciación celular. Sin embargo, esta relación fue observada en el contenido de flavonoides totales, ya que los callos mostraron un contenido muy bajo, en relación a hoja, tallo y plántulas *in vitro*.

En todos los casos se obtuvieron porcentajes de actividades por arriba del 50%, independientemente de los extractos y de los métodos utilizados, por lo que se propone que estos resultados se relacionan con la actividad antioxidante obtenida por los tres métodos. Aunque, esta relación se observa más claramente con el contenido de fenoles totales, no así con el de flavonoides.

## Referencias

- Adel R., Gamal A., Al-Gendy A.A. y Hafez S.S. (2021). Phytoconstituents profile and UPLC-ESI-MS/MS Analysis of *Centaurea pumilio* L. callus culture following elicitation. *20(3): 435-449*.
- Ahlawat T.R., Patel N.L., Patel C.R. y Agnihotri R. (2016). White Sapote (*Casimiroa edulis* Llave and Lex). Underutilized Fruit Crops: Importance and Cultivation. In: Underutilized Fruit Crops: Importance and Cultivation (Eds. S.N. Ghosh, A. Singh, A. Thakur). Publisher: Narendra Publishing House. *1353-1367 p*.
- Argueta A. (2014). Plantas Medicinales de Uso Tradicional en la Ciudad de México. *210 p*.
- Awaad A.S., El-Sayed N.H., Maitland D.J. y Mabry T.J. (2006). Phenolic antioxidants from *Casimiroa edulis*. Leaves. *Pharmaceutical biology. 44(4): 258-262*.
- Barrales-Cureño H.J. y Soto-Hernández R.M. (2012). Taxoides: metabolitos secundarios del árbol del tejo (*Taxus* spp.). *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente. 18 (2): 207-218*.
- Barriada-Bernal L.G., Almaraz-Abarca N., Delgado-Alvarado E.A., Gallardo-Velázquez T., Ávila-Reyes J.A., Torres-Morán M.I., González-Elizondo M.D.S. y Herrera-Arrieta Y. (2014). Flavonoid composition and antioxidant capacity of the edible flowers of *Agave durangensis* (Agavaceae). *CYTA Jordan Food. 12: 105–114*.
- Barrientos Ramírez L., Arvizu M.L., Salcedo Pérez E., Villanueva Rodríguez S., Vargas Radillo J.J., Barradas-Reyes B.A. y Ruiz-López M.A. (2018). Contenido de polifenoles y capacidad antioxidante de *Physalis chenopodifolia* Lam. silvestre y cultivo. *Revista Mexicana de Ciencias Forestales. 10 (51). ME:182-200*.
- Bertin R., Chen Z., Martínez-Vázquez M., García-Argaéz A. y Frolidi G. (2014). Vasodilation and radical-scavenging activity of imperatorin and selected coumarinic and flavonoid compounds from genus *Casimiroa*. *Phytomedicine. 21(5): 586–594*.
- Birinci-Yildirim A. y Ucar-Turker A. (2014). Effects of regeneration enhancers on micropropagation of *Fragaria vesca* L. and phenolic content comparison of field-grown and *in vitro*-grown plant materials by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry (LC–ESI-MS/MS). *Scientia Horticulturae. 169: 169-178*.
- Castañeda C.B., Ramos Ll. E. e Ibáñez V.L. (2008). Evaluación de la capacidad antioxidante de siete plantas medicinales peruanas. *Horizonte Médico. 1(8): 56-72*.
- de Queiroz Braga K., Coimbra M. C., Hortência A. y Castro F. (2015). In vitro germination, callus induction and phenolic compounds contents from *Pyrostegia venusta* (KerGawl.) Miers. *Acta Scientiarum. Biological Sciences Maringá. 37(2): 151-158*.

- Delgado-Paredes G.E., Kato M. y Rojas-Idrogo J. (2013). Consuelo Suspensiones celulares y producción de metabolitos secundarios en cultivos *in vitro* de *Piper* sp. Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas. 12(3): 269-282
- Ehsan K., Hawa J., Ali G. y Mohd Hafiz J. (2013). Light intensity effects on production and antioxidant activity of flavonoids and phenolic compounds in leaves, stems and roots of three varieties of *Labisia pumila* Benth. Australian Journal of Crop Science. (7): 1016-1023.
- Elkady W.M., Ibrahim E.A., Gonaïd M.H. y El Baz F.K. (2017). Chemical profile and biological activity of *Casimiroa Edulis* non-edible fruits parts. Advanced Pharmaceutical Bulletin. 7(4): 655.
- García Hernández D.G. (2016). Actividad biológica, separación, aislamiento e identificación de metabolitos activos de plantas utilizadas en la medicina tradicional mexicana (Doctoral dissertation, Universidad Autónoma de Nuevo León). 92 p.
- Grunennvaldt R.L., Goldbach J.D., de Cássia Tomasi J., Hansel F.A., Brasileiro B.P., Brooks P. y Deschamps C. (2022). *Ilex paraguariensis*: el efecto de los genotipos y la fase de crecimiento sobre la biomasa, metabolismo secundario y la actividad antioxidante de los callos cultivados *in vitro*. Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas. 21(4): 548-560.
- Hechavarría-Pérez L., Rascón-Valenzuela L.A., Tejeda-Mansir A., Pérez-Burgos J.A., y Ayala-Astorga G.I. (2023). Composición química, actividad antioxidante, antiinflamatoria y antiproliferativa del extracto de callos derivado de *Acalypha californica* Benth. Polibotánica. (56): 203-223.
- Jiménez A. (2012). Herbolaria mexicana 2a ed. Madrid: Mundi-Prensa. 458 p.
- Jiménez-Terry J. y Agramonte D. (2013). Cultivo *in vitro* y macropropagación como vía de sostenibilidad de la propagación de especies forestales. Biotecnología. 13(1): 3-21.
- Karimi E., Jaafar H.Z. y Ahmad S. (2013). Antifungal, anti-inflammatory and cytotoxicity activities of three varieties of *Labisia pumila* benth: from microwave obtained extracts. BMC Complementary and Alternative Medicine. 1: 1-10.
- Lee K.J., Oh Y.C., Cho W.K. y Ma J.Y. (2015) Antioxidant and anti-inflammatory activity determination of one hundred kinds of pure chemical compounds using offline and online screening HPLC assay. Evid. Based Complement. Evid Based Complement Alternat Med. (1): 1-13.
- López-Alarcona E. y De Nicola A. (2103). Evaluating the antioxidant capacity of natural products: a review on chemical and cellular-based assays. Analytica chimica acta. 763: 1-10.
- Lustre Sánchez H. (2022). Los superpoderes de las plantas: los metabolitos secundarios en su adaptación y defensa. Revista Digital Universitaria. 23(2).

