

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

1981

1 ejemplar

N° 19

PROPAGACION VEGETATIVA "IN VITRO" DE LOS PORTAINJERTOS

EM-26 Y MM-106 DEL MANZANO (Malus sylvestris Mill)

( Estudios preliminares )

Fac. de Ciencias, Biología

Tesis Profesional

AMADEO BARBA ALVAREZ



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

# INDICE

## Capítulo I

### Introducción

Colocación taxonómica del manzano

Origen y dispersión

## Capítulo II

### El árbol frutal

#### El patrón

Patrones de semilla

Patrones clonales

## Capítulo III

### Patrones de manzano

Cultivos intensivos

Serie Malling

Serie Malling - Merton

Patrón EM-26

Patrón MM-106

## Capítulo IV

### Propagación asexual

Propagación tradicional

Propagación "in vitro" por cultivo de tejidos

Multiplicación clonal rápida

Rutas de propagación "in vitro" de frutales

Cultivo de tejidos del manzano

Antecedentes

## Capítulo V

### Material y método

Obtención del cultivo aséptico

Material biológico

Medios de cultivo

Cultivo "in vitro"

Fase de adaptación

Fase de proliferación  
Fase de elongación  
Fase de enraizamiento

**Capítulo VI**

Resultados y discusión

Esterilización

Fase de adaptación

Fase de multiplicación

Patrón EM-26

Patrón MM-106

Fase de elongación

Fase de enraizamiento

**Capítulo VII**

Conclusiones

**Bibliografía.**

## R E S U M E N

En este trabajo se llevó a cabo la propagación vegetativa "in vitro", de los portainjertos enanizantes del manzano EM-26 y MM-106.

Para ésto, se estableció una técnica de esterilización del material biológico proveniente del campo, en donde se pudo determinar que la mejor fuente de tejido para la iniciación del cultivo, fueron los ápices de brotes laterales jóvenes.

La ruta de propagación fue a partir de la proliferación de brotes laterales provenientes de yemas axilares, y ésta constó de cuatro fases: adaptación del tejido a las condiciones "in vitro", multiplicación de brotes, elongación e inducción de sistema radicular; probándose en cada una los medios minerales de Murashige-Skoog y el de Knop, así como también diferentes concentraciones hormonales de citocininas (6-Benzil adenina) y auxinas (Acido indol-3-butírico) con el objeto de determinar el medio nutritivo y los balances hormonales que nos permitieran la obtención de plantas completas a partir de un solo ápice de brote. Dando como resultado que en general, el medio Murashige-Skoog fue apto para ambos patrones en cada una de las fases, así como también, la mejor respuesta en la inducción de brotes fue dada por el patron EM-26, ya que este duplicó su número cada quince días, obte-

niendose a partir de uno sólo, 190 vástagos en 67 días. Lo que implica una potencialidad de obtención de varios millones de plantas en 12 meses.

Por otra parte, se logró inducir la formación de sistema radicular en ambos patrones, pero la respuesta fue baja. Teniendo ya a la fecha, los primeros árboles de manzano producidos "in vitro", en condiciones ambientales.

## O B J E T I V O S

El objetivo principal de este trabajo es el obtener plantas completas de los portainjertos EM-26 y MM-106 del manzano, a partir de un fragmento de tejido cultivado "in vitro". Por lo tanto, para la iniciación del cultivo es necesario establecer una técnica de esterilización que permita utilizar material proveniente del campo. Así como también, es importante determinar la fuente de tejido y su estado fisiológico, debido a que cada tejido u órgano presenta una diferente capacidad de respuesta a las condiciones "in vitro". Además, es necesario para el éxito del cultivo, establecer las condiciones nutricionales, hormonales y ambientales que permitan la propagación masiva de estos portainjertos. Para lo cual, se determinará la efectividad de los medios nutritivos de Murashige-Skoog y el de Knop, así como se establecerá el balance hormonal entre citocininas y auxinas que induzca la mejor respuesta en cada una de las diferentes fases (adaptación, multiplicación, elongación y enraizamiento).

Por otra parte se espera adaptar y facilitar la técnica de propagación vegetativa por medio del cultivo de tejidos de árboles frutales.

CAPITULO I

## INTRODUCCION

El método de propagación masiva por medio del cultivo de tejidos, viene a ser una herramienta muy importante en la fruticultura moderna ya que es actualmente para algunas especies, y augura para otras, la rápida multiplicación de grandes cantidades de plantas con las mismas características que sus progenitores seleccionados.

Por medio del cultivo "in vitro", se tiene un mejor control sobre el desarrollo del material biológico ya que las condiciones ambientales, nutricionales y hormonales pueden ser perfectamente definidas, cosa que en el campo y por medio de los métodos tradicionales no es posible. Así también, esta técnica nos permite obtener una producción todo el año y una población de varios miles de plantas en poco tiempo, por lo que actualmente compite, y quizás en el futuro desplaza, a las técnicas de propagación tradicionales.

Es importante hacer notar que, en México, la propagación de plantas leñosas por medio del cultivo de tejidos y en específico del manzano, aún es un campo vírgen a pesar de que en países como Inglaterra, Polonia, Bélgica, etc., ya es una técnica usada para la propagación comercial, lo cual les ha dado una ventaja en la producción mundial de árboles frutales de alta calidad. Por lo tanto, y debido a la importancia económica que representa el cultivo del manzano, es necesario

sario implantar este tipo de técnicas modernas, lo cual nos ayudará a elevar el nivel de la tecnología frutícola nacional. De aquí surge el objetivo general de este trabajo que es el de establecer las condiciones hormonales, nutricionales y ambientales que nos permitan la propagación masiva "in vitro" de dos de los patrones más importantes del manzano ; el MM-106 y el EM-26. El primero con una resistencia al pulgón lanigero (Eriosoma lanigerum Hausmann), el cual ataca tenazmente a los huertos del país, y el segundo, con un poder enanizante que permite la implantación de cultivos intensivos.

E L M A N Z A N O

Colocación Taxonómica

ORDEN : ROSALES

FAMILIA : POMOIDEAE

SUBFAMILIA : MALOIDEAE

GENERO : Malus spp.

La familia Pomoideae consiste de 100 géneros y 300 especies muchas de las cuales son hierbas perennes, arbustos y árboles. Esta familia está caracterizada por tener las partes florales (pétalos, sépalos, estambres, carpelos) en múltiplos de cinco.

El género Malus tiene de 25 a 30 especies y algunas subespecies de las llamadas "crab-apple" (crab=espinoso), muchas de las cuales, son cultivadas como árboles ornamentales por su floración profusa y frutos atractivos; siendo la mayoría de las especies utilizadas en la producción frutícola, para consumo humano (Moore, 1975; Janick, 1979).

Los árboles frutales debido a su origen híbrido y mutacional frecuentemente son poliploides. En el caso del manzano ( $n=17$ ), la especie M. sylvestris Mill y otros, son diploides ( $2n$ ) o triploides ( $3n$ ), (Janick, 1979).

### Origen y Dispersión

El manzano es originario de las zonas templadas de Europa, de las regiones del Cáucaso y Asia Central (Tamaro, 1968; Moore, 1975).

Las fuentes de información indican que el manzano comenzó a ser domesticado en el sur del Cáucaso (Cape, 1979), pero descubrimientos hechos hace un siglo en Suiza y Austria, evidencian su cultivo ya desde la remota edad de piedra (Bianchini, 1974), época en la cual, se cree que fue dispersado a través de Europa, desde el Mar Caspio hasta el Océano Atlántico. Por otra parte, sabemos que en la época de Ramsés III (siglo XII a.c.), ya se cultivaba a lo largo del fértil valle del Nilo (Bianchini, 1974). Así como los egipcios, los griegos y romanos también lo cultivaron, los cuales como resultado de sus viajes e invasiones lo dispersaron por Europa y Asia (Moore, 1975). Posteriormente, en la Edad Media, el cultivo del manzano se concentró alrededor de las casas religiosas medievales.

Los primeros colonos que llegaron al Nuevo Mundo trajeron consigo los manzanos cultivados en Europa, posteriormente a inicios del siglo XVII, estos arribaron a América del Norte, llegando poco después hasta Africa Septentrional y Australia. Su difusión posterior sigue en general, el mismo camino que otras especies de frutales, cosa muy comprensible si lo relacionamos con la extensión del colonialismo de aque

llos tiempos. Durante esta época, algunos manzanos ya fueron obtenidos deliberadamente por medio de semillas de árboles seleccionados, pero no fue sino hasta que Thomas Andrew Knight (1759-1835), comenzó a crear nuevos manzanos por medio de la hibridación, cuando se aplicó con fines prácticos el descubrimiento del sexo en las plantas.

Hasta la fecha, el manzano ha sido difundido en casi todo el mundo, esto fue posible debido a la gran variabilidad genética encontrada en él, la cual permitió su adaptación a muy diferentes medio ambientes, existiendo en la actualidad huertas en Siberia y China donde las temperaturas de invierno bajan hasta  $-40^{\circ}\text{C}$ .

Hoy en día, los manzanos representan aproximadamente el 50% de la producción mundial de árboles deciduos, esto varía claro de año a año de acuerdo a las condiciones ambientales de los principales centros de producción. Su importancia radica en que sus frutos son una rica fuente de sustancias naturales y farmacéuticas, además de que éstos son utilizados para la manufactura de sidras y bebidas de sabor dulce y agradable, así como también en la elaboración de platillos exquisitos. Como fruta fresca, se consume en todo el mundo en cantidades enormes ya que aporta gran cantidad de sustancias nutritivas, es altamente digestiva, de olor atractivo y delicioso sabor. Debido a todas estas características es uno de los árboles frutales cuyo cultivo ha inducido a realizar investigaciones para optimizar su producción, ya sea perfeccionando las técnicas tradicionales o aplicando nuevas.

CAPITULO II

## EL ARBOL FRUTAL

El árbol de manzano cultivado actualmente en forma comercial, en general está injertado, por lo tanto, constituido por dos partes vegetales (Fig. 1) íntimamente asociadas: el patrón o portainjerto (parte subterránea y basal del árbol), y el injerto que constituye la parte aérea (tronco, ramas primarias, y ramas secundarias). Un árbol injertado es por lo tanto, una asociación, consecuencia de la superposición e interacción de dos metabolismos, ya que al injertarse conectan o ensamblan dos porciones de tejido vegetal vivo, en forma tal que siguen viviendo y se comportan después como una sola planta, por lo tanto, las influencias mutuas del patrón y el injerto así como sus consecuencias naturales son múltiples (Díaz, 1974).

Las razones por las cuales se realiza el injertado en los árboles frutales son muchas, básicamente; la perpetuación de clones que no se pueden reproducir con facilidad por otros métodos asexuales; así como la transmisión de la influencia benéfica que ejerce el patrón sobre el injerto en la regulación del tamaño de la planta, en la inducción de precocidad e incremento en la floración y en la resistencia a medios ambientes adversos, enfermedades, patógenos, etc.

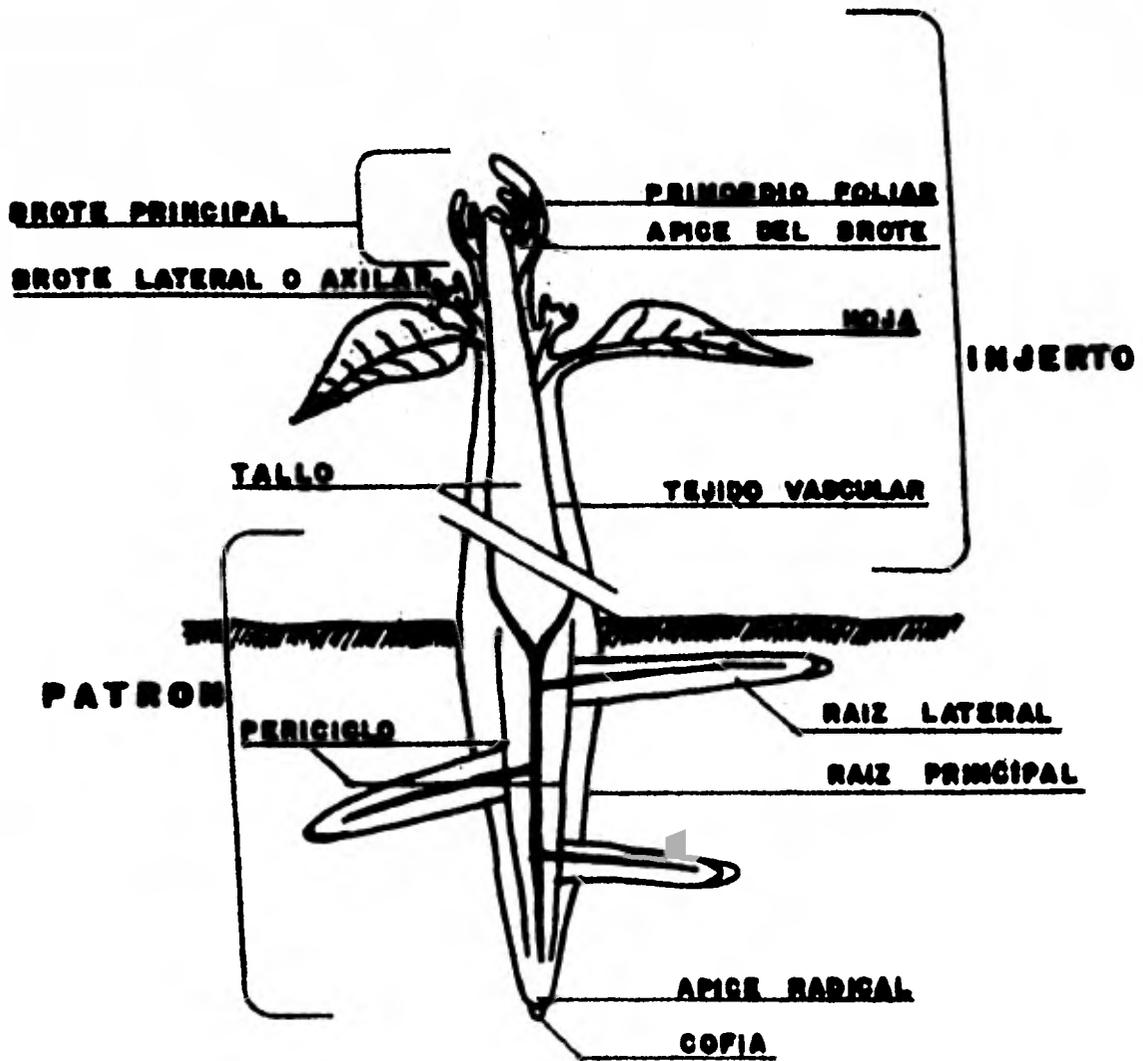


Figura 1 .- REPRESENTACION ESQUEMATICA DE UN ARBOL FRUTAL INJERTADO .