- Mabberley D. (2008). Mabberley's Plant Book 3rd ed. London: Cambridge University Press. 157 p.
- Magos G.A., Vidrio H., Reynolds W.F. y Enríquez R.G. (1998). Pharmacology of *Casimiroa edulis* IV. Hypotensive effects of compounds isolated from methanolic extracts in rats and guinea pigs. *Ethnopharmacol.* 64 (1): 35-44.
- Mahboubi M., Kazempour N. y Boland Nazar A.R. (2013). Total phenolic, total flavonoids, antioxidant and antimicrobial activities of *Scrophularia Striata* Boiss extracts. *Jundishapur journal of natural pharmaceutical products.* 8(1): 15-19.
- Makowczynska J., Grzegorzczak K. I. y Wysokinska H. (2015). Antioxidant activity of tissue culture-raised *Ballota nigra* L. plants grown *ex vitro*. *Acta poloniae pharmaceutica.* 72(4): 769-775.
- Martínez M., Mary K., Rico R. y Silva T. (2006) Cultivo *in vitro* de cuatro diferentes tejidos de *Casimiroa edulis* Llave et Lex. para identificación de alcaloides totales. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas.* 37(4): 5-11.
- Moo-Huchin V.M., Estrada-Mota I., Estrada-Leon R., Cuevas-Glory L., Ortiz-Vazquez E., Vargas Y., Vargas-Mde L., Betancur-Ancona D. y Sauri-Duch E. (2014). Determination of some physicochemical characteristics, bioactive compounds and antioxidant activity of tropical fruits from Yucatan, Mexico. *Food Chemistry.* 152: 508–515.
- Motolinia-Alcántara E.A., Franco-Vásquez A.M., Nieto-Camacho A., Arreguín-Espinosa R., Rodríguez-Monroy M., Cruz-Sosa F. y Román-Guerrero A. (2023). Phenolic compounds from wild plant and in vitro cultures of *Ageratina pichichensis* and evaluation of their antioxidant activity. *Plants.* 12(5): 1107.
- Prieto P., Pineda M. y Aguilar M. (1999). Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: Specific application to the determination of Vitamin E. *Analytical Biochemistry.* 269: 337–41.
- Ramírez-Briones E., Rodríguez-Macías R., Salcedo-Pérez E., Ramírez-Chávez E., Molina-Torres J., Tiessen A. y Zañudo-Hernández J. (2019). Seasonal changes in the metabolic profiles and biological activity in leaves of *Diospyros digyna* and *D. reko* "Zapote" trees. *Plants.* 8(11): 449.
- Ribeiro da Silva L.M., Teixeira de Figueiredo E.A., Ricardo N.M.P.S., Vieira I.G.P., Wilane de Figueiredo R., Brasil I. M. y Gomes C.L. (2014). Quantification of bioactive compounds in pulps and byproducts of tropical fruits from Brazil. *Food Chemistry.* 143: 398- 404.
- Rivas M.C. (2015). Las plantas como bio-fábrica. En: S. Sharry, M. Adema y W. Abedini (Eds.) *Plantas de probeta Manual para la propagación de plantas por cultivo de tejidos in vitro.* Edulp. 145 p.

- Rodríguez-Valdovinos K.Y., Salgado-Garciglia R., Vázquez-Sánchez M., Álvarez-Bernal D., Oregel-Zamudio E., Ceja-Torres L.F. y Medina-Medrano J.R. (2021). Quantitative analysis of rutin by HPTLC and *in vitro* antioxidant and antibacterial activities of phenolic-rich extracts from *Verbesina sphaerocephala*. *Plants*. 10(3): 1-14.
- Rojas-Idrogo C., Kato M.J., Delgado-Paredes G.E., Segal-Floh E.I. y Handro W. (2014). Producción de metabolitos secundarios en cultivo de raíces *in vitro* y suspensiones celulares de *Ipomoea carnea* spp. *carnea* Jacq. *Anales de Biología*. 36: 107-120.
- Santamaría-Gómez J.M., Piloni-Martini J., Quintero-Lira A., Bernardino-Nicator A. y Güemes-Vera N. (2018). Compuestos fenólicos y actividad antioxidante antes y después del proceso de extrusión. *Investigación y Desarrollo en Ciencia y Tecnología de Alimentos*. 3: 406-410.
- Satheesh N. (2015). Review on Distribution, Nutritional and Medicinal Values of *Casimiroa edulis* Llave- an Underutilized Fruit in Ethiopia. *American-Eurasian Journal Agriculture and Environ Sciencie*. 15 (8): 1574-1583.
- Scarpa E.S. y Ninfali P. (2015). Phytochemicals as innovative therapeutic tools against cancer stem cells. *International Journal of Molecular Science*. 16 (7): 15727-15742.
- Schwarz K., Bertelsen G., Nissen L., Gardner P., Heinonem M., Hopia A., Huynh-Ba T., Lambelet P., McPhail D., Skibsted L. y Tijburg L. (2001). Investigation of plants extracts for the protection of processed foods against lipid oxidation. Comparison of antioxidant assays based on radical scavenging, lipid oxidation and analysis of the principal antioxidant compounds. *European Food Research Technology*. 212(3):319-328.
- Segura S., Fresnedo J., Mathuriau C., López J., Andrés J. y Muratalla A. (2018). The edible fruit species in Mexico. *Genetic Resources and Crop Evolution*. 65: 1767–1793.
- Singleton V.L., Orthofer R. y Lamuela-Raventós R.M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods Enzymol*. 299: 152–178.
- Tapia-Torres N.A., Pérez-Olvera C.P., Román-Guerrero A., Quintanar-Isaías A., García-Márquez E. y Cruz-Sosa F. (2014). Histoquímica, contenido de fenoles totales y actividad antioxidante de hoja y de madera de *Litsea glaucescens* Kunth (Lauraceae). *Madera y Bosques*. 20(3): 125-137.
- Torres-Martínez R., García-Rodríguez Y.M., Ríos-Chávez P., Saavedra-Molina A., López-Meza J.E., Ochoa-Zarzosa A. y Garciglia R.S. (2018). Antioxidant activity of the essential oil and its major terpenes of *Satureja macrostema* (Moc. and Sessé ex Benth.) Briq. *Pharmacognosy magazine*. 13(Suppl 4): S875-S880.

- Verardo G., Gorassini A., Ricci D. y Fraternali D. (2016). High triterpenic acids production in callus cultures from fruit pulp of two apple varieties. *Phytochemical Analysis*. 28(1): 5-15.
- Vidal-López D.G., Schlie-Guzmán M.A., Gonzalez-Esquinca A.R. y Luna-Cazáres L. (2008). El zapote blanco (*Casimiroa edulis* Llave & Lex., Rutaceae): Un recurso medicinal de México. *Lacandonia*. 2(1): 155-122.
- Wong-Paz J.E., Contreras-Esquivel J.C., Muñoz-Marquez D., Belmares R., Rodriguez R., Flores P. y Aguilar C.N (2014). Microwave-assisted extraction of phenolic antioxidants from semiarid plants. *American Journal of Agricultural and Biological Science*. 9(3): 299-310.
- Yuniarti R., Nadia S., Alamanda A., Zubir M., Syahputra R. A., y Nizam M. (2020). Characterization, phytochemical screenings and antioxidant activity test of kratom leaf ethanol extract (*Mitragyna speciosa* Korth) using DPPH method. *Journal of Physics: Conference Series*. (1): 1462.
- Zepeda G.C. y White O.L. (2008) Herbolaria y pintura mural: plantas medicinales en los muros del convento del divino Salvador de Malinalco, Estado de México. *Polibotánica*. 25: 173-199.
- Zhang Y., Cai P., Cheng G. y Zhang Y. (2022). A brief review of phenolic compounds identified from plants: Their extraction, analysis, and biological activity. In: *Natural Product Communications*. 17(1).

## 8. DISCUSIÓN GENERAL

### **Efecto de la rutina de asepsia y estación de recolecta para el establecimiento *in vitro* de explantes de *C. edulis***

Debido a la alta contaminación fúngica en los explantes de ramas recolectadas en las estaciones de verano y otoño, así como por la oxidación de éstos, los porcentajes de supervivencia fueron los más bajos, con un 1 a 6% en los de verano y con un 2.4 a 44.5% en los de otoño. En éstos, el uso de la rutina R5 favoreció la supervivencia más alta de los explantes (Figura 4). Con esta rutina (R5), los explantes de primavera e invierno, mostraron los más altos porcentajes de supervivencia con 84 y 84.7%, respectivamente, sin diferencias significativas entre ambos valores. En los explantes de primavera, la supervivencia fue igual independientemente de las rutinas R1 a R4, con porcentajes de 50.72 a 59.5%. Sin embargo, en las de invierno, con la rutina R4 se obtuvo un porcentaje de supervivencia de 34.2% (Figura 4C).

Los porcentajes de oxidación fueron menores al 30% en todos los explantes cultivados, aunque en los recolectados en otoño se presentaron los valores más altos con las rutinas R2, R, R4 y R5, con porcentajes sin diferencias significativas entre los valores obtenidos en explantes de primavera e invierno, con las rutinas R2 y R4. En los explantes de primavera e invierno, los porcentajes de oxidación fueron más bajos con el uso de la rutina R5, con un 6% y 5%, respectivamente, sin diferencias significativas entre estos valores (Figura 4B). Los explantes de ramas recolectadas en verano mostraron los porcentajes bajos de oxidación (3.2-4.5%) debido a que un alto porcentaje de los explantes presentaron contaminación fúngica.

En los explantes de ramas de zapote blanco recolectadas en primavera e invierno, la disminución de la contaminación fúngica y los altos porcentajes de supervivencia se relacionó con los mayores tiempos de exposición de las soluciones de asepsia, en las que se adicionó el fungicida en altas concentraciones ( $10 \text{ gL}^{-1}$ ).

El uso de hipoclorito de sodio en el cultivo de tejidos vegetales es el más empleado para el control de contaminación microbiana, en inmersiones con un porcentaje que va del 1 al 20% (Mroginski *et al.*, 2010). La oxidación, mayormente en el cultivo de tejidos es causada por la acción de la

enzima polifenol oxidasa que se libera o sintetiza cuando los tejidos sufren lesiones, principalmente en especies leñosas (Azofeifa, 2009). Debido a esto, los explantes se oxidan, tomando una tonalidad oscura o marrón en los tejidos y perjudicando su crecimiento en el cultivo *in vitro* (De Filippis, 2013). El carbón activado en el medio de cultivo ayudó en reducir los niveles de oxidación de los explantes de zapote blanco, como lo reportado en aguacate, donde combinaron el carbón activado y el ácido cítrico al medio de cultivo, lo cual permitió reducir hasta un 70% el proceso de oxidación (Cortés-Rodríguez *et al.*, 2011).

El éxito del establecimiento de segmentos nodales de ramas del árbol adulto de *C. edulis*, además de la óptima rutina de asepsia seleccionada, se debió a que en las estaciones de invierno y primavera, el árbol fuente de explantes no estuvo expuesto a una alta humedad relativa ambiental y a temperaturas altas, ya que el área donde éste está cultivado, la época de lluvias corresponden a las estaciones de verano e inicios del otoño, factores que afectan el establecimiento *in vitro* por la alta incidencia de contaminación microbiana, sobre todo de hongos (Romero *et al.*, 2021).

La adición de Tecto60 ( $10 \text{ gL}^{-1}$ ) tanto en la solución 1 como en la solución 3, con un mayor tiempo de exposición en la solución 3 (20 min), fue necesario para el control y eliminación de los hongos presentes en los tejidos, relacionado directamente con el éxito de supervivencia de los explantes, con lo que se logró el establecimiento *in vitro* de los explantes de zapote blanco, principalmente con la rutina R5.

Resultados similares de porcentajes de supervivencia con el control de contaminación microbiana y la reducción de oxidación de los explantes, han sido reportados para diversas especies de árboles (Ibarra-López *et al.*, 2016; Indacochea *et al.*, 2018; Teixeira da Silva *et al.*, 2019; Hernández-García *et al.*, 2021),

La estación de recolecta tiene un efecto importante en el establecimiento *in vitro* de árboles, no solo por la alteración en la concentración endógena de los reguladores de crecimiento, por lo cual la primavera es considerada como la mejor estación del año para la micropropagación de árboles tropicales (Pant y Husen, 2022). Son pocos los reportes que relacionan el efecto de la época de recolecta sobre la contaminación microbiana y oxidación de los explantes, Mudo *et al.* (2014)

demonstraron que los explantes de *Bambusa nutans* presentaron los mayores porcentajes de contaminación y oxidación, durante la recolecta en primavera y verano, aunque Kumar *et al.* (2019) obtuvieron un mayor éxito de establecimiento *in vitro* de segmentos nodales de *Bhagwa pomegranate* con la recolecta en primavera (abril), con los más bajos porcentajes de contaminación y oxidación. Lo anterior también fue reportado por Thakur y Kanwar (2008) con explantes de 'Wild Pear' *Pyrus pyrifolia*, los que mostraron los porcentajes más altos de contaminación en la época de lluvia, resultados que también fueron obtenidos durante el establecimiento *in vitro* de segmentos nodales de zapote blanco.

### **Efecto de auxinas y citocininas en la formación de callos, brotes y plántulas *in vitro* en explantes de *C. edulis***

Los avances en el conocimiento de la regulación sobre el crecimiento y desarrollo de las plantas, de las auxinas, las citocininas y la giberelinas, sobre todo en cultivos *in vitro*, han establecido los tipos, la combinación y las concentraciones de éstas, para regular la división, la elongación y la diferenciación celular, que depende del tipo y la edad del explante, así como de la especie vegetal bajo estudio. Otros factores que influyen en la respuesta morfogénica, está la concentración de nutrientes, horas de luz, temperatura, pH, humedad relativa, suministro de oxígeno, entre otros, por lo depende de la estandarización del protocolo o técnicas desde el establecimiento *in vitro* hasta la formación de callos, brotes y plántulas (Gaspar *et al.*, 1996; Villavicencio-Gutiérrez *et al.*, 2022).

La combinación de auxinas y citocininas es considerada lo más importante en la regulación de los procesos de indiferenciación y diferenciación de los tejidos vegetales, con frecuencia se utilizan BA y ANA o ácido indol-3-acético (AIA) para la formación y multiplicación de brotes, BA y Picloram o 2,4-D, para la formación de callos, y AIB para el enraizado de brotes y obtener la formación de plántulas (Dixon y Gonzales, 1994; Gaspar *et al.*, 1996; North *et al.*, 2012).

La inducción de callos con Picloram ha sido reportada en especies como palo azul (*Eysenhardtia polystachya*) con un 98% de formación callos con 1 mgL<sup>-1</sup> de picloram más 0.1 mgL<sup>-1</sup> de cinetina (Bernabé-Antonio *et al.*, 2017), así como en pipire (*Bactris gasipaes*) (Steinmacher *et al.*, 2007), y en palmito dulce (*Euterpe edulis*) (Mello *et al.*, 2023), en combinación con una citocinina o

solo. La callogénesis en segmentos de brote inicial de zapote blanco, se obtuvo con la adición de Picloram solo al medio de cultivo ( $2 \text{ mg/L}^{-1}$ ), efectivo para conseguir la indiferenciación celular y una óptima formación y crecimiento de callo (Figuras 6 y 7).

Para la formación y multiplicación de brotes en yemas, tanto apicales como axilares, se ha conseguido cuando se adiciona la combinación de BA y ANA al medio de cultivo, sobre todo en especies maderables o leñosas, como en *Toona ciliata* en la que se obtuvo una óptima multiplicación de brotes en hipocótilos con  $0.3 \text{ mgL}^{-1}$  y  $0.2 \text{ mgL}^{-1}$  de ANA (Li *et al.*, 2018), así como en *Dalbergia congestiflora* con 9 brotes/explante obtenidos en MS con  $1 \text{ mgL}^{-1}$  BA y  $0.1 \text{ mgL}^{-1}$  de ANA (Hernández-García *et al.*, 2021), y en *Acacia mangium* en la que se formaron brotes en explantes de nudos cotiledonares (Shahinozzaman *et al.*, 2012). El número de brotes en plantas leñosas, generalmente se reporta en un promedio de 5 brotes/explantes, por lo que obtenido en yemas apicales de *C. edulis* (6 brotes/explante en MS con  $0.5 \text{ mgL}^{-1}$  BA y  $0.1 \text{ mgL}^{-1}$  ANA, se considera como óptimo para la producción de brotes en este tipo de plantas.