## El Patrón

Un patrón para árbol frutal puede ser de dos diferentes tipos; patrón de semilla, y patrón clonal.

### Patrones de semilla

Son originados a partir de semilla, y constituyen la mayoría de los patrones usados para árboles frutales debido a que el suplemento de semilla es abundante y barato y el costo de producción es relativamente bajo. Estos han sido por tradición "suficientemente buenos" para las operaciones frutícolas y de vivero, aunque tienen la gran desventaja de que nunca los individuos son iguales a sus progenitores en su constitución genética, lo que puede implicar la pérdida de características deseadas debido a su carácter heterocigótico.

### Patrones clonales

Estos se pueden considerar los mejores y más importantes patrones para los árboles injertados, debido a que presentan el genotipo de sus progenitores seleccionados, y por esto, son los únicos que permiten una homogeneidad de vegetación y de productividad en la plantación (Coutanceau, 1970). Esto es especialmente cierto para el manzano, y prometen ser

de gran importancia en el futuro para otra clase de frutales en los que aún no se han utilizado.

Estos patrones pueden ser obtenidos vegetativamente a partir de diferentes fuentes como son;

- a) Varetas de madera dura  
(Porción de brote dormido)
- b) Varetas de madera suave  
(Porción de brote con hojas)
- c) Varetas de raíz  
(Porción de raíz durmiente)
- d) Acodado, etc.

El método particular a usar depende de muchos factores como; disponibilidad del material biológico, costo, suplemento de labor y tierras y también de la naturaleza del patrón por sí mismo. Así como cada variedad de fruto tiene caracteres individuales de sabor, color, olor, cualidad de preservación, etc.;, por sí misma, así, cada patrón tiene características individuales de enraizamiento y de respuesta a diferentes tratamientos para enraizar (Tukey, 1964).

CAPITULO III

## P A T R O N E S   D E   M A N Z A N O

### Cultivos Intensivos

Como resultado de los progresos técnicos adquiridos durante los últimos años, y por las apremiantes exigencias económicas de nuestra época se han estado abandonando los sistemas clásicos del cultivo del gran árbol "standard" con su enorme masa poco económica, por unidades mucho más compactas, para implantar los cultivos intensivos que se imponen como orientación obligada dentro de la fruticultura. Para este sistema de plantación deben de usarse patrones clonales enanizantes, ya que estos tienen la facultad de reducir el volumen (porte) de las variedades sobre ellos injertadas, transformando sus características de desarrollo en las más reducidas formas, de tal manera, que las densidades de las huertas han cambiado de 65 árboles standard por hectárea hasta 100,000 unidades con el uso de patrones superenonizantes (Hudson, 1971; Child, 1972; Luckwill, 1973).

Por este método de cultivo intensivo se han podido obtener a los tres o cuatro años de plantación, producciones de manzanas superiores a los 40,000 kg por hectárea (Juscafresa, 1963) y en plantaciones adultas hasta 100,000 kg (Tukey, 1964).

Estos portainjertos procedentes de la multiplicación

clonal caracterizados por su sistema radicular fasciforme, de escasa profundidad y penetración en el suelo, permite establecer huertos en tierras de poca profundidad y absorber con mayor facilidad toda clase de materias nutritivas, que aquellos árboles injertados sobre patrones de semilla, ya que sus raíces se desarrollan a mayores profundidades.

Los patrones enanizantes del manzano han sido obtenidos tras años de experimentación en los centros de investigaciones hortícolas de las estaciones de East Malling y John Innes, Inglaterra, dando origen a las series Malling (EM) y Malling-Merton (MM) de portainjertos clonales.

#### Serie Malling (EM)

Desde 1912 la estación de investigaciones frutícolas de East Malling, Inglaterra, emprendió una basta selección de patrones clonales del manzano para la obtención de líneas progenitoras, trabajos que desde su inicio se enfocaron también a la definición morfológica y fisiológica de patrones designados de EM-1 a EM-27 (Díaz, 1974). Estos varían en vigor (Preston, 1958a; 1958b), desde muy enanizantes, a muy vigorizantes (Tabla 1), en su efecto sobre el cultivar injertado en ellos (Zeiger, 1960).

Aparentemente los patrones Malling forman uniones de injertos por completo compatibles con la mayoría de los cultivares, pero ninguno es resistente al pulgón lanígero (Eriosoma lanigerum H.), el cual se alimenta de la savia del man-

zano, dando lugar a la formación de chancros o tumores y pre dispone por este daño a enfermedades criptogámicas que pue-- den ser mortales (Garner, 1953; Preston, 1953; Brase, 1965; Preston, 1971; Alvarez, 1974).

Serie Malling-Merton (MM)

La institución hortícola de John Innes y la estación de East Malling, empezaron a trabajar en conjunto en 1928, para la obtención de una nueva serie de patrones para el manzano resistentes al pulgón lanigero y con una gama en el vigor del brote formado con ellos (Tabla 1). De este grupo, cua-- tro patrones MM-106, MM-104, MM-111, M-25 se han usado am--- pliamente. Todos, excepto el M-25 muestran resistencia al pulgón (Ga-ner, 1953; Zeiger, 1960). Otras características mejoradas asociadas con estos patrones son, alto rendimien- to, inducción de precocidad en la floración (en algunos); ár- boles generalmente bien anclados, ausencia de hijuelos y bue- nas cualidades para la propagación.

Tabla 1.- Vigor de algunos patrones del manzano de las se-- ries EM y MM.

Patrones superenanizantes	EM-27, EM-9
Patrones enanizantes	EM-26, EM-8
Patrones semienanizantes	MM-106, EM-7
Patrones vigorizantes	EM-2, MM-111, MM-104
Patrones muy vigorizantes	EM-16, EM-25, MM-109

TABLA. 2.- ATRIBUTOS DE ALGUNOS PATRONES DEL MANZANO DE USO COMERCIAL

( Modificado de Hutchinson, 1967 )

PATRON	VIGOR	INDUCCION DE PRECOCIDAD	INDUCCION DE PRODUCTIVIDAD	PROPAGABILIDAD	INVIERNOS FRIOS	PULGON LANIGERO	TIZON DEL MANZANO	COLLAR DE LA RAIZ	Mildew sp.
EM-26	E	Bueno	Excelente	Regular	R	MS	MS	I	R
MM-106	SE	Excelente	Excelente	Bueno	S	R	I	S	S
EM-7	SE	Bueno	Bueno	Excelente	S	S	R	I	I
EM-9	E	Excelente	Excelente	Regular	S	MS	MS	R	R
MM-111	V	Pobre	Bueno	Bueno	I	R	R	R	MS

E = Enanizante, SE = Semienanizante, V = Vigorizante, S = Susceptible, R = Resistente,

I = Intermedio, MS = Muy susceptible

Es de vital importancia para el propagador que junto a las características de vigor, un portainjerto de manzano de uso comercial presente las siguientes propiedades (según Cummins, 1974):

- Resistencia a extremos climáticos, particularmente a cambios repentinos de temperatura;
- Resistencia a problemas edáficos especialmente a suelos excesivamente secos o excesivamente húmedos;
- Resistencia a enfermedades e insectos, en especial al áfido del pulgón lanífero, al collar de la raíz (Phytophthora cactorum (Leb y Cohn)), y al tizón del manzano (Erwinia amylovora (B) (Winslow));
- Anclaje suficiente y carencia de hijuelos de raíz, especialmente en suelos poco profundos;
- Inducir precocidad e incrementar la productividad.

Estas características las presentan en mayor o menor grado los patrones de las series EM y MM, lo que le da a cada uno cualidades muy particulares como se puede apreciar en la Tabla 2, en la cual los datos presentados hacen resaltar que los patrones EM-26 y MM-106, tienen características sobresalientes; ellos inducen la fructificación temprana y alta producción en el cultivar injertado, así como también son resistentes a virus latentes (Cummins, 1974).

Patrón EM-26 (EM-16 X EM-9)

Este patrón fue introducido en 1959 en la estación de East Malling, es el patrón inglés con más resistencia a los inviernos muy fríos negada para la MM-106, EM-7 y EM-9 (WILDUNG, 1973). Es éste una selección a partir de la familia EM-16 X EM-9 (RUEHLE, 1958), teniendo como sus padres una extrema sensibilidad al tizón del manzano (ROM, 1971; CUMMINS, 1972; 1973). La capacidad enanizante de este patrón hace posible plantar árboles a densidades de 450 a 700 por hectárea (HUTCHINSON, 1967). El EM-26 no enraiza bien en la cama de propagación (GARNER, 1966), aunque se ha reportado (HARTMAN, 1965), que se le propaga con facilidad por estacas de madera suave bajo niebla o por estacas de madera dura, además de que no presenta problemas de incompatibilidad.

Patrón MM-106 (Northern Spy X EM-1)

Es el más extensamente plantado en Norteamérica (MULLINS, 1972), ha sido plantado intensivamente en Australia, Nueva Zelanda, Sud-América y otras regiones donde prospera el áfido lanígero (GILLOME, 1968; FISHER, 1969; BAIR, 1971). En Inglaterra es el patrón de manzano más popular para árboles de mata y para setos bien espaciados.

Los cultivares injertados sobre el MM-106 fructifican precozmente y tienen una producción muy densa (ROGERS, 1957;

Brase, 1965; Cummins, 1972). La capacidad enanizante de este patrón puede ser perdida al injertarse algunos cultivares sobre él, ya que podría producir un árbol de tamaño normal.

En el vivero se propaga satisfactoriamente por acodo y por vareta (Garner, 1953), las raíces anclan bien y no produce hijuelos, así como también es resistente a la asfixia radicular. Su principal debilidad puede ser su susceptibilidad a la agalla de la corona. Crece bien en vivero y no es resistente a las heladas tempranas de otoño.

A pesar de sus limitantes, sus cualidades hortícolas hacen al MM-106 difícil de reemplazar (Hutchinson, 1969), y algunos consideran que es el mejor de los patrones enanizantes, por lo tanto el reemplazo tendría que ser resistente al collar de la raíz, a la agalla de la corona y al tizón del manzano (Hartman, 1980), así como también a las heladas.

Los patrones EM-26 y MM-106 inducen una entrada en producción rápida y muy productiva, por lo que debe señalarse que los portainjertos que inducen más rápidamente la producción son también aquellos que dan la mejor calidad de frutos (Lamonarca, 1978).

CAPITULO IV

## PROPAGACION ASEJUAL

### Propagación Tradicional

Los métodos tradicionales de propagación vegetativa explotan el mecanismo natural de la reproducción asexual siendo su objetivo el producir plantas uniformes de un genotipo seleccionado. El uso de varetas e injertos para este propósito, está ampliamente extendido, siendo usado el segundo método para árboles seleccionados, difíciles de enraizar, etc.

El método tradicional de propagación del manzano consiste en injertar el cultivar sobre el portainjerto, el cual, se obtiene de la planta madre mediante vareta o acodado tras dos años de desarrollo en el vivero.

### Propagación "in vitro" por Cultivo de Tejidos

El cultivo "in vitro" de plantas superiores consiste en el crecimiento bajo condiciones asépticas de embriones, semillas, órganos, tejidos, células o protoplastos en un medio de cultivo artificial.

No hace mucho tiempo, el cultivo de tejidos vegetales era considerado un proceso complejo, únicamente apropiado para la investigación básica en laboratorios extremadamente bien equipados. Afortunadamente, los avances obtenidos en

los últimos años han hecho posible la difusión de esta técnica. Existiendo hasta ahora (Murashige, 1974a) cuatro grandes áreas en las cuales es aplicable;

1.- Multiplicación clonal rápida.

(Propagación masiva de plantas selectas).

2.- Fitomejoramiento.

3.- Recuperación de clones libres de enfermedades y preservación de germoplasma valioso.

4.- Obtención de productos naturales y farmacéuticos.

#### Multiplicación clonal rápida

Así como los métodos convencionales, la micropropagación vegetativa por cultivo de tejidos "in vitro" también explota el mecanismo natural de la reproducción asexual, permitiendo además mucho mayor control y manipulación de los tejidos en desarrollo, dentro del tubo de cultivo.

Tradicionalmente una vareta da origen a una sola planta, pero millones de plantas pueden ser producidas a partir de una sola pieza vegetal por medio del cultivo de tejidos.

La técnica de propagación masiva de plantas "in vitro" se inició en los años cincuentas, cuando Morel (1960), notó que era posible por medio del cultivo del ápice vegetativo de orquídeas eliminar virosis y producir al menos, 4 millones de plantas por año por cada explante. Durante los últimos años, esta técnica aplicada a plantas superiores ha venido a ser una herramienta importante para los propagadores de

bido a que se pueden resolver con ella los siguientes problemas;

- Cuando los métodos convencionales existentes de propagación son bastante lentos y/o algunas veces no costeables;
- Cuando la propagación vegetativa tradicional no es posible;
- Cuando los fitomejoradores necesitan algunas plantas de un genotipo selecto a corto plazo;
- Cuando la producción de material vegetativo libre de patógenos (virus, bacterias, hongos, levaduras, nemátodos, etc.), es necesaria (Gillomee, 1968).

Debido a las ventajas que presenta el cultivo de tejidos para la propagación, una gran cantidad de plantas ornamentales, herbáceas, algunos árboles forestales y unos pocos frutales están siendo producidos por este método. Siendo en general el mismo principio para todos (Murashige, 1974a; 1977a; 1977b).

Para realizar la propagación masiva "in vitro" han sido usadas como explante (porción de planta que se usa para iniciar el cultivo) casi todas las partes de la planta; meristemos apicales, primordios foliares, yemas, segmentos de tallo, raíces, órganos de almacén, pecíolos, hipocótilos, órganos florales, etc.; encontrándose una en particular (dependiendo de la especie), que responde mejor para estos fines.