En árboles, también la etapa de enraizamiento es una fase crítica y difícil (Hartmann *et al.*, 2002; Vielba *et al.*, 2020), en algunas especies la formación de raíces inicia sin la presencia de auxinas, mientras que en otras se requieren concentraciones altas, mayormente con el uso de AIB, aunque también se utiliza AIA y ANA, lo que depende de la especie vegetal (Cline, 2000; Syros *et al.*, 2004). Generalmente se usa un medio de cultivo a la mitad de los componentes como el MS ( $\text{MS } \frac{1}{2}$ ) con concentraciones de 0 a más de  $25 \text{ mgL}^{-1}$  de AIB (Srivastava *et al.*, 1985), los brotes *in vitro* de *Shorea robusta* fueron enraizados solo con  $0.5 \text{ mgL}^{-1}$  (Singh *et al.*, 2014) al igual que los brotes de *Magnolia sirindhorniae* (Cui *et al.*, 2019), otras especies requieren de concentraciones intermedias como en sándalo (*Santalum album*) con  $3 \text{ mgL}^{-1}$  (Krishnakumar y Parthiban, 2018) o mayores a  $10 \text{ mgL}^{-1}$  como en brotes de *Balanites aegyptiaca* con  $20 \text{ mgL}^{-1}$  (Mansor *et al.*, 2003) y en *Quercus ilex* cultivar VA5, que se obtuvo un óptimo enraizado con  $25 \text{ mgL}^{-1}$  (Martínez *et al.*, 2021).

El enraizado de brotes micropropagados de zapote blanco con una concentración de  $15 \text{ mgL}^{-1}$  fue considerable como óptimo, ya que ésta depende de la especie y de las condiciones de cultivo de los brotes.

### **Actividad antioxidante y contenido de fenoles y flavonoides totales en hojas y tallos de planta *in situ*, de callos y plántulas *in vitro* de *C. edulis***

Con los resultados de la presente investigación se observó que los extractos metanólicos de hojas y tallos de planta adulta cultivada, y de callos y plántulas *in vitro* de zapote blanco, contienen una cantidad sustancial tanto de fenoles como de flavonoides totales, por lo que se puede inferir que ambos grupos de compuestos son responsables de su marcada actividad antioxidante, según lo ensayado a través de varios modelos *in vitro* utilizados en este estudio. Esto concuerda con diferentes investigaciones en las que se ha demostrado una estrecha relación entre el contenido fenólico total y la actividad antioxidante de diversas plantas (Albayrak *et al.*, 2010; Biju *et al.*, 2014; Baba y Malik, 2015).

De acuerdo a los objetivos de esta investigación, se determinó que el contenido de fenólicos no mostró una alta diferencia en el contenido tanto en las partes de la planta *in situ* como en los cultivos *in vitro*, lo que sugiere que en general estos cultivos pueden ser utilizados para el estudio de la producción *in vitro* y su uso en la evaluación de otras propiedades biológicas. Sin embargo, solo el nivel de diferenciación celular afectó el contenido de flavonoides en el cultivo de callos (Figura 12).

En el presente estudio, hubo una similar actividad eliminadora de los radicales DPPH<sup>•</sup>, en los diferentes extractos de zapote blanco, con un alto valor en el de callos (76.99%), cercano a los presentados por Trolox y el ácido ascórbico, a una concentración de 1 mgL<sup>-1</sup>, con una respuesta igual al observado con el método de ABTS<sup>•+</sup>, con el que obtuvo un 89.73% sin diferencia significativa al mostrado por el extracto de tallo de planta *in situ* (87.25%). Sin embargo, el extracto de callo presentó una actividad antioxidante menor que los otros extractos con 68.73%, pero considerado como óptima actividad (Figura 11). Estos resultados sugieren que en cuanto a la actividad antioxidante no hay una relación estrecha con el proceso de indiferenciación celular.

La estereoselectividad de los radicales y la solubilidad de los extractos en diversos sistemas de solventes son algunos de los factores que se ha informado que afectan la capacidad de los extractos para reaccionar y apagar diferentes radicales (Yu *et al.*, 2002). Wang *et al.* (1998) encontraron que algunos compuestos que tienen actividad eliminadora de ABTS<sup>•+</sup> no

mostraban actividad eliminadora de DPPH. Sin embargo, este no es el caso en este estudio. Los porcentajes presentados por los extractos metanólicos de zapote blanco, a una concentración de  $1 \text{ mgL}^{-1}$  se ha reportado para este tipo de extractos en plantas como en hojas y tallos de *Grewia carpinifolia* (Olamide *et al.*, 2017), partes aéreas de *Adelia ricinella* (Berenguer-Rivas *et al.*, 2018) y en frutos de *Zanthoxylum armatum* (Phuyal *et al.*, 2020).

## 9. CONCLUSIONES GENERALES

Se establecieron cultivos *in vitro* de zapote blanco (*C. edulis*) a partir de yemas apicales de segmentos nodales de ramas jóvenes, con la selección de una rutina óptima de asepsia, obteniendo los más bajos porcentajes de contaminación y oxidación, y los más altos de supervivencia, en los explantes recolectados tanto en invierno como en primavera.

Se determinaron las condiciones y medios de cultivo óptimos para la formación de callos, brotes y desarrollo de plántulas *in vitro*, cada sistema dependió del tipo y de la concentración del regulador de crecimiento. La formación y crecimiento de callo se logró en MS con 2 mgL<sup>-1</sup> de Picloram, y la formación y desarrollo de plántulas en MS ½ con 15 mg/L de AIB, a partir de brotes obtenidos en MS con 0.5 mgL<sup>-1</sup> de BA y 0.1 mgL<sup>-1</sup> de ANA.

Los cultivos de callos y plántulas *in vitro* producen tanto ácidos fenólicos como flavonoides y su contenido se relacionó con el nivel de diferenciación celular, lo que también se relacionó con la actividad antioxidante obtenida por cada uno de los cultivos. Estos resultados se compararon con lo mostrado en hojas y tallos de planta adulta de zapote blanco.

## 10. LITERATURA GENERAL CITADA

- Abd-Elmeged M.R., El-Fadl R.E.A. y Hassanen S.A. (2015). Propagation of sapota (*Casimiroa edulis*) trees by using tissue culture technique. Egyptian Journal Of Desert Research. 65(2):257-266.
- Abo-Taleb H. y Abdul-Latif M. (2023). Evaluation of physical and chemical properties of white sapote (*Casimiroa edulis*) fruits and powder. Food technology research journal. 1(3):42-52.
- Ahlawat R., Patel L., Patel R. y Agnihotri R. (2016). White Sapote (*Casimiroa edulis* Llave and Lex). Underutilized Fruit Crops: Importance and Cultivation. 65(1):1353-1367.
- Ahmadpoor F., Zare N., Asghari R. y Sheikhzadeh P. (2022). Sterilization protocols and the effect of plant growth regulators on callus induction and secondary metabolites production in *in vitro* cultures *Melia azedarach* L. AMB Express. (12):1-12.
- Aguilar A., Barredo F., Herrera M., Escalante F., Keb M., Castano E., Borges R. y Rodriguez-Zapata C. (2023). *In vitro* culture and phytochemical analysis of *Diospyros anisandra*. Research Square.v1.
- Albayrak S., Aksoy A., Sagdic O., y Hamzaoglu E. (2010). Compositions, antioxidant and antimicrobial activities of *Helichrysum* (Asteraceae) species collected from Turkey. Food Chemistry. 119(1):114-122.
- Alhady A. y Reda M. (2017). *In vitro* plant regeneration from alginate encapsulated shoot tips of *Casimiroa edulis* L. Egyptian Journal of Desert Research. 67(2):315- 325.
- Anjum S., Abbasi B., Doussot J., Favre-Réguillon A. y Hano C. (2017). Effects of photoperiod regimes and ultraviolet-C radiations on biosynthesis of industrially important lignans and neolignans in cell cultures of *Linum usitatissimum* L. (Flax). Journal of photochemistry and photobiology. (167):216-227.
- Argueta A. (2017). Plantas medicinales de uso tradicional en la ciudad de México. Universidad Nacional Autonoma de México. 210
- Aquino T.A., Gualberto N., Narain N. y De Aquino Santana L. (2020). Evaluation of bioactive compounds from Sapodilla (*Manilkara zapota*) peel and seeds obtained by ultrasound-assisted technique. Society and Development. 9(8):e354985158.
- Awaad A.S., Al-Jaber N.A., Soliman G.A., Al-Outhman M.R., Zain M.E., Moses J.E. y El-Meligy R.M. (2012). New biological activities of *Casimiroa edulis* leaf extract and isolated compounds. Phytotherapy Research/Phytotherapy Research. 26(3):452-457.
- Awaad A.S., Maitland D.J. y Moneir S.M. (2007). New alkaloids from *Casimiroa edulis* fruits and their pharmacological activity. Chemistry Of Natural Compounds. 43(5):576-580.

- Awaad A., SEl-Sayed N.H., Maitland D.J. y Mabry T.J. (2008). Phenolic Antioxidants from *Casimiroa edulis*. Leaves. *Pharmaceutical Biology*. 44(4):258-262.
- Baba S.A. y Malik S.A. (2015). Determination of total phenolic and flavonoid content, antimicrobial and antioxidant activity of a root extract of *Arisaema jacquemontii* Blume. *Journal Of Taibah University For Science*. 9(4):449-454.
- Barrales-Cureño H.J., Reyes-Reyes C., Díaz-Bautista M., Pérez R.A., Castañeda M.A., Zaragoza R.J.E., Andrade H.P., Luna C.A., Osuna-González J.O., López V.L.G. y Chávez S.S. (2017). Diseño de bioprocesos y bioproductos en ingeniería de células vegetales. *Mexican Journal Of Biotechnology*. 2(2):11-39.
- Barrales-Cureño H.J. y Soto-Hernández R.M. (2012). Taxoides: metabolitos secundarios del árbol del tejo (*Taxus* spp.). *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente*. 18(2):207-218.
- Barrientos R.L., Arvizu M.L., Salcedo P.E., Villanueva R.S., Vargas R.J.J. Barradas R.B.A. y Ruiz L.M.A. (2018). Contenido de polifenoles y capacidad antioxidante de *Physalis chenopodifolia* Lam. silvestre y cultivo. *Revista Mexicana de Ciencias Forestales*. 10(51): 182-200.
- Berdonces J.L. (2009). Gran Diccionario Ilustrado de las plantas medicinales descripción y aplicaciones. Editorial Oceano. 662-663.
- Berenguer-Rivas C.A., Mas-Ortiz M., Batista-Corbal P.L., Costa-Acosta J., y Escalona-Arranz J.C. (2018). Chemical composition and in- vitro antioxidant activity of extracts of *Adelia ricinella* L. *Revista Cubana de Química*. 30(2):191-209.
- Bernabé-Antonio A., Maldonado-Magaña A., Ramírez-López C.B., Salcedo-Pérez E., Meza-Contreras J.C., González-García Y., López-Dellamary T.F.A. y Cruz-Sosa F. (2017). Establishment of callus and cell suspension cultures of *Eysenhardtia polystachya* (Ortega) and fungistatic activity of their extracts. *South African Journal Of Botany*. (112):40-47.
- Bertin R., Chen Z., Martínez-Vázquez M., García-Argaéz A. y Frolidi G. (2014). Vasodilation and radical-scavenging activity of imperatorin and selected coumarinic and flavonoid compounds from genus *Casimiroa*. *Phytomedicine*. 21(5):586-594.
- Biju T., Shabeer M.M., Amitha R., Rajendra B.P. y Suchetha K. (2014). Comparative evaluation of serum superoxide dismutase and glutathione levels in periodontally diseased patients: An interventional study. *Indian Journal Of Dental Research/Indian Journal Of Dental Research*. 25(5):613.
- Bourgau F., Gravot A., Milesi S. y Gontier E. (2001). Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. *Plant Science*. 161(5):839-851.

- Cabrera-Carrión J. L., Jaramillo-Jaramillo C., Dután-Torres F., Cun-Carrión J., García P.A. y Rojas de Astudillo L. (2017). Variación del contenido de alcaloides, fenoles, flavonoides y taninos en *Moringa oleifera* Lam. en función de su edad y altura. *Bioagro*. 29(1):53-60.
- Calva G. y Pérez J. (2005). Cultivo de Células y Tejidos Vegetales: Fuente de alimentos para el futuro. *Rev. Digital Universitaria*. 6(11):1-16.
- Capote A., Pérez-Alonso N., Pérez A., Wilken D., Gerth A., Müller-Kuhrt L. y Jiménez E. (2009). Efecto del cultivo *in vitro* en el perfil metabólico de *Psidium guajava* L. *Biotechnología Vegetal*. 9(1):41-45.
- Castañeda J., Arteaga H., Siche R. y Rodríguez G. (2010) Estudio comparativo de la pérdida de vitamina C en chalarina (*Casimiroa edulis*) por cuatro métodos de deshidratación. *Scientia Agropecuaria*. 1(1):75-80.
- Cline M.G. (2000). Execution of the auxin replacement apical dominance experiment in temperate woody species. *American Journal of Botany*. 87(2):182-19
- Cruz-Cruz D.E. (2018). Actividad Antioxidante y Anti-inflamatoria de Plantas Silvestres y un Cultivo *in vitro* de *Sambucus nigra* L. Tesis de Maestría en Biotecnología. Universidad del Papaloapan, Campus Tuxtepec, Oaxaca, México. 49.
- Cui Y., Deng Y., Zheng K., Hu X., Zhu M., Deng X. y Xi R. (2019). An efficient micropropagation protocol for an endangered ornamental tree species (*Magnolia sirindhorniae* Noot. & *Chalermglin*) and assessment of genetic uniformity through DNA markers. *Scientific reports*. 9(1):9634.
- Delgado-Alvarado A. (2018). Variación de fitoquímicos de dos genotipos de *Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews bajo cultivo en acahual. *Agro Productividad*. 11(3):45-50.
- Delgado-Paredes G.E., Kato M. y Rojas-Idrogo J. (2013). Consuelo Suspensiones celulares y producción de metabolitos secundarios en cultivos *in vitro* de *Piper* sp. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*. 12(3): 269-282.
- Deshmukh S.R., Wadegaonkar V.P., Bhagat R.P. y Wadegaonkar P.A. (2011). Tissue specific expression of anthraquinones, flavonoids and phenolics in leaf, fruit and root suspension cultures of Indian Mulberry (*Morinda citrifolia* L.). *Plant Omics*. 4(1):6-13.
- Dixon R.A. y Gonzales R.A. (1994). *Plant Cell Culture: A Practical Approach*, 2nd Edition, Oxford University Press, Oxford.
- Elkady W.M., Ibrahim E.A., Gonaïd M.H. y El Baz F.K. (2017). Chemical Profile and Biological Activity of *Casimiroa Edulis* Non-Edible Fruit's Parts. *Adv Pharm Bull*. 7(4):655-660.