Es de gran importancia para asegurar el éxito del cultivo "in vitro" seleccionar la parte de la planta que nos va a servir como explante, tomando en consideración la fuente (órgano), la edad del órgano, estación en la cual esta siendo obtenido, tamaño del mismo y sobre todo la calidad de la planta de la cual, será tomado (Murashige, 1974b). Habiendo ya seleccionado las características del tejido, la multiplicación puede ser llevada a cabo por medio de una provisión apropiada de dos grupos de hormonas; básicamente citocininas y auxinas. Es común agregar sustancias auxiliares para aumentar la efectividad del balance hormonal como; fosfatos inorgánicos (Murashige, 1974b), aminoácidos (Huang, 1976), compuestos fenólicos (Gur, 1968; Jones, 1976a), etc.

El proceso de multiplicación puede involucrar embriogénesis somática, crecimiento de los brotes axilares o la formación de brotes adventicios, pudiéndose originar estos últimos y los embriones somáticos a partir de callo (conjunto de células indiferenciadas), (Abbot, 1978).

Con gran cantidad de plantas han sido requeridas muchas investigaciones para evaluar las necesidades nutritivas del medio, ya que muchos cultivos de tejidos no han sido capaces de responder, debido a que sus requerimientos nutricionales difieren de los suplidos a el medio. Por otra parte, aunque haya una provisión nutricional completa, han fallado las respuestas del tejido para la proliferación debido al desconocimiento de las condiciones físicas ideales como: luz (intensidad, calidad, duración), temperatura, consistencia líquida o

sólida del medio, etc. Aunque se considera que son dos factores en particular los que definen el éxito o el fracaso del cultivo: el origen del explante y el medio de cultivo (Gamborg, 1976).

El tejido que ha proporcionado mejores resultados para propagar árboles frutales ha sido obtenido de los meristemas y ápices de brote (Fig. 2), debido a que se mantiene la organización normal del brote diferenciado y el riesgo de la proliferación de células mutantes que presenta la propagación a partir de callo, está casi eliminado (Abbot, 1978).

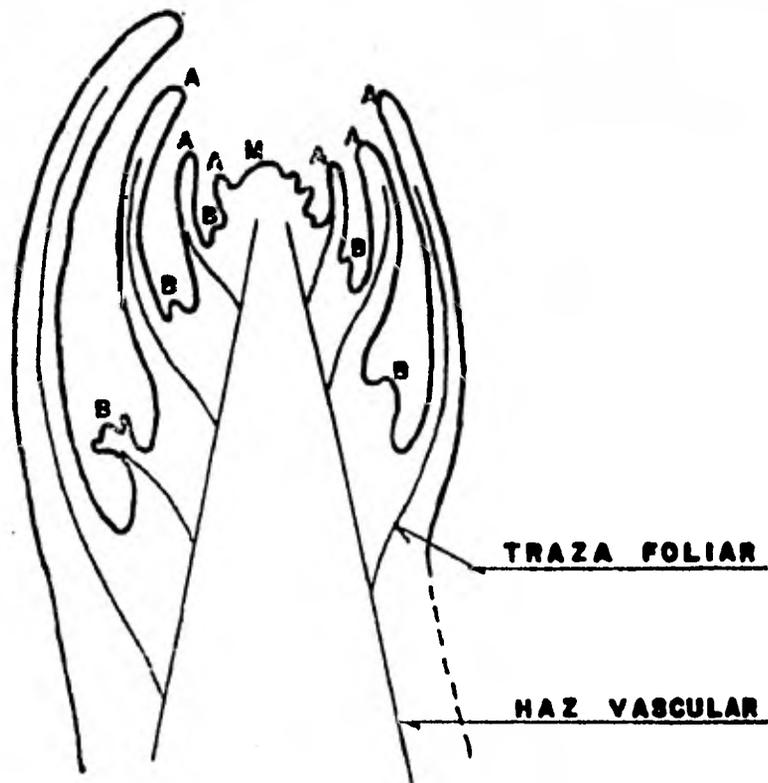
#### Rutas de propagación "in vitro" de árboles frutales

Existen dos rutas principales que pueden ser seguidas en el cultivo de tejidos y que conducen a la multiplicación y regeneración de árboles. Una es directa (misma que seguiremos en este trabajo), la cual mantiene los elementos organizados de la planta madre, y la otra es indirecta, vía diferenciación de callo y células en suspensión, como se esquematiza en la Figura 3.

El método de cultivo de tejidos "in vitro" por la vía directa para la propagación clonal, generalmente consiste de la secuencia siguiente:

I.- Establecimiento del cultivo aséptico;

(A partir de tejido fresco e implica la adaptación de éste a las condiciones "in vitro").



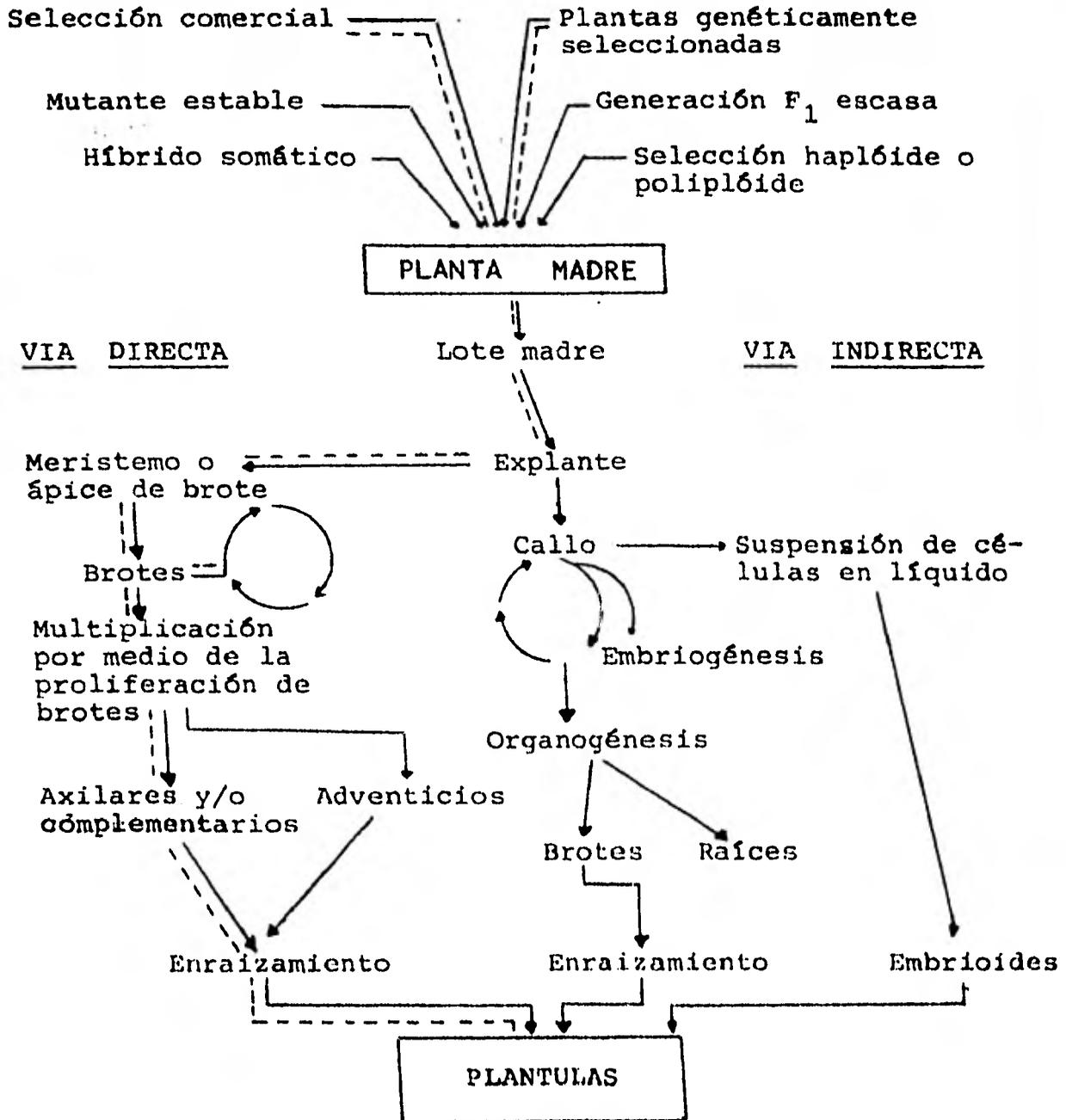
M = Meristemo

A = Primordio foliar

B = Yema axilar .

Figura 2 .- SECCION LONGITUDINAL DE UN APICE DE BROTE , EN EL CUAL SE ESQUEMATIZAN LAS YEMAS AXILARES QUE VAN A DAR ORIGEN POSTERIORMENTE A BROTES LATERALES.

Figura. 3 .- RUTAS DE MULTIPLICACION Y REGENERACION DE ARBOLES, EN EL CULTIVO DE TEJIDOS. (Modificado de Abbot, 1978)



----- Ruta seguida en este trabajo .

- II.- Multiplicación del propágulo;  
(Fase en la cual se induce un rápido incremento de órganos y otras estructuras)
- III.- Elongación de los vástagos;  
(Adquisición de mayor tamaño)
- IV.- Inducción de sistema radicular;  
(Formación de raíces en los vástagos individualizados para así formar plantas completas)
- V.- Paso a invernadero;  
(Implica la conversión de la planta heterótrofa a autótrofa y su adaptación a condiciones medio ambientales).

### Cultivo de Tejidos del Manzano

#### Antecedentes

Un gran número de investigadores han reportado experimentos en los cuales se han cultivado ápices de brote de manzano, en general con pocos resultados en la producción de plantas y sin obtener multiplicación en el cultivo, para incrementar el número de éstas.

En los inicios de las investigaciones, Jones (1967), demostró que la 6-Bencil-amino purina (BAP), aumenta el crecimiento del cultivo de brotes del patrón EM-26, así como también Pieniazek (1968), demostró un efecto similar en ápices aislados de plántulas. En ambos reportes la formación esporádica de raíces no aportó beneficio aparente a los brotes.

Más recientemente Dutcher (1972), cultivando yemas axilares con un fragmento de tallo obtuvo menos del 1% de los cultivos con raíces donde la BAP tuvo un papel inhibitorio en el crecimiento de los brotes. Sin embargo, Walkey en 1972 usando también material de plántulas observó inducción del sistema radicular en el 50% de los cultivos después de 20 semanas. Más tarde, Elliot (1972), reportó por primera vez la producción de plántulas y demostró que mientras la BAP o la Zeatina aumentaban el crecimiento de los brotes, otros tratamientos con auxinas y giberelinas fracasaron en la inducción de raíces. Posteriormente Abbot (1976), citó un método en el cual fueron obtenidas grandes cantidades de brotes a partir de un sólo ápice, los cuales ya pudieron ser enraizados. Jones (1976a; 1976b), estudió el efecto de los compuestos fenólicos; floridzin y floroglucinol (presentes en la savia xilemática del manzano), en el cultivo de ápices; él mismo en 1977, logró un método efectivo para la multiplicación de plantas del manzano.

Hasta ahora se han seguido haciendo estudios en algunos países del mundo para lograr la propagación de algunos patrones e injertos (De Paoli, 1979; Morini, 1979; Standardi, 1979; Jones, 1979a; 1979b; 1980; Werner, 1980).

Cabe señalar que conjuntamente a los trabajos anteriormente descritos, otros autores (Messer, 1969; Elliot, 1972; Quoirin, 1974; Milewska, 1977; Singha, 1978; etc.) han afrontado problemas del cultivo de tejidos de este frutal sobre muy diversos aspectos como eliminación de virus, regeneración

de callo, influencia de la luz, reguladores de crecimiento,  
medios nutritivos, etc.

C A P I T U L O   V

## M A T E R I A L   Y   M E T O D O

### Obtención del Cultivo Aséptico

El primer obstáculo que se presenta para poder multiplicar "in vitro" cualquier planta, es el obtener el cultivo aséptico. Este paso es tan definitivo, que si no hay asepsia del tejido no hay cultivo.

#### Material biológico

Varetas de madera dura de un año\*, defoliadas naturalmente y despuntadas, de los portainjertos EM-26 y MM-106. Lavadas en agua corriente, desinfectadas con hipoclorito de sodio al 3% y puestas en bolsas de plástico con papel secante húmedo, permaneciendo así en refrigeración constante ( $4 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ), hasta ser usadas.

Debido a que las varetas antes de ser colectadas estuvieron expuestas a los patógenos (hongos, bacterias, etc.), del medio ambiente durante un año, éstos se introdujeron y acumularon entre las escamas imbricadas de las yemas vegetativas, haciendo así, difícil la asepsia del tejido, por lo que se realizaron diferentes pruebas para lograr ésta (Tabla 3). En estas pruebas se variaron tanto las características

\* Proporcionadas por el Centro de Desarrollo Frutícola de la CONAFRUT, Cd. Guerrero, Chihuahua.

físicas del explante (microvaretas (2-3 cm) completas o careciendo de alguna de sus partes), el estado fisiológico del mismo (yema vegetativa o ápice de brote en crecimiento activo), los agentes esterilizantes; sus concentraciones y tiempo de exposición, el uso de fungicidas y bactericidas (Tabla 3), etc.; llegando como resultado al siguiente método, el cual nos aseguró un 100% de explantes asépticos :

- 1) Tomar brotes laterales en estado juvenil de 2 a 8cm de longitud (Fig. 4 y 5), en crecimiento activo y hechos brotar en un ambiente semi-aséptico. Estos provenientes de varetas de madera dura (Fig. 6 y 7) con su base en medio nutritivo líquido de Murashige-Skoog (MS);
- 2) Colocar los brotes en etanol al 70% durante 5 minutos;
- 3) Transferirlos a una solución de hipoclorito de so-dio o cloro comercial 0.5% de cloro activo durante 15 minutos;
- 4) Lavar los brotes tres veces con agua destilada estéril para remover los residuos de los agentes esterilizantes;
- 5) Quitar el exceso de agua con papel filtro estéril;
- 6) Separar las hojas dañadas y cortar la base del brote (Fig. 8);
- 7) Sembrar inmediatamente.