- Esposito F., Zinzula L., Maxia A., Tramontano E. y Sanna C. (2011). Inhibition of HIV-1 reverse transcriptase associated activities by the hydroalcoholic extract of *Casimiroa edulis* seeds. *Natural Product Research*. 25(11):1067-1073.
- Esquinca A.R.G. y Moreno M.C. (2017). Papel ecológico de los metabolitos secundarios. *Lacandonia*. (2):123-130.
- Fernández-Da Silva R., Salomón J., Villarroel A. y Montilla V. (2021). Evaluación de la producción *in vitro* de azadiractina en Neem según el tipo de callo y los agentes químicos. *Revista Ingeniería UC*. 28(2):282-293.
- Gaspar T., Kevers C., Penel C., Greppin H., Reid D.M. y Thorpe T.A. (1996). Plant hormones and plant growth regulators in plant tissue culture. *In Vitro Cellular & Developmental Biology*. (32):272-289.
- Gómez-Jaimes R., Nieto-Ángel D., Téliz-Ortíz D., Mora-Aguilera J.A., Nava-Díaz C., Martínez-Damián M.T. y Vargas-Hernández M. (2012). Manejo postcosecha de zapote mamey (*Pouteria sapota* (jacq.) h. e. moore and stearn) y su impacto en la calidad de la fruta. *Revista Chapingo Serie Horticultura*. 18(2):253-262.
- González D., Hernández A., Muñoz A. y Sánchez J. (2019). La Pitanga y el Mangusán, tesoros gastronómicos de Colombia. *Sosquua*. 1(1):14-21.
- Gutiérrez-Sánchez A., Monribot-Villanueva J.L., Cocotle-Ronzón Y., Martínez-Cruz N.S. y Guerrero-Analco J.A. (2020). Phenolic profile and antioxidant activity from wild and in vitro cultivated *Rhynchosstele rossii* (Orchidaceae). *Acta Botánica Mexicana*. (127):1665.
- Hartmann H.T., Kester D.E., Davies F.T. y Geneve R.L. (2002). *Plant Propagation: Principles and Practices*. 7th Edition, Prentice-Hall, Englewood Cliffs.
- Herrera S.A., Argente M.L., García U.J.C., Mondaca F.I. y González A.J. (2023). Tamizaje fitoquímico de *Parkinsonia aculeata* L. Sp. Pl. desarrollada en condiciones de salinidad, sequía y calor en Sonora, México. *Pesquisas agrárias e ambientais*. (16):14.
- Hurtado-Manrique P., Jurado T.B., Ramos L.E., y Calixto C.M. (2015). Evaluación de la actividad antioxidante del extracto hidroalcohólico estandarizado de hojas de *Juglans neotropica* Diels (nogal peruano). *Revista de la sociedad Química del Perú*. 81(3):283-291.
- Ibarra-Cantún D., Delgado-Alvarado A., Herrera-Cabrera B.H., y Salazar-Rojas V.M. (2018). Variación de fitoquímicos de dos genotipos de *Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews bajo cultivo en acahual. *AGRO*. 11(3):45-50.
- Jiménez A. (2012). *Herbolaria mexicana* 2a ed. Madrid: Mundi-Prensa. 458.
- Karimi A., Krähmer A., Herwig N., Schulz H., Hadian J. y Meiners T. (2020). Variation of secondary metabolite profile of *Zataria multiflora* Boiss. populations linked to geographic, climatic, and edaphic factors. *Frontiers in Plant Science*. (11):969.

- Karuppusamy S. (2009). A review on trends in production of secondary metabolites from higher plants by *in vitro* tissue, organ and cell cultures. *Journal of Medicinal Plants Research*. 3(13):1222-1239
- Kreis W. (2007) *In vitro* culturing techniques of medicinal plants. En: Kayser O, Quax W (Eds) *Medicinal plant biotechnology. From basic research to industrial application*. 157-185.
- Krishnakumar N. y Parthiban K.T. (2018). Micropropagation (In vitro) techniques for sandal wood (*Santalum album* L.). *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*. 7(3):620-627.
- Kumar K., Arora P.K., Brar J.S., Bhatia D. y Kumar A. (2019). Influence of explant collection period, antibrowning strategy and growth regulators composition on in vitro propagation of *Bhagwa pomegranate*. *Indian Journal of Horticulture*. 76(2):273-278.
- Li P., Shang Y., Zhou W., Hu X., Mao W., Li J., Li J. y Chen X. (2018). Development of an efficient regeneration system for the precious and fast-growing timber tree *Toona ciliata*. *Plant Biotechnol*. 35(1):51-58.
- Macías V.V.E., Badrán P.R., Rodríguez O.J. y Silva R.H. (2021). Metabolitos secundarios, actividad biológica y etnobotánica de plantas de Santa Marta. Editorial UniMagdalena.
- Mabberley D. (2008). *Mabberley's Plant Book* 3rd ed. London: Cambridge University Press. 157.
- Magos G.A., Vidrio H., Reynolds W.F. y Enríquez R.G. (1998). Pharmacology of *Casimiroa edulis* IV. Hypotensive effects of compounds isolated from methanolic extracts in rats and guinea pigs. *Ethnopharmacol*. 64(1):35-44.
- Mahboubi M., Kazempour N. y Nazar A.R.B. (2013). Total phenolic, total flavonoids, antioxidant and antimicrobial activities of *Scrophularia striata* Boiss extracts. *Jundishapur Journal of Natural Pharmaceutical Products*. 8(1):15.
- Mansor N., Ismaïl L., Diallo Y. y Kegrave. (2003). In vitro multiplication of the semi-arid forest tree, *Balanites aegyptiaca* (L.) Del. *African Journal of Biotechnology*. 2(11):421-424.
- Martínez M. (1989). *Plantas Medicinales de México*. Editorial Botas. 349-355.
- Martínez M., Mary K., Rico R. y Silva T. (2006). Cultivo *in vitro* de cuatro diferentes tejidos de *Casimiroa edulis* Llave et Lex para identificación de alcaloides totales. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*. 37(4):5-11.
- Martínez M.T., Arrillaga I., Sales E., Pérez-Oliver M.A., González-Mas M.C. y Corredoira E. (2021). Micropropagation, characterization, and conservation of *Phytophthora cinnamomic* Tolerant Holm Oak Mature Trees. *Forests*. 2(12):1634.

- Massot B., Milesi S., Gontier E., Bourgaud F., Guckert A. (2000). Optimized culture conditions for the production of furanocoumarins by micropropagated shoots of *Ruta graveolens*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. (62):11-19.
- Matos-Acurero A. (2011). Producción de aloína en callos y hojas de brotes de zábila (*Aloe vera* L.) regenerados *in vitro*. *Bioagro*. 23(2):79-86.
- Mello T., Correia L.N.F., Hegedus C.E.N., Schmildt E.R., Ferreira A., Lopes J.C., Otoni W.C. y Alexandre R.S. (2023). Cell reprogramming via direct somatic embryogenesis in an Atlantic Forest species vulnerable to extinction: polarity of *Euterpe edulis* stem segments induced with pyridinecarboxylic acid. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*. 154(1):131-140.
- Miller S.L., Haber W.A. y Setzer W.N. (2009). Chemical composition of the leaf essential oil of *Casimiroa edulis* La Llave & Lex. (Rutaceae) from Monteverde, Costa Rica. *Natural product communications*. 4(3):425-436.
- Molina-Hernández M., Téllez-Alcántara N.P., Pérez-García J., Olvera-López J.I. y Jaramillo M.T. (2004). Anxiolytic-like actions of leaves of *Casimiroa edulis* (Rutaceae) in male Wistar rats. *Journal of Ethnopharmacology*. 93(1):93-98.
- Morera J.A. (1992). El zapote. Centro agronómico tropical de la investigación y enseñanza, Costa Rica.
- Moreno E., Ortiz B.L. y Restrepo L.P. (2014). Contenido total de fenoles y actividad antioxidante de pulpa de seis frutas tropicales. *Revista Colombiana de Química*. 43(3):41-48.
- Mosavat N., Golkar P., Yousefifard M. y Javed R. (2019). Modulation of callus growth and secondary metabolites in different *Thymus* species and *Zataria multiflora* micropropagated under ZnO nanoparticles stress. *Biotechnology and applied biochemistry*. 66(3):316-322.
- Mostafa E.W., Ahmed I.E., Hussein G.M. y Kamel B.F. (2017). Chemical Profile and Biological Activity of *Casimiroa Edulis* Non-Edible Fruit's Parts. *Advanced pharmaceutical bulletin*. 7(4):655-660.
- Mudoï K.D., Saikia S.P. y Borthakur M. (2014). Effect of nodal positions, seasonal variations, shoot clump and growth regulators on micropropagation of commercially important bamboo, *Bambusa nutans* Wall. ex. Munro. *African Journal of Biotechnology*. 13(19):1961-1972.
- Munteanu I.G. y Apetrei C. (2021). Analytical methods used in determining antioxidant activity: A review. *International Journal of Molecular Sciences*. 22(7):3380.
- Murashige T. y Skoog F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*. 15(3):473-497.

- Murthy H.N., Lee E.J. y Paek K.Y. (2014). Production of secondary metabolites from cell and organ cultures: strategies and approaches for biomass improvement and metabolite accumulation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*. (118):1-16.
- Nagai H., Tanaka T., Goto T., Kusudo T., Takahashi N. y Kawada T. (2014). Phenolic compounds from leaves of *Casimiroa edulis* showed adipogenesis activity. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 78(2):296-300.
- Naziam M. y Sabattini P. (2021) Traditional *in vitro* strategies for sustainable production of bioactive compounds and manipulation of metabolomic profile in medicinal, aromatic and ornamental plants. *Planta*. (254):1-22
- North J., Ndakidemi P. y Laubscher C. (2012). Effects of Antioxidants, Plant Growth Regulators and Wounding on Phenolic Compound Excretion during Micropropagation of *Strelitzia reginae*. *International Journal of the Physical Sciences*. 4(7):638-646.
- Ojeda Á., Obispo N., Gil J.L. y Matute I. (2015). Perfil cualitativo de metabolitos secundarios en la fracción comestible de especies leñosas seleccionadas por vacunos en un bosque semicaducifolio. *Pastos y Forrajes*. 38(1):64-72.
- Olamide E.A., Funsho O.O., Tan N. y Zeng G. (2017). In vitro antioxidant activity, total phenolic and flavonoid contents of ethanol extract of stem and leaf of *Grewia carpinifolia*. *Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences*. 1(6):10-14.
- Pant M. y Husen A. (2022). In vitro micrografting to induce juvenility and improvement of rooting. In *Environmental, Physiological and Chemical Controls of Adventitious Rooting in Cuttings*. 439-453.
- Pérez-Alonso N. y Jiménez E. (2011). Producción de metabolitos secundarios de plantas mediante el cultivo *in vitro*. *Biotecnología Vegetal*. 11(4):195-211.
- Phuyal N., Jha P.K., Raturi P.P. y Rajbhandary S. (2020). Total phenolic, flavonoid contents, and antioxidant activities of fruit, seed, and bark extracts of *Zanthoxylum armatum* DC. *ScientificWorldJournal*. (2020):1-7.
- Pía-Beker M., Alberto-Fernández O. y Guadalupe-Klich M. (2020). Variaciones estacionales y espaciales en la concentración de fenoles en *Elaeagnus angustifolia* L. *Pastos y Forrajes*. 43(1):26-31.
- Pourebab N., Motafakkerazad R., Kosari-Nasab M., Farsad Akhtar N., y Movafeghi A. (2015). The influence of TDZ concentrations on *in vitro* growth and production of secondary metabolites by the shoot and callus culture of *Lallemantia iberica*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*. (122):331-339.
- Prieto P., Pineda M. y Aguilar M. (1999). Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: Specific application to the determination of Vitamin E. *Analytical biochemistry*. 269(2):337-341.

- Ramírez-Briones E., Rodríguez-Macías R., Salcedo-Pérez E., Ramírez-Chávez E., Molina-Torres J., Tiessen A. y Zañudo-Hernández J. (2019). Seasonal changes in the metabolic profiles and biological activity in leaves of *Diospyros digyna* and *D. rekoi* “Zapote” trees. *Plants*. 8(11):449.
- Rodríguez-Valdovinos K.Y., Salgado-Garciglia R., Vázquez-Sánchez M., Álvarez-Bernal D., Oregel-Zamudio E., Ceja-Torres L.F. y Medina-Medrano J.R. (2021). Quantitative Analysis of Rutin by HPTLC and In Vitro Antioxidant and Antibacterial Activities of Phenolic-Rich Extracts from *Verbesina sphaerocephala*. *Plants*. 10(3):475.
- Rojas-Idrogo C., Kato M.J., Delgado-Paredes G.E., Segal F.E.I. y Handro W. (2014). Producción de metabolitos secundarios en cultivo de raíces *in vitro* y suspensiones celulares de *Ipomoea carnea* spp. *carnea* Jacq. *Anales de Biología*. (36):107-120
- Satheesh N. (2015). Review on Distribution, Nutritional and Medicinal Values of *Casimiroa edulis* Llave- An Underutilized Fruit in Ethiopia. *American-Eurasian J. Agric. y Environ. Sci.* 15(8):1574-1583.
- Schwarz K., Bertelsen G., Nissen L., Gardner P., Heinonem M., Hopia A., Huynh-Ba T., Lambelet P., McPhail D., Skibsted L. y Tijburg L. (2001). Investigation of plants extracts for the protection of processed foods against lipid oxidation. Comparison of antioxidant assays based on radical scavenging, lipid oxidation and analysis of the principal antioxidant compounds. *European Food Research Technology*. 212(3):319-328.
- Segura S., Fresnedo J., Mathuriau C., López J., Andrés J. y Muratalla A. (2018). The edible fruit species in Mexico. *Genetic Resources and Crop Evolution*. 65(6):1767-1793.
- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). (2017). Acezada en enero de 2024. <https://www.gob.mx/siap/articulos/zapote-fruta-tropical-tipica-de-mexico>
- Shahinozzaman M., Azad K.M.A y Amin M.N. (2012). In vitro clonal propagation of a fast growing legume tree-Acacia mangium Willd. employing cotyledonary node explants. *Notulae Scientia Biologicae*. 4(2):79-85.
- Singh M., Sonkusale S., Niratker C. y Shukla P. (2014). Micropropagation of *Shorea robusta*: an economically important woody plant. *Journal of Forest Science*. 60(2):70-74.
- Srivastava P.S., Steinhauer A. y Glock H. (1985). Plantlet regeneration in leaf and root cultures of birch (*Betula pendula* Roth.). *Plant Scientia*. 42(3):209-214.
- Steinmacher D.A., Clement C.R. y Guerra M.P. (2007). Somatic embryogenesis from immature peach palm inflorescence explants: towards development of an efficient protocol. *Plant Cell Tiss Organ Cult.* (89):15-22.