Este procedimiento de esterilización evita una estancia "in vitro" durante un día , recomendada por Jones (1977), antes







**Fig. 4 .-** Brotes utilizados para la iniciación del cultivo.



**Fig. 5 .-** Aspecto de un brote antes de la esterilización.

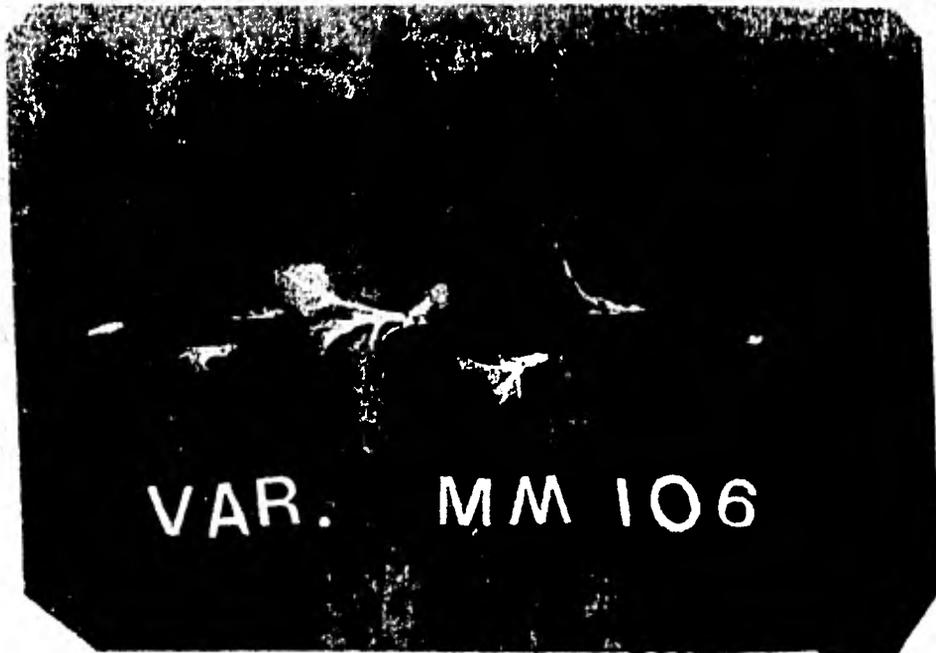


Fig. 6 .- Desarrollo de brotes provenientes de yemas axilares del patrón MM-106.

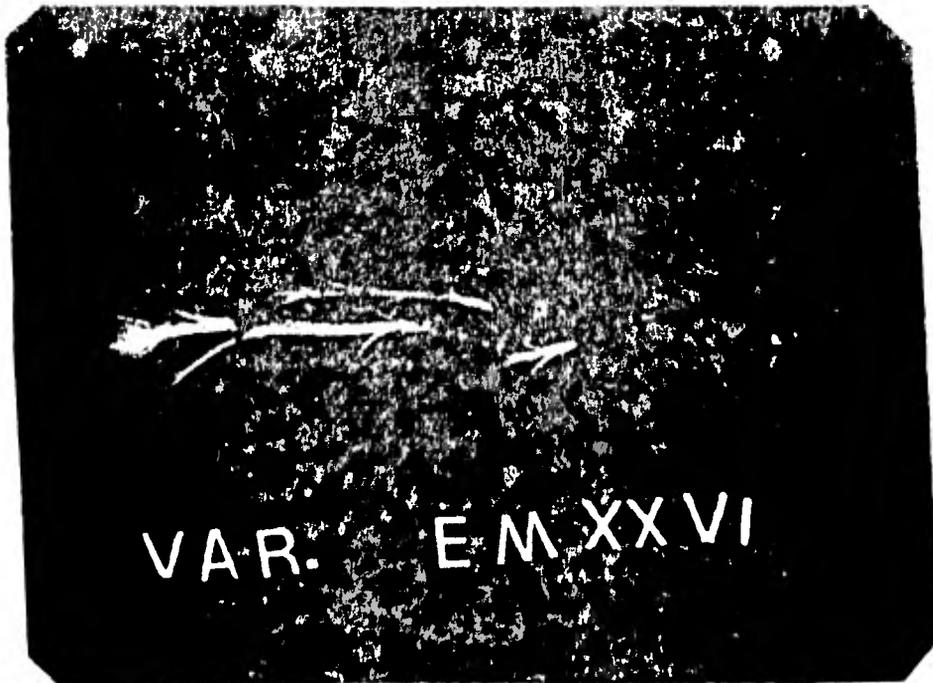


Fig. 7 .- Vareta de madera dura del patrón EM-26 con brotes laterales y yemas axilares.

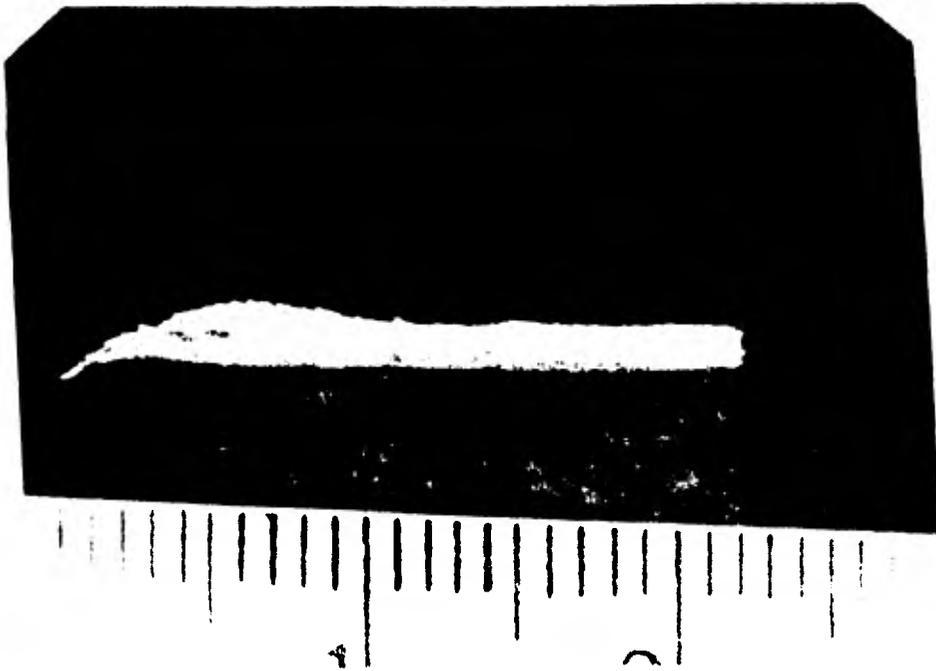


Fig. 6 .- Aspecto de un brote esterilizado.

de la esterilización definitiva lo que implica un ahorro de trabajo, material y tiempo, y da la posibilidad de usar como explante, tejido recolectado directamente del campo.

### Medios de Cultivo

Se probaron dos medios minerales diferentes, usándose como base los macronutrientes de Murashige-Skoog (MS) (Murashige, 1962), y los de Knop (K) (citado por Jones, 1967) siendo éste último, un medio relativamente pobre en estas sales minerales en comparación con el primero (Tabla 4). A estos dos medios, se les añadieron los micronutrientes de Murashige, adicionándoseles también las vitaminas reportadas por Jones (1977) para el manzano, sacarosa y sustancias auxiliares en el crecimiento y desarrollo (ácido ascórbico, floroglucinol (Jones, 1976a; 1976b)), así como diferentes balances hormonales, los cuales variaron según la fase en la que se encontrara el tejido (Fig. 9).

La hormona utilizada como citocinina fue la  $N_6$ -Benciladenina (BA) Q.P. (Nutritional Biochemical Corp.), como auxina el Acido indol-3-butírico (AIB) Q.P. (Sigma Chemical Co.), y el Acido giberélico ( $GA_3$ ) como giborelina, siendo utilizado como agente gelificante agar-agar.

Todas las sales minerales, vitaminas y agentes auxiliares, se disolvieron en agua destilada. La BA fue disuelta en etanol absoluto y ácido clorhídrico 1.0 N. El AIB y el  $GA_3$ , fueron disueltos en etanol absoluto.

Tabla. 4.- CONSTITUYENTES DE LOS MEDIOS MS Y K.

M E D I O	I	II
<b>Macronutrientes</b>		
(gr/l)	M S	K
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1.65	0.0
KNO <sub>3</sub>	1.90	0.115
Ca Cl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0.444	0.0
Mg SO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0.370	0.125
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.170	0.125
Ca (NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	0.0	0.347
<b>Micronutrientes</b>		
(mg/l)	M S	K
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6.2	6.2
Mn SO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O	22.3	22.3
Zn SO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O	8.6	8.6
KI	0.83	0.83
Na Mo O <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0.25	0.25
Cu SO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0.025	0.025
Co Cl.6H <sub>2</sub> O	0.025	0.025

Continúa

Tabla. 4 .- Continuación.

Vitaminas

(mg/l)	M S	K
Tiamina.HCl	0.4	0.4
Myo-inositol	100.0	100.0
Acido ascórbico	10.0	10.0

Otros constituyentes

Fe EDTA	20.0 mg/l	20.0 mg/l
Floroglucinol	162.0 mg/l	162.0 mg/l
Sacarosa	30.0 gr/l	30.0 gr/l
Agar-agar	7.0 gr/l	7.0 gr/l

Hormonas

Citocinina (BA)	Concentraciones variables
Auxina (AIB)	según el estadio.
Giberelina (GA <sub>3</sub> )	(ver figura 5)

El hierro ( $\text{Fe SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ), se añadió al medio con  $\text{Na}_2$  EDTA (etilen diamino tetraacetato de sodio), en forma de quelato.

Se ajustó el pH a 5.2 con KOH 0.1 N y HCl 1.0 N, antes de agregar el agar-agar purificado (Merck Co.).

El IBA y el floroglucinol (1:3:5, trihidroxi benceno) fueron esterilizados a través de filtros Millipore (0.45- $\mu\text{m}$  Millipore filters Corp.), y fueron añadidos a los demás componentes previamente esterilizados en autoclave a  $115^\circ\text{C}$  y  $1.5 \text{ kg/cm}^2$  de presión, durante 15 minutos.

El medio nutritivo completo fue vaciado a frascos de vidrio (100 ml), los cuales contenían de 20 a 30 ml de éste.

### Cultivo

Fase de adaptación del tejido a las condiciones "in vitro".

Apices de 5.0 a 20.0 mm de longitud (Fig. 8) de brotes esterilizados previamente de los patrones EM-26 y MM-106, fueron disectados y colocados (uno por frasco), en los medios MS y K, los cuales se pusieron en una cámara de crecimiento bajo condiciones ambientales controladas de intensidad luminosa ( $3,000 \pm 400 \text{ Lux}$  (Standardi, 1979)), obtenida de focos vita-lite (Duro-Test) de 40 watts, fotoperíodo (16 horas de luz por 8 de oscuridad), y temperatura ( $27 \pm 2^\circ\text{C}$ ).

En esta etapa se probaron gradientes hormonales (Fig. 9) de BA (0.0-1.0 mg/l) y AIB (0.0-1.0 mg/l) manteniéndose el

GA<sub>3</sub> constante (0.1 mg/l), en todos los medios. Se hicieron 25 repeticiones por concentración. Llevándose a cabo la siembra y las resiembras posteriores (cada 3 semanas), en una cámara de flujo laminar.

### Fase de proliferación de brotes

En esta fase, sólo se utilizaron los ápices de brote que dieron la mejor respuesta en la fase de adaptación, tomando como criterio su desarrollo, vigor y buena apariencia (similar a la de una plántula de semilla).

El medio K, se descartó de éste estadio debido a la mala apariencia (clorosis, necrosis), a las malformaciones (protuberancias) y en general a la pobre respuesta que presentaron los brotes de ambos patrones colocados en él. Por lo tanto, para esta fase, únicamente se utilizó el medio MS en el cual se variaron los balances hormonales (Fig. 9), incrementándose la citocinina para inducir una mayor proliferación (Pieniazek, 1966a) y reduciéndose la auxina para evitar la inhibición de los brotes, profusión de callo y malformaciones que fueron observadas en la fase de adaptación.

Los nuevos vástagos obtenidos se separaron (en grupos de 3 a 5) y traspasaron a medio nuevo cada 3 semanas, eliminando tejido viejo, necrosado y proliferaciones de callo.

### Fase de elongación

En este estadio se individualizaron y colocaron todos los vástagos de ambos patrones en el medio MS. Se anuló tanto la citocinina como la auxina con el objeto de estandarizar las condiciones hormonales de todos los vástagos y predisponer a los brotes para un enraizamiento más rápido y uniforme (De Paoli, 1979). Por otro lado, se aumentó la giberelina a 0.4 mg/l, para inducir una mayor longitud.

El pH se aumentó de 5.2 a 5.6 debido a que después de la esterilización el pH era menor a 5.0 .

Los brotes permanecieron en este medio 26 días.

### Fase de enraizamiento

Para esta fase se usaron los brotes provenientes del medio de elongación los cuales, se colocaron en el medio MS y en el medio K usándose éste de nuevo debido a que algunos autores (Werner, 1980) han reportado mejores resultados en la inducción de sistema radicular, con un medio conteniendo una cantidad reducida de sales minerales.

En ambos medios, se probaron concentraciones de AIB de 0.0-3.0 mg/l (con 10 repeticiones (de 10 brotes cada una) por concentración para el EM-26 y para el MM-106, 10 repeticiones con 5 brotes cada una), para favorecer la inducción de rafces (Liu Shih-feng, 1978; Jones, 1979; Werner, 1980).

La BA fue eliminada de esta fase (Fig. 9) debido a que

su presencia en mínimas cantidades inhibe el enraizamiento (Thorpe, 1979). Para este estadio, se restableció la concentración de  $GA_3$  a 0.1 mg/l . Siendo el pH=5.6 y las condiciones ambientales las mismas de las etapas anteriores.

FIGURA. 9. GRADIENTES DE BA Y DE AIB ;  
PROBADOS EN LAS DIFERENTES FASES.

BA \ IBA	1	0.0	0.2	0.4	0.5	0.8	1.0
1							
0.0							
0.1							
0.2							
0.5							
0.8							
1.0							

Fase de adaptación

1 = mg/l

BA \ IBA	1	1.0	1.5	2.0	2.5	3.0
1						
0.01						
0.1						

Fase de multiplicación.

1 = mg/l

IBA \ BA	1	0.0	0.5	1.0	2.0	3.0
0.0						

Fase de enraizamiento.

1 = mg/l

C A P I T U L O V I

## RESULTADOS Y DISCUSION

### Esterilización

El primer obstáculo que se presentó para el establecimiento del cultivo, fue el obtener la asepsia del tejido, ya que las varetas que se utilizaron, estaban inevitablemente contaminadas con un amplio rango de microorganismos, debido a la retención de contaminantes viables en las yemas vegetativas, las cuales al ser sembradas "in vitro" y puestas en contacto con el medio nutritivo que contenía una fuente de carbono (sacarosa), llevó a una rápida proliferación de los contaminantes, lo cual afectó seriamente el crecimiento del cultivo, y que además de competir con el tejido por los nutrientes (en caso de no ser patógenos), desprendían sustancias que influyeron de una u otra forma sobre el éxito del cultivo. Algunos autores, han citado esta dificultad (Dutcher, 1972; Quoirin, 1974; Abbot, 1976; Zuccherelli, 1979), la cual fue resuelta sembrando meristemas; procedimiento lento y difícil. Otros, lo resolvieron manteniendo a la planta madre desde su origen, en invernaderos con estrictos controles fitosanitarios (Abbot, 1976; Jones, 1979a). En nuestro caso, por carecer de experiencia en el manejo de meristemas, y debido a que se tenía únicamente material proveniente del campo, vimos la necesidad de establecer una metodología de

esterilización efectiva (Tabla 3).

Inicialmente se trataron de esterilizar microvaretas (sección de vareta (2-3 cm) con una yema vegetativa), pero fue imposible, a causa de la presencia persistente de hongos y bacterias, así como también, al desprendimiento de sustancias autotóxicas por el tejido (debido éste, a un deterioro precóz de las células y órganos cultivados, provocado por las heridas causadas por el corte, aunado al daño ocasionado por los agentes esterilizantes). Estas sustancias se ponían de manifiesto por dar una coloración amarillenta o café al medio nutritivo, originalmente blanco.

Al hacer el análisis al microscopio de las yemas vegetativas contaminadas, se observó que la fuente de contaminación estaba en las escamas, las cuales debido a su colocación imbricada, permitieron la acumulación de partículas de polvo y tierra entre ellas, impidiendo así el acceso de los desinfectantes. Por esta circunstancia, se disectaron las escamas de las yemas, para eliminar la fuente de contaminación, dejando casi descubierto al meristemo (protegido únicamente por unas pocas hojas y primordios foliares), el cual no resistió el proceso de esterilización debido a la penetración y al contacto directo del alcohol e hipoclorito, por lo que éste tampoco resultó ser un método eficaz.

Ocasionalmente, se emplearon antibiótico y fungicidas, siendo éstos poco efectivos y además peligrosos, por que un antibiótico o fungicida por sí mismo, puede influenciar --

el crecimiento del tejido en cultivo.

Con estas perspectivas de sensibilidad del meristemo a los agentes desinfectantes y viendo la imposibilidad de la esterilización de las yemas vegetativas completas, se decidió obtener brotes laterales a partir de las yemas axilares, en un ambiente semi-aséptico (campana de vidrio), lo cual eliminó el problema de la presencia de las escamas contaminadas, dando así origen, a brotes parcialmente asépticos y resistentes a los agentes esterilizantes, los cuales resultaron ser el material idóneo para establecer el cultivo.

Considerando que no se hicieron cultivos a partir de meristemo, ni tampoco se aplicaron pruebas fitopatológicas para detectar y eliminar microbios sistémicos, la manifestación negativa de éstos en el medio de cultivo, no nos indica que las plantas obtenidas sean libres de patógenos. Aunando a esto el hecho de que se ha reportado que el floroglucinol añadido al medio, ejerce una acción bacteriostática (Jones, 1976a; 1976b), por lo que las posibles bacterias sistémicas que estuvieran presentes, no se manifestaron en los cultivos.

#### Fase de Adaptación

Como uno de los objetivos principales fue el obtener plantas iguales a sus progenitores (clonación) de ambos portainjertos, seguimos para llegar a éste, la multiplicación por la vía directa (Fig. 3), que es por medio de la inducción de brotes axilares y/o complementarios, tratando de evi

tar el origen de brotes adventicios, por que la formación de plantas aberrantes es más frecuente cuando la multiplicación es obtenida de la formación de estos últimos (Murashige, 1974b), siendo aún mayor la incidencia cuando una pequeña cantidad de callo precede a su formación, a consecuencia de la inestabilidad cromosómica que acompaña a la división celular en el callo (Nuty, 1979). Por otra parte, no se seleccionó la vía indirecta por que las plantas obtenidas por ésta, no han sido idénticas a sus progenitores (Abbot, 1978), así como también, se han encontrado en ellas todos los estados de ploidías y aneuploidías (Whyteley, 1977, citado por Abbot, 1978).

En esta fase de adaptación fue de vital importancia que el explante tuviera la capacidad de transformar su característica autótrofa a heterótrofa, para así poder aprovechar las sustancias nutritivas y hormonales que le proporcionó el medio, ya que es sabido que el éxito de cultivo de tejidos depende grandemente de éste (Gamborg, 1976; Abbot, 1977), o sea, que la falta de respuesta y adaptación del tejido en cultivo, dependió más en este caso del equilibrio nutritivo y hormonal suministrado, que de los factores intrínsecos de nuestro material biológico, ya que los explantes usados fueron obtenidos del mismo lote de varetas de patrones clonales, los cuales estuvieron en el campo bajo las mismas condiciones climáticas, edáficas y bióticas. Atribuyéndole por esto, sólo al medio nutritivo y a la concentración hormonal, las diferentes respuestas obtenidas en estas pruebas.

Esta etapa de adaptación a las condiciones "in vitro", fue crítica para nuestra explante, debido que al extraerlo de su ambiente natural y colocarlo en condiciones artificiales dentro del frasco de cultivo, estuvo sometido a alteraciones fisiológicas, las cuales afectaron sus funciones normales, mismas que tuvieron que ser readaptadas por el tejido para poder subsistir en un medio con características (balances hormonales, concentraciones salinas, luz (calidad, intensidad, duración), temperatura, humedad relativa, etc.), que diferían en una u otra forma a las condiciones naturales, viéndose afectado éste en mayor o menor grado en sus procesos vitales como: fotosíntesis, absorción de agua, sales minerales y gases; asimilación, tasa de movimiento de nutrientes; transpiración, permeabilidad de membranas, etc., hecho que explica la dificultad de encontrar las condiciones óptimas para la adaptación y desarrollo del tejido, ya que éstas tienen que ser lo más similar posible a las naturales, para llegar a obtener los mejores resultados.

El medio mineral MS que empleamos, contiene las cantidades correctas y la proporción de nutrientes inorgánicos, para satisfacer las necesidades nutricionales y fisiológicas de las células vegetales, por que en general, ha dado buenos resultados para el manzano y muchas otras especies más, al permitir que éstas vivan y se reproduzcan en él. Hecho que fue corroborado con nuestros resultados, al darnos la mejor respuesta de adaptación de ambos patrones, ya que en él, se mantuvieron los explantes vivos, con una morfología normal y

sin deficiencias conspicuas (Fig. 10) durante esta fase que duró 70 días. En cambio, en el medio nutritivo de Knop, se observó el tejido con una clorosis generalizada, una coloración rojiza en los peciolo y venas de las hojas; deformaciones (protuberancias en el tallo) muy notorias, enrollamiento y lignificación bastante marcada en las hojas, así como también necrosis en algunas zonas (Fig. 11), presentandose estos efectos independientemente de la concentración hormonal suministrada. Es obvio, que si las diferencias entre el medio MS y K radicarón en los macroelementos (Tabla 4), los transtornos causados en este último, fueron debidos a deficiencias de alguno o algunos de estos minerales, siendo la más posible la del nitrógeno, ya que su deficiencia se manifiesta regularmente con una clorosis y por la presencia de una coloración roja en las hojas más jóvenes, localizada en las nervaduras y bases de las hojas (Bidwell, 1979), debidos a que su presencia en cantidades insuficientes, permite la degradación de clorofila (clorosis), de proteínas y de ciertos componentes del RNA, así como también, se ve impedida la síntesis de aminoácidos y nucleótidos (Ritcher, 1972).

La diferencia en el contenido de nitrógeno entre ambos medios es muy notoria, ya que el medio K contenía únicamente 4.0 mM\* de  $\text{NO}_3^-$ , en comparación con el medio MS, cuyo contenido fue de 38.8 mM del mismo ion, sumado a 20.0 mM de  $\text{NH}_4^+$  (Tabla 5). Por otra parte, está también involucrado el efecto que pudieron ejercer reducidas cantidades de potasio y

\* milimoles



Fig. 10 .- Aspecto general de un explante colocado en el medio MS .



Fig. 11 .- Brote con síntomas de deficiencias nutricionales provocados en el medio de Knop.

Tabla 5 .- CONTENIDO DE MACROELEMENTOS DE LOS  
MEDIOS MS Y K .

Ion	Medio MS	Medio K
$\text{NH}_4^+$	20.0 mM <sup>1</sup>	0.0
$\text{NO}_3^-$	38.8 mM	4.0 mM
$\text{SO}_4^-$	1.5 mM	0.5 mM
$\text{PO}_4^-$	1.3 mM	0.92 mM
$\text{K}^+$	20.1 mM	1.92 mM
$\text{Mg}^+$	1.5 mM	0.5 mM
$\text{Ca}^+$	4.0 mM	1.5 mM

1 = milimoles

magnesio, ya que un suministro pobre o la ausencia de éstos pueden provocar síntomas muy similares a las deficiencias del nitrógeno (clorosis, aparición de pigmentos accesorios, etc.), ya que éstos actúan como constituyentes o activadores de proteínas y enzimas, enmascarando sus efectos entre sí.

El uso de los tres grupos hormonales (citocininas, auxinas y giberelinas), se debió al conocimiento de que en la savia del manzano existen en forma natural (Bottomley, 1963; Powell, 1964; Jones, 1965; Luckwill, 1968; Letham, 1969) y que estos interactúan para regular básicamente su división, alargamiento y diferenciación celular (Pieniazek, 1966a; Letham, 1967), aunado a el hecho de que las yemas axilares del manzano inician su crecimiento en respuesta a las citocininas exógenas (Powell, 1973) y que cantidades de auxinas comúnmente actúan en la morfogénesis (Abbot, 1973), indican que estas son también uno de los factores limitantes en la adaptación y desarrollo del explante, efecto que observamos en el grado de respuesta de los brotes, el cual estuvo íntimamente relacionado con el balance entre estos dos grupos hormonales, dándonos como resultado que los brotes mejor adaptados y más sanos de ambos patrones, fueron encontrados en un 80% en los balances altos de citocininas (0.8-1.0 mg/l) y bajos en auxinas (0.0-0.1 mg/l), disminuyendo este efecto favorable conforme se reducía la BA y se aumentaba el AIB, originando en las concentraciones altas de auxinas (0.5-1.0 mg/l), grandes proliferaciones de tejido indiferenciado (callo) en los meristemas (apicales y axilares) y base de los

brotos (Fig. 12), perdiendo por ésto el brote su morfología normal y su capacidad de respuesta para nuestros fines.

Esta fase de adaptación duró un promedio de 70 días, en los cuales no hubo mayores cambios en los brotes, más que el desarrollo y muerte posterior de las hojas más viejas (Fig. 13). Dándose por adaptado el tejido y por lo tanto terminado este periodo, cuando el meristemo apical se desarrollaba dando lugar a un crecimiento muy claro (Figs. 14 y 15) de una longitud mayor a 10 mm.

#### Fase de Multiplicación

Durante este tiempo, los brotes de ambos portainjertos se multiplicaron constantemente, en proporciones determinadas principalmente por las características intrínsecas de cada patrón, seguido por la concentración de citocinina suministrada y por último al efecto de la auxina presente.

Las respuestas que se dieron fueron muy variadas, pero en general dando origen a una proliferación o multiplicación de brotes. Multiplicación que se dió en respuesta a las interacciones hormonales entre las citocininas y auxinas, auxiliadas por la giberelina presente. Determinando estas tres, el desarrollo del tejido bajo los efectos siguientes:

- a) Ruptura de la dominancia apical;
- b) Anulación del estado de reposo de las yemas;
- c) Ruptura de la inhibición correlativa causada por los



Fig. 12 .- Proliferación de tejido indiferenciado

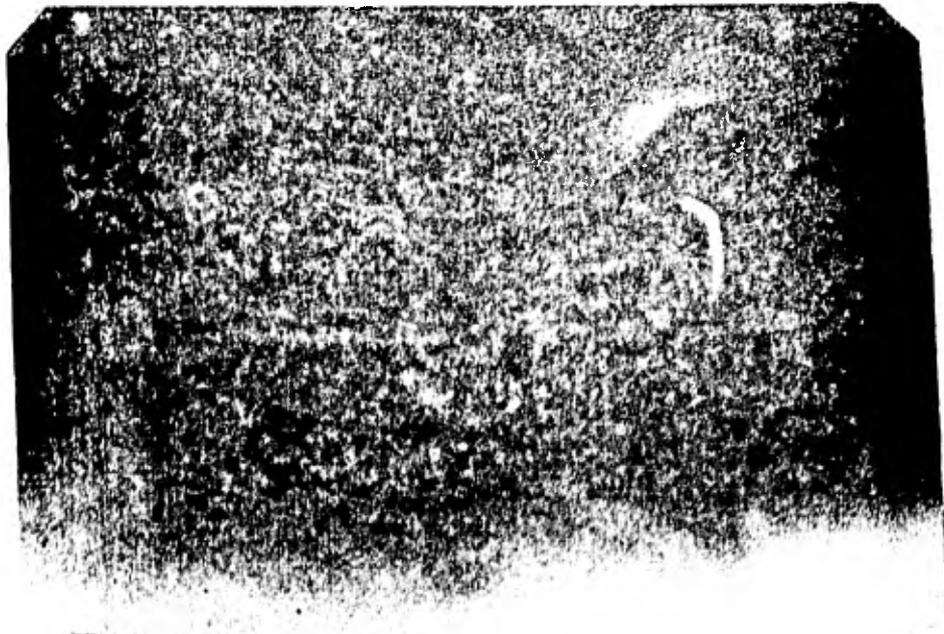


Fig. 13 .- Fosa de adaptación.

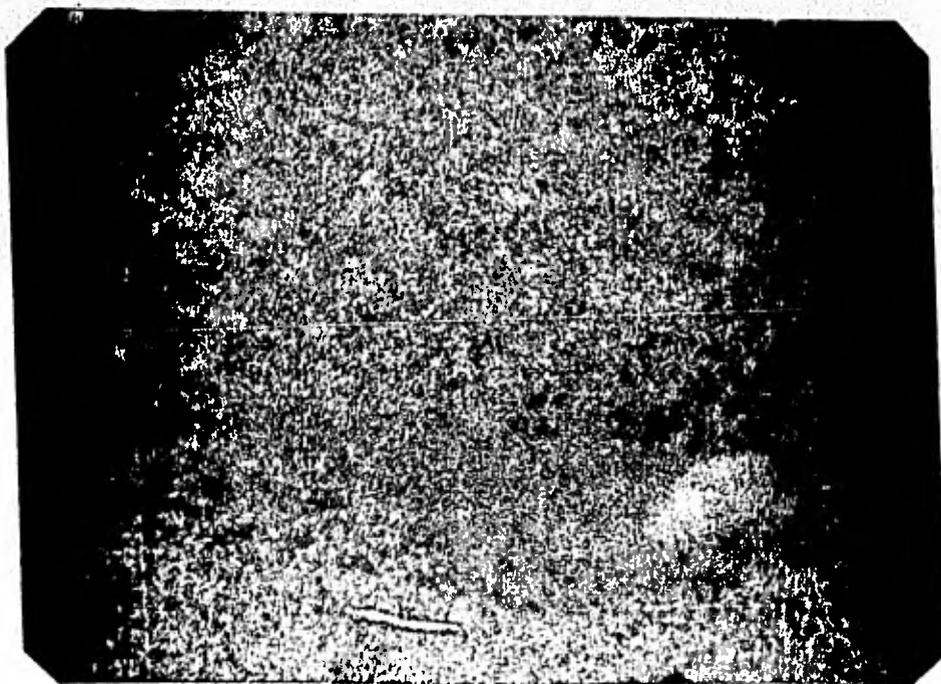


Fig. 14 .- Crecimiento de un brote adaptado a las condiciones "in vitro".



Fig. 15 .- Brote en crecimiento activo.

- órganos más cercanos;
- d) Organogénesis acelerada e incremento rápido de masa y volumen;
  - e) Aceleración de los ritmos metabólicos y fisiológicos normales.

Estos efectos se manifestaron constantemente en ambos portainjertos, durante su estancia en esta fase.

En sí la multiplicación obtenida por este método, fue la manifestación del efecto incrementado de la citocinina principalmente, ya que en el manzano, tienen éstas un papel determinante en el crecimiento (Jones, 1973), en la revocación de la dominancia apical y en la prevención del estado de reposo de las yemas (Williams, 1971), ya que la BA suplida a través de los pecíolos estimula el crecimiento de las yemas (Pieniazek, 1964; 1965; Williams, 1971) así como también, es capaz de romper la dormancia y eliminar la inhibición correlativa (Pieniazek, 1966) en las yemas, aunado a que este efecto es transmitido tanto acropétala como basipétalmente en el árbol (Pieniazek, 1965).

Por otra parte, la adición de las citocininas al medio de cultivo "in vitro", promueve el crecimiento de los brotes del manzano (Jones, 1967; Dutcher, 1972), y ayuda a prevenir la tendencia de los cultivos a irse a la dormancia, lo cual hace posible la multiplicación en cualquier época del año.

Con respecto al efecto de las auxinas agregadas al medio, sabemos que su acción inhibitoria es contrarrestada en

el manzano por las citocininas (Van Overbeck, 1967), y que a demás, en altas concentraciones tienden a inducir al brote a la formación y proliferación de gran cantidad de células pa-renquimatosas (Pieniazek, 1976b) y por este efecto cuando es tán presentes en cantidades elevadas inhiben la morfogénesis "in vitro" (Abbot, 1978), pero ejercen sin duda alguna un papel sinérgico con las citocininas, en la formación de órganos (Thorpe, 1979).

Así también, tenemos el papel combinado que juega con estos dos grupos hormonales y por sí mismas, aunque sea en menor proporción, las giberelinas. Las cuales, se ha comprobado que junto a las citocininas permiten a los brotes elon-garse a partir de las yemas (Williams, 1970), ya que por sí solas tienen el efecto de antagonizar al Acido abscísico en la inducción de la dormancia (Bidwell, 1980). Además de que este grupo hormonal ejerce una influencia significativa en los niveles de auxina y en los procesos de crecimiento a través de su efecto en la síntesis de esta hormona en el tejido (Valdovinos, 1967).

Por lo anteriormente dicho y por las interacciones mu--tuas y particulares de las hormonas que empleamos, sabemos que las tres ejercieron un efecto ordenador y regulador del crecimiento y desarrollo en el tejido, dándonos como resultado de sus interacciones el balance hormonal que indujo una mejor respuesta en la formación de mayor número de brotes para cada uno de los patrones.

Patrón EM-26

Como se puede apreciar en la Tabla 6, encontramos que en el medio con 0.1 mg/l de AIB, la mayor productividad la indujo la concentración de 1.0 mg/l de BA, obteniéndose un incremento de 2.19 brotes por día. Las demás concentraciones de citocinina, tuvieron una acción disminuida, dando en casi todos los casos incrementos diarios menores a la unidad.

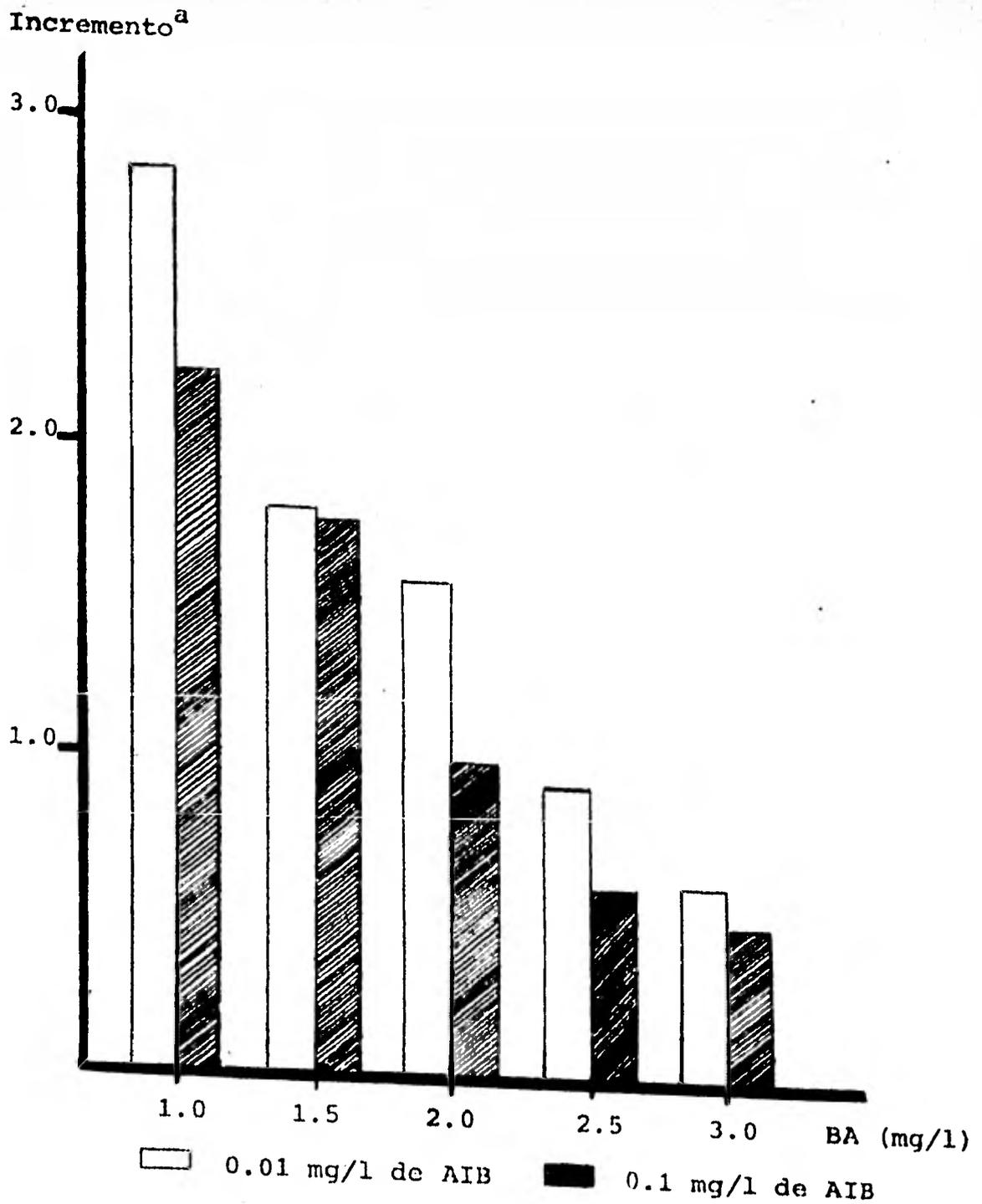
Con respecto al número de brotes totales producidos, se encontraron grandes diferencias, ya que en la concentración menor de BA (1.0 mg/l), el número es mucho mayor (147 brotes), y en las concentraciones más altas probadas es de únicamente 34. Este hecho nos indica que mientras mayor sea la cantidad de citocinina suministrada, la proliferación (productividad) va disminuyendo.

Claramente se observó que la presencia de auxinas, aunque sea en mínimas cantidades influye en la multiplicación de brotes, ya que como se puede ver claramente en la Fig. 15a la presencia de cantidades mayores de AIB, ejercen un efecto regulador en la cantidad de brotes producidos, retrasando o reprimiendo su formación, sin poder ser sobrepuesto éste, por cantidades relativamente altas (2.0-3.0 mg/l) de citocinina. Así también, podemos decir que la disminución de auxinas en el medio, nos permitió un claro incremento en la productividad (Tabla 7), ya que en medio bajos en AIB (0.01 mg/l) y citocinina (1.0 mg/l), hubo un incremento de casi 3

Tabla . 6 .- RESULTADOS DE LA FASE DE MULTIPLICACION DEL PATRON EM-26  
CON 0.1 mg/l DE AIB .

DIAS EN CULTIVO	B A (mg/l)									
	1.0		1.5		2.0		2.5		3.0	
	NUMERO DE BROTOS <sup>b</sup>	INCRE- MENTO <sup>c</sup>	NUMERO DE BROTOS	INCRE- MENTO	NUMERO DE BROTOS	INCRE- MENTO	NUMERO DE BROTOS	INCRE- MENTO	NUMERO DE BROTOS	INCRE- MENTO
0 <sup>a</sup>	5	5	3	3	4	4	3	3	1	1
7	9	1.8	5	1.7	7	1.7	3	0	2	1
21	24	2.6	8	1.6	18	2.5	5	1.7	5	2.5
53	108	4.5	30	3.7	40	2.2	31	6.2	21	4.2
67	147	1.4	51	1.7	68	1.7	42	1.3	34	1.6
I.D. <sup>d</sup>		2.2		0.8		1.0		0.6		0.5

a = Se tomó como tiempo cero el primer día que se observó la presencia de vástagos en el brote inicial. b = Número de brotes a partir de uno sólo .  
c = Los incrementos fueron obtenidos dividiendo el número de vástagos /el número de brotes que le dieron origen; Ej. 9/5 = 1.8 . d = Incremento diario ( número de brotes totales/días transcurridos) .



a = Número de brotes totales/Días en cultivo  
FIGURA.15 a.-PRODUCTIVIDAD DEL PATRON EM-26 EN  
DIFERENTES CONCENTRACIONES DE CITOCININAS  
Y AUXINAS .

Tabla . 7 .- RESULTADOS DE LA FASE DE MULTIPLICACION DEL PATRON EM-26  
CON 0.01 mg/l DE AIB .

DIAS EN CULTIVO	B A ( mg/l )									
	1.0		1.5		2.0		2.5		3.0	
	NUMERO DE BROTOS <sup>b</sup>	INCRE- MEN- TO <sup>c</sup>	NUMERO DE BROTOS	INCRE- MEN- TO	NUMERO DE BROTOS	INCRE- MEN- TO	NUMERO DE BROTOS	INCRE- MEN- TO	NUMERO DE BROTOS	INCRE- MEN- TO
0 <sup>a</sup>	7	7	2	2	3	3	3	3	1	0
7	17	2.4	5	2.5	8	2.6	5	1.7	1	0
21	32	1.8	8	1.6	15	1.8	3	0.0	14	14
53	115	3.6	25	3.1	54	3.6	37	12.3	22	1.5
67	190	1.6	52	2.1	105	1.9	63	1.7	42	1.9
I.D. <sup>d</sup>		2.8		0.8		1.6		0.9		0.6

a = Se tomó como tiempo cero el primer día que se observó la presencia de vástagos en el brote inicial. b = Número de brotes a partir de uno sólo .  
c = Los incrementos fueron obtenidos dividiendo el número de vástagos, en-  
tre el número de brotes que le dieron origen; Ej. 17/7 =2.4 . d = Incre-  
mento diario (número de brotes totales/días transcurridos).

brotos diarios, y que en general, comparando resultados entre las dos concentraciones auxínicas, encontramos que se ve favorecida la multiplicación con bajas concentraciones. Por otra parte, si observamos las figuras 16 y 17, veremos que la productividad de los brotes sin importar la concentración hormonal en la que hayan sido colocados, nunca un brote dió origen a menos de 30 vástagos durante el lapso de prueba. Lo que nos indica que este es un método efectivo de propagación, ya que en dos meses el número total de brotes se duplicó (en condiciones óptimas) cada 15 días, dando origen al término de la prueba (67 días), a 190 brotes a partir de uno solo.

La morfología general que presentaron los brotes de este patrón, fue muy irregular; con el tallo muy ancho y succulento, con gran cantidad de hojas bastante grandes (2-3 cm de longitud) y de forma irregular (Fig. 18). Además de la presencia de algunas de estas con una apariencia cristalina (vitrea), quizás debida al efecto de un pH ácido del medio (Kharta, 1980), el cual al elevarlo de 5.2 a 5.6 no indujo ningun efecto favorable aparente.

En general, los brotes presentaron una apariencia arrosetada la cual pudo deberse a la carencia o deficiencia de algunos factores esenciales para su desarrollo normal (Jonas, 1968; 1973). Este arrosetamiento nos provocó el inconveniente de un tamaño muy reducido del brote (menor a 1.0' cm), el cual hizo difícil su manejo e implicó mayor tiempo de permanencia "in vitro".

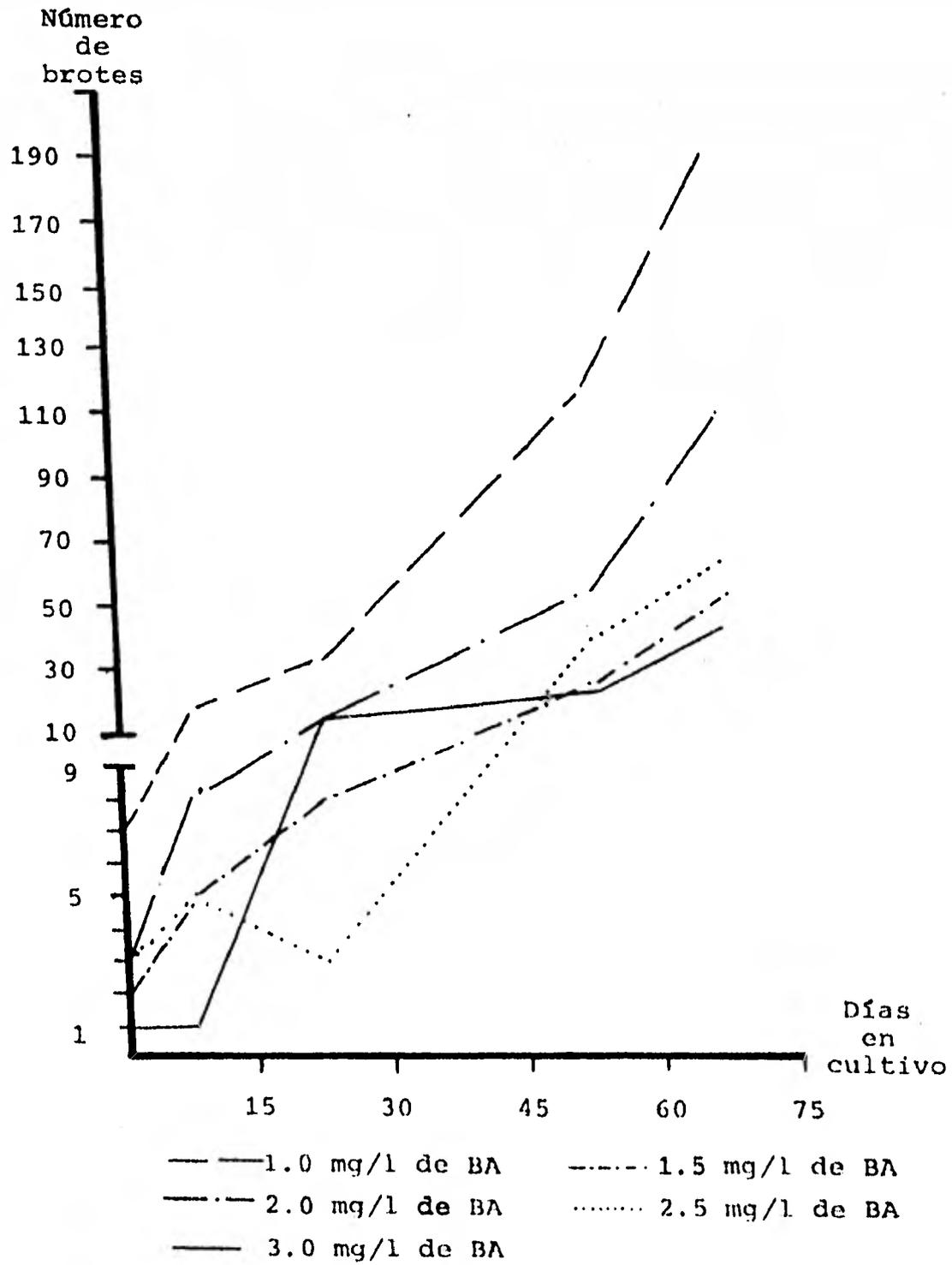


Figura 16.- NUMERO DE BROTES PRODUCIDOS POR DIA  
POR EL PATRON EM-26, CON 0.01 mg/l  
DE AIB .

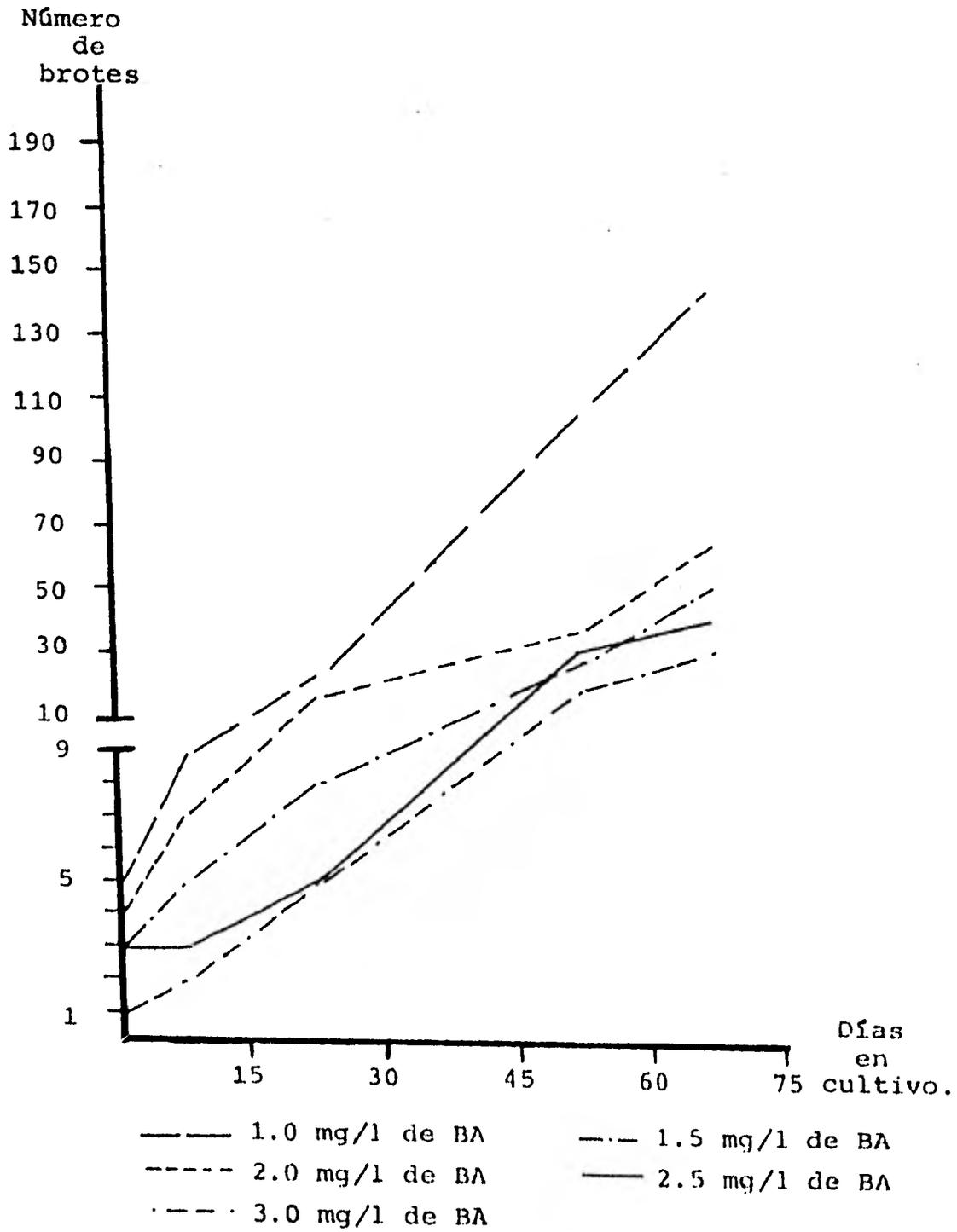


Figura. 17.- NUMERO DE BROTES PRODUCIDOS POR DIA POR EL PATRON EM-26, CON 0.1 mg/l DE AIB .



Fig. 18 .- Fase de proliferaci3n.

La determinación del origen de los brotes (axilar, colateral, o adventicio), es un punto muy delicado de discusión, ya que en algunos casos se notó claramente su origen axilar; pero en otros, no fue posible hacer una determinación de su punto de emergencia exacta. Jones (1976a), reportó que los brotes obtenidos por él, fueron originados de los meristemos terminales y laterales, pero nunca de meristemos colaterales o adventicios.

La dificultad de esta determinación radicó en que comúnmente se originaban varios brotes aparentemente del mismo punto, los que pudieron ser axilares, haciéndose difícil la determinación debido a las cortísimas distancias entre nudo y nudo. Otra explicación de este fenómeno, es que quizás debido al efecto de las hormonas, se hayan desarrollado los meristemos de las yemas colaterales, las cuales, siempre están presentes en la base de la yema axilar, pero que en general nunca se desarrollan, debido a que los meristemos apicales y laterales tienen los haces vasculares más grandes, recibiendo por esto cantidades suficientes de citocininas para crecer e inmediatamente inhiben por un efecto correlativo, a las yemas colaterales (Pieniazek, 1966c). Efecto que debido al suministro continuo y acción de las citocininas en el medio nutritivo se vió anulado, dando como resultado la emergencia de brotes colaterales.

Por otra parte, la inducción de brotes adventicios en el manzano ha sido reportado por Abbot (1976; 1978), con 1.0 mg/l de Kinetina y cuyo origen fue a partir de unidades

meristemáticas dentro del área basal del explante, las cuales no tuvieron ninguna conexión vascular con el eje principal del brote. Debido a que no se hicieron exámenes histológicos al microscopio para determinar el origen de los brotes, no podemos afirmar que la totalidad de ellos fueron obtenidos a partir de meristemas axilares, ni tampoco negar que hayan sido de yemas colaterales ni mucho menos que el peligro de la obtención de brotes adventicios se haya salvado. Por lo cual, lo único que nos podría confirmar la estabilidad genética de nuestro tejido, sería hacer un examen de su cariotipo.

Por otro lado, se obtuvieron brotes anormales morfológicamente, pues presentaron una forma aplanada (1.0-1.5 cm de ancho), con un grosor de 3-5 mm. Con grandes surcos que los recorrieran desde la base hasta la parte superior, en donde se encontraban las hojas en grandes cantidades (15-20), las cuales, eran alargadas, con muy poca superficie foliar y no presentaban la filotaxia normal (espiralada). Estos brotes tuvieron la capacidad de multiplicarse dando origen a otros iguales. Quizás esta modificación de la forma se haya debido a una alteración causada por las condiciones del medio (pH, consistencia, etc.), y con el tiempo éstos posiblemente recuperarán su forma normal (Kharta, 1980). También se pensó que este fenómeno fue una manifestación de una "quimera" (Barrientos, 1980), la cual sólo haciendo un análisis cromosómico se podría determinar.

La presencia de estos brotes aberrantes fue mínima y pu

do se rápidamente detectada, lo que implica la posibilidad de una eliminación inmediata, evitando así el riesgo de estar propagando material que no cumpla con los requisitos de la clonación.

#### Patrón MM-106

La multiplicación de brotes en este patrón fue baja en comparación con los resultados del EM-26, ya que como se puede observar en las Tablas 8 y 9, los incrementos diarios fueron casi siempre menores a la unidad. Los mejores resultados fueron obtenidos con altas concentraciones de BA (2.5-3.0 mg/l). Por lo que se puede decir que los requerimientos citocinínicos de este patrón para dar la mejor respuesta, son altos, ya que con menor cantidad la productividad se ve bastante reducida.

Las concentraciones usadas de auxina no fueron aparentemente definitivas en su papel regulador de la morfogénesis, ya que no se presentó un patrón bien definido de su influencia a favor o en contra de la formación de nuevos brotes, como se puede apreciar en la figura 19. Por lo tanto habría que hacer pruebas posteriores para determinar el efecto de las auxinas en este patrón, por que los datos obtenidos no nos aportan suficiente información para hacer una conclusión definitiva al respecto. Lo que si se puede afirmar es que existe una mayor proliferación en las concentraciones altas de citocininas (Figs. 20 y 21), por lo que es necesario que

en trabajos futuros se amplíe el rango de concentraciones de estas hormonas para encontrar el óptimo.

También se presentó en este patrón el problema de la de terminación del origen de los brotes. Aunque se pudo observar en algunos casos que el punto de nacimiento era definitivamente axilar, y que en la base de estos posteriormente se desarrollaban nuevos vástagos, de los cuales no se pudo de--terminar si su origen era colateral o adventicio (Fig. 22).

Todos los brotes de este portainjerto presentáron una morfología normal (parecida a la de una plántula de semilla), pero con las hojas siempre de tamaño reducido y con la lámina foliar pobremente desarrollada. Este efecto se le puede atribuir según algunos autores al efecto de la BA en altas concentraciones (Jones, 1967; Pieniazek, 1968; Jones, 1973).

Según Street (1977), los ápices de brote presentan una estabilidad genética y morfológica (como en este caso), durante el crecimiento y diferenciación "in vitro", presumiblemente debido a su capacidad para someterse a divisiones celulares continuas, así como para regular los eventos secuenciales de la síntesis de DNA y mitosis. Esta quizás sea la razón por la que las plantas obtenidas a partir de brotes axilares mantienen en general su estabilidad cromosómica.

Debido a los resultados, es necesario efectuar más estudios para optimizar la propagación de este patrón, para que en un futuro sea posible su explotación comercial en gran escala.

Tabla. 8 .- RESULTADOS DE LA FASE DE MULTIPLICACION  
DEL PATRON MM-106 CON 0.01 mg/l DE AIB.

DIAS EN CULTIVO	B A ( mg/L )							
	1.0		1.5		2.5		3.0	
	NUMERO DE BROTOS <sup>b</sup>	INCRE- MENTO <sup>c</sup>	NUMERO DE BROTOS	INCRE- MENTO	NUMERO DE BROTOS	INCRE- MENTO	NUMERO DE BROTOS	INCRE- MENTO
0 <sup>a</sup>	5	5	3	3	5	5	5	5
7	5	0	3	0	7	1.4	6	1.2
21	7	1.4	3	0	9	1.2	8	1.3
53	23	3.2	10	3.3	35	3.9	40	5.0
67	43	1.8	27	2.7	46	1.3	65	1.6
I.D. <sup>d</sup>		0.6		0.4		0.7		1.0

a = Se tomó como tiempo cero el primer día que se observó la presencia de vástagos en el brote inicial. b = Número de brotes a partir de uno sólo. c = Los incrementos fueron obtenidos dividiendo el número de vástagos / el número de brotes - que le dieron origen; Ej. 43/23 = 1.8 . d = Incremento diario (número de brotes totales / días transcurridos) .

Tabla 9 .- RESULTADOS DE LA FASE DE MULTIPLICACION DEL PATRON MM-106  
CON 0.1 mg/l DE AIB .

DIAS EN CULTIVO	B A (mg/l)									
	1.0		1.5		2.0		2.5		3.0	
	NUMERO DE BROTOS <sup>b</sup>	INCREC MENTO	NUMERO DE BROTOS	INCRE- MENTO	NUMERO DE BROTOS	INCRE- MENTO	NUMERO DE BROTOS	INCRE- MENTO	NUMERO DE BROTOS	INCRE- MENTO
0 <sup>a</sup>	4	4	4	4	2	2	5	5	5	5
7	5	1.2	7	1.8	2	0	8	1.6	6	1.2
21	8	1.6	10	1.4	3	1.5	16	2.0	14	2.3
53	25	3.1	27	2.7	7	2.3	35	2.2	37	2.6
67	40	1.6	33	1.2	13	1.8	46	1.3	47	1.3
I.D. <sup>d</sup>		0.6		0.5		0.2		0.7		0.7

a = Se tomó como tiempo cero el primer día que se observó la presencia de vástagos en el brote inicial. b = Número de brotes a partir de uno sólo .  
c = Los incrementos fueron obtenidos dividiendo el número de vástagos / el número de brotes que le dieron origen; Ej. 5/4 = 1.2 . d = Incremento diario ( número de brotes totales/días transcurridos) .

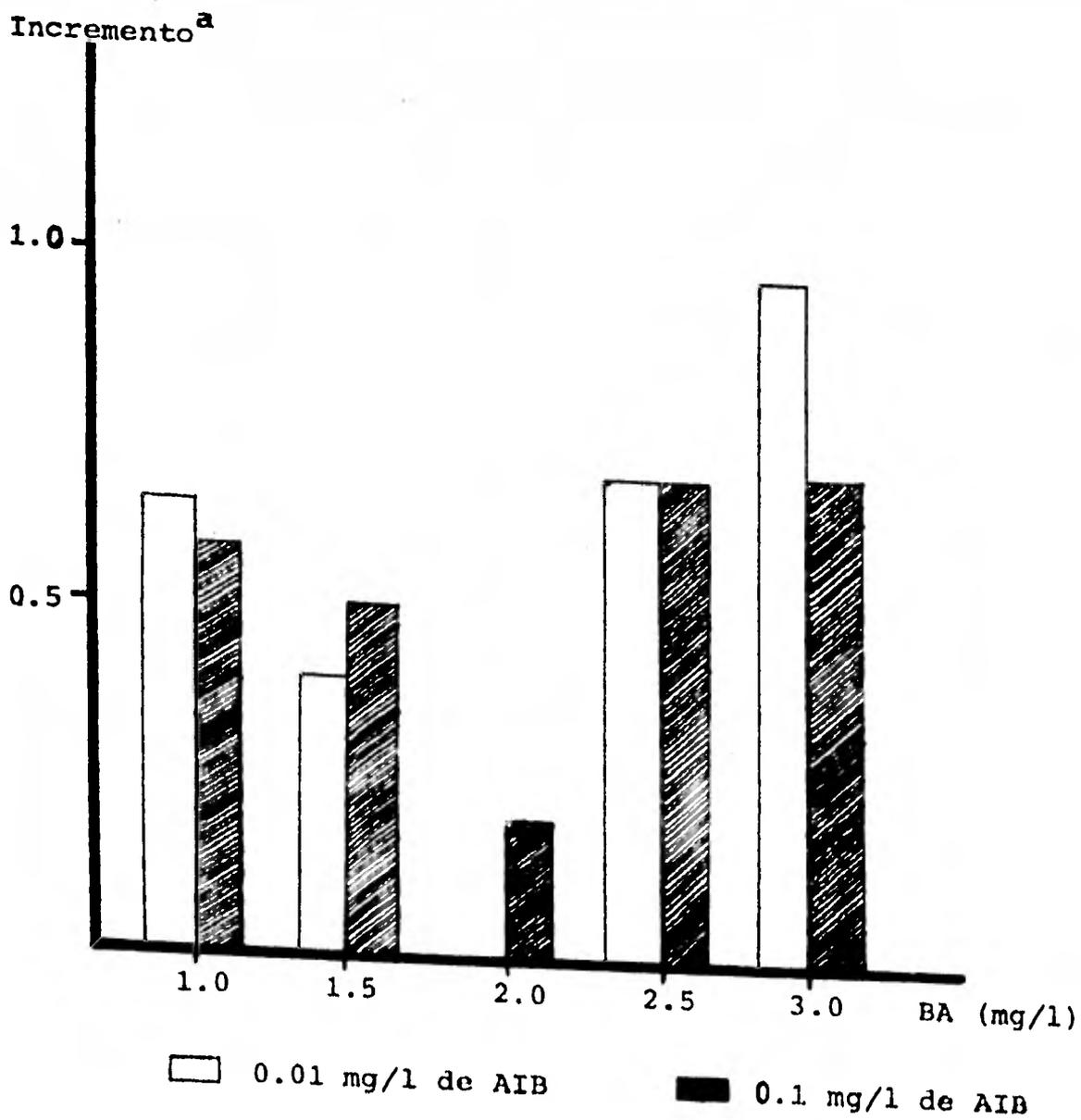


FIGURA. 19.-PRODUCTIVIDAD DEL PATRON MM-106 EN DIFERENTES CONCENTRACIONES DE CITOCININAS Y AUXINAS.

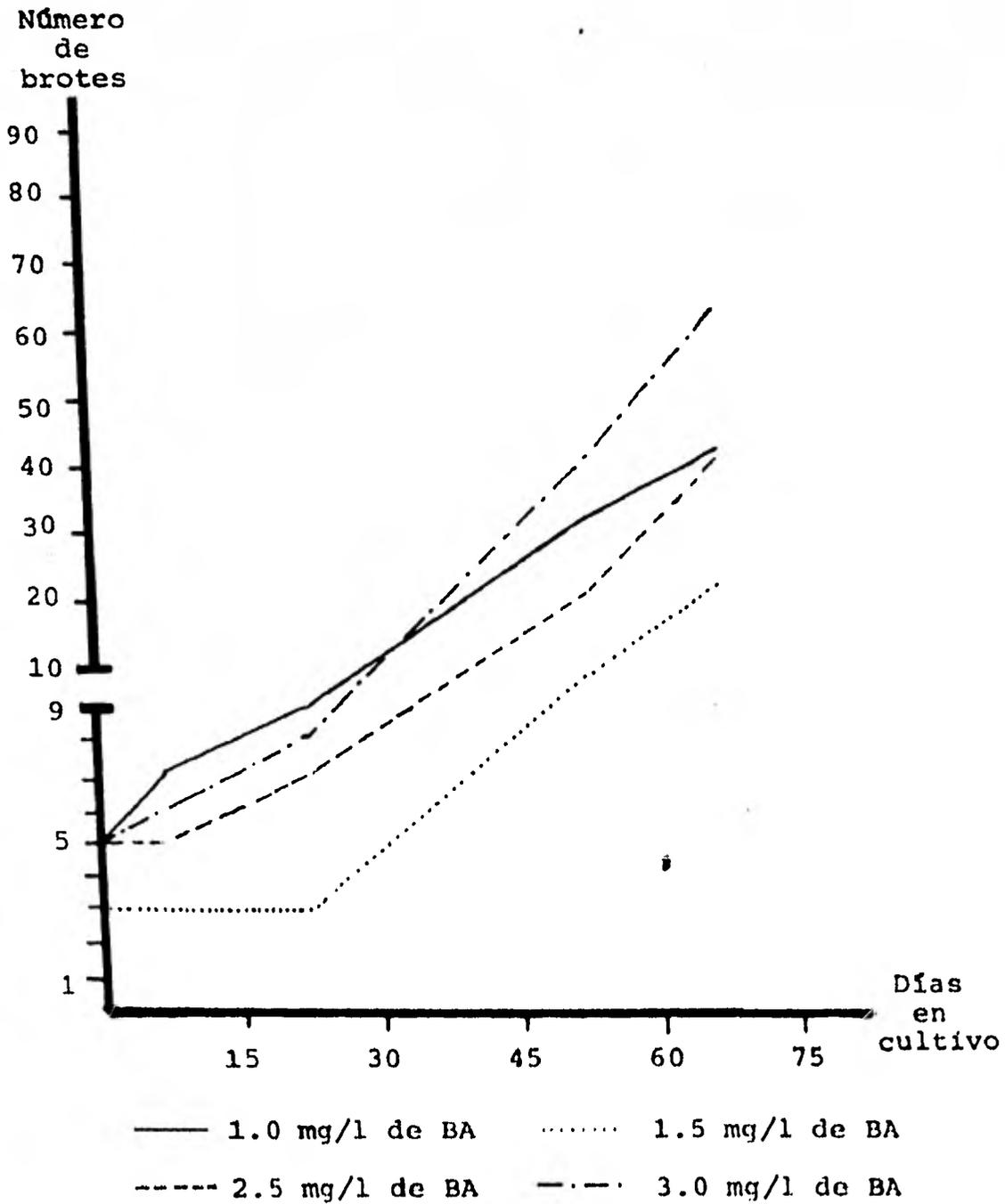


Figura 20 .- NUMERO DE BROTES PRODUCIDOS POR DIA  
POR EL PATRON MM-106, CON 0.01 mg/l  
DE AIB

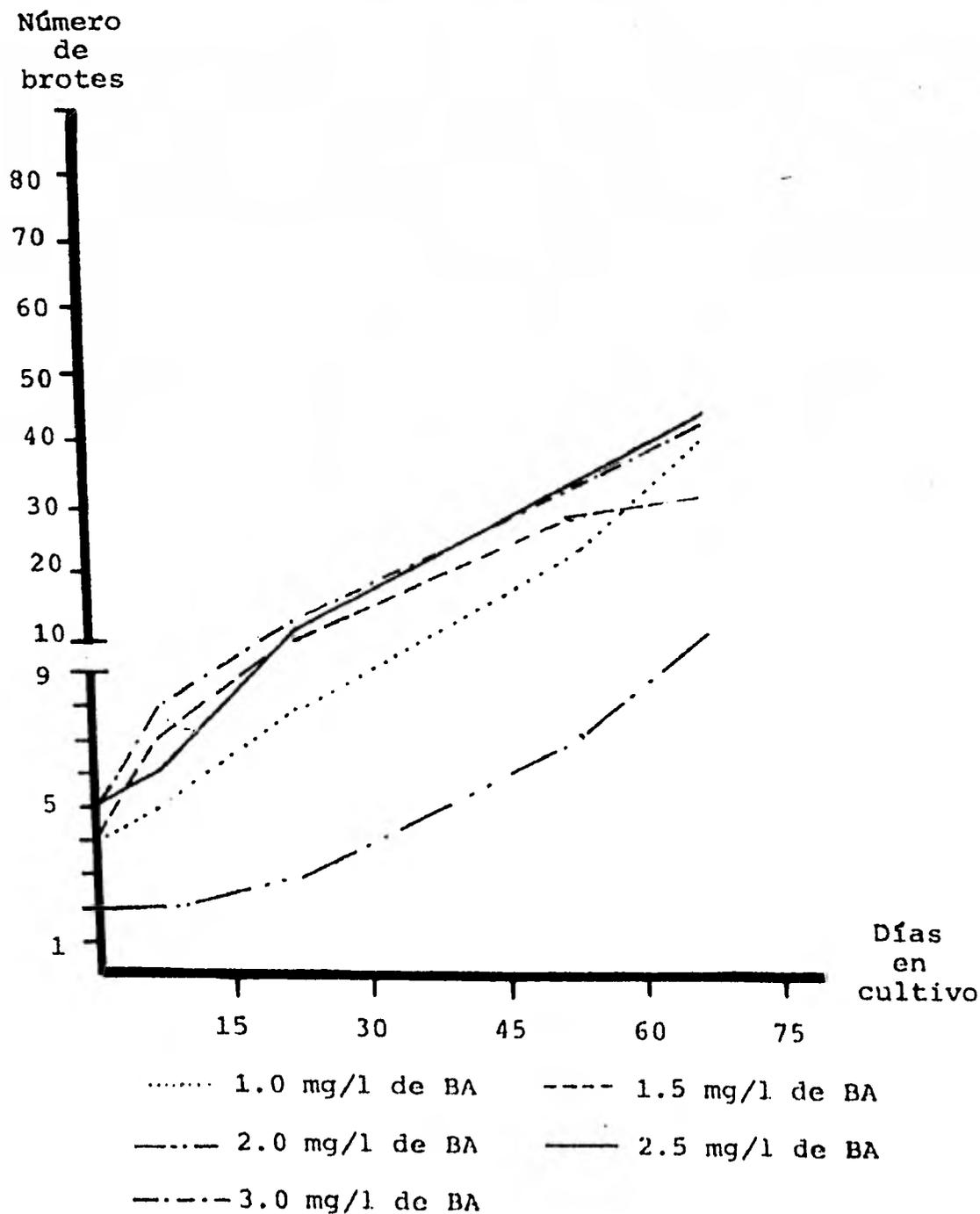


Figura 21 .- NUMERO DE BROTES PRODUCIDOS POR DIA  
POR EL PATRON MM-106, CON 0.1 mg/l  
DE AIB .



Fig. 22 .- Vástagos originados en la base de un brote del patrón MM-106.

### Fase de Elongación

Durante este periodo, el cual duró 30 días, no se observó una respuesta clara, con respecto al aumento de longitud de los brotes individualizados de ambos patrones. Además que la apariencia general de éstos decayó, ya que las hojas en un principio verdes, se tornaron cloróticas así como también se presentó oxidación en la base de los brotes (Fig.23). Este efecto senescente pudo haber sido una manifestación