- Syros T., Yupsanis T., Zafiriadis H. y Economou A. (2004). Activity and isoforms of peroxidases, lignin and ana to my, during adventitious rooting in cuttings of *Ebenus cretica* L. Journal of Plant Physiology. 161(1):69-77.
- Thakur A. y Kanwar J.S. (2008). Micropropagation of "Wild pear" *Pyrus pyrifolia* (Burm F.) Nakai. II. Induction of Rooting. Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca. 36(2): 104-111.
- The plant list. S/F. Acezada en enero de 2024.  
<http://www.theplantlist.org/browse/A/Rutaceae/Casimiroa/>
- Trejo-Tapia G. y Rodríguez-Monroy M. (2007). La agregación celular en la producción de metabolitos secundarios en cultivos vegetales *in vitro*. Interciencia. 32(10):669-674.
- Tun K.N.W., Aminah N.S., Kristanti A.N., Ramadhan R. y Takaya Y. (2019). Two flavonoids from stem bark of *Casimiroa edulis* and their antidiabetic and antioxidant activities. In IOP Conference Series: Earth and Environmental Science. 1(217):012006.
- Vaca-Sánchez M.S., González-Rodríguez A., Maldonado-López Y., Fernandes W.G. y Cuevas-Reyes P. (2016). Importancia de los taninos en especies del género *Quercus* como metabolitos secundarios asociados a defensa contra insectos herbívoros. Biológicas Revista de la DES Ciencias Biológico Agropecuarias Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. 18(1):10-20.
- Vargas R.J.J., Aguayo R.M., Virgen C.G., Ramírez S.H.E., Becerra A.B. y Barrientos R.L. (2017). Actividad antimicrobiana de los extractos de la hoja del zapote blanco (*Casimiroa edulis*). Majorensis. (13):50-58.
- Vázquez-Cruz B., Vázquez-Muñoz M., Navarrete-Bastida R. y Trujillo G.I.D. (2009). Antihypertensive and vasorelaxant effects of the aqueous extract of *Casimiroa eduli*. Pharmacologyonline. (3):73-83.
- Vera-Sánchez G.M., Fernández-Condori R.C. y Berrocal I. (2023). Capacidad antioxidante y contenido de polifenoles de la chalarina. Archivos Larinoamericanos de Nutrición. 73(1):1.
- Vidal-López D.G., Schlie-Guzmán M.A., Gonzalez-Esquinca A.R. y Luna-Cazáres L. (2008). El zapote blanco (*Casimiroa edulis* Llave & Lex, Rutaceae): Un recurso medicinal de México. Lacandonia. 2(1):155-122.
- Vielba J.M., Vidal N., San José M.C., Rico S. y Sánchez C. (2020). Recent advances in adventitious root formation in chestnut. Plants. 9(11):1543.
- Villavicencio-Gutiérrez, Eulalia E., Arellano-Ostoa G. y Carranza-Pérez M.A. (2022). Estabilidad del explante en la proliferación de brotes axilares *in vitro* de la biznaga. Revista Mexicana De Ciencias Agrícolas. 13(1):53-64.

- Villegas-Monter A. (2016). Zapote mamey *Pouteria sapota* (Jacq.) Moore & Stearn, diversidad y usos. *Agro Productividad*. 9(4).
- Wang M., Li J., Rangarajan M., Shao Y., La Voie E. J., Huang T. y Ho C. (1998). Antioxidative phenolic compounds from Sage (*Salvia officinalis*). *Journal Agriculture Food Chemistry*. 46(12):4869-4873.
- Yu L., Haley S., Perret J., Harris M., Wilson J. y Qian M. (2002). Free radical scavenging properties of wheat extracts. *Journal Agriculture Food Chemistry*. 50(6):1619-162.

**Establecimiento de un sistema óptimo de rutina de asepsia y estación de recolecta de segmentos nodales para la micropropagación de *Casimiroa edulis* La Llave et Lex.**

**Establishment of an optimal aseptic routine and season recollection of nodal segments for the micropropagation of *Casimiroa edulis* La Llave et Lex.**

Juan Christian Altamirano-López<sup>1</sup>  - Rafael Salgado-Garciglia<sup>1</sup>  - Erika Rodríguez-Mercado<sup>1</sup>  Hebert Jair Barrales-Cureño  <sup>2</sup> - Alejandra Hernández-García  <sup>1</sup> - ✉

<sup>1</sup> Laboratorio de Biotecnología Vegetal, Instituto de Investigaciones Químico Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Edif. B3, Ciudad Universitaria CP 58030, Morelia, Michoacán, México

<sup>2</sup> Carrera en Ingeniería en Innovación Sustentable, Instituto Tecnológico de Estudios Superiores de Zamora, Km. 7, Carretera Zamora-La Piedad, CP 59600, Zamora, Michoacán, México

✉ Correspondence author: [alejandra.hernandez@umich.mx](mailto:alejandra.hernandez@umich.mx)

Reception: / Acceptation:

© Nova Scientia, under Creative Commons license

---

## Resumen

Se investigó el efecto de cinco rutinas de asepsia y la época de recolección (primavera, verano, otoño e invierno) sobre la contaminación, pardeamiento y supervivencia, de segmentos nodales de un árbol adulto de zapote blanco (*Casimiroa edulis*). Para las rutinas de asepsia se utilizó hipoclorito de sodio comercial, detergente neutro, fungicida (Tecto60®) y Tween20®. Yemas apicales del brote inicial fueron cultivadas en medio Murashige y Skoog (MS) con benciladenina (BA) (0.5 y 1 mgL<sup>-1</sup>) y ácido naftalenacético (ANA) (0-1 mgL<sup>-1</sup>) para inducir brotación; el enraizamiento de brotes se evaluó en MS con ácido indol-3-butírico (AIB) (0-5 mgL<sup>-1</sup>). A los 14 días, la mejor rutina de asepsia fue R5 en explantes recolectados en primavera (85% de supervivencia, 5% de contaminación y 5% por pardeamiento), desarrollando el brote inicial a los 28 días del cultivo. En MS con 0.5 mgL<sup>-1</sup> BA y 0.1 mgL<sup>-1</sup> ANA se obtuvieron 6 brotes/explante y a los 45 días del cultivo en MS con 15 mgL<sup>-1</sup> AIB, se formaron plántulas (4.5 cm de altura, 5.2 raíces de 3.5 cm de largo), las que fueron trasplantadas y aclimatadas en una mezcla de turba, suelo y perlita (1:1:1) durante 28 días, obteniendo un 100% de supervivencia, logrando la micropropagación del zapote blanco.

**Palabras clave:** Aclimatación; brotes; enraizado; establecimiento *in vitro*; Rutaceae; trasplante; yemas apicales; zapote blanco.

## Abstract

In this study, the effect of five aseptic routines and season collection (spring, summer, autumn and winter) of nodal segments on contamination, browning and survival percentage, from an adult white sapote tree (*Casimiroa edulis*) was investigated. The aseptic routines were tested using commercial sodium hypochlorite, neutral detergent, fungicide (Tecto60®) and Tween20®. Apical buds of the initial shoot were cultured in Murashige and Skoog (MS) medium with benzyladenine (BA) and naphthaleneacetic acid (NAA) (0-2.5 mgL<sup>-1</sup>) to induce shooting; rooting of shoots was evaluated in MS with indol-3-butyric acid (IBA) (0-5 mgL<sup>-1</sup>). At 14 days, the best aseptic routine was R5 in explants collected from spring (85% survival, 5% of contamination and 5% of browning), developing the initial bud 28 days after culture. In MS with 0.5 mgL<sup>-1</sup> BA and 0.1 mgL<sup>-1</sup> NAA were obtained 6 shoots/explant, and were formed plantlets (4.5 cm high, 5.2 roots of 3.5 cm long) at 45 days of culture in MS with 15 mgL<sup>-1</sup> IBA,

which were transplanted and acclimatized in a mixture of peat, soil and perlite (1:1:1) for 28 days, obtaining a 100% survival, achieving the micropropagation of the white sapote.

**Keywords:** Acclimatization; apical buds; *in vitro* establishment; rooting; Rutaceae; shoots; transplant; white sapote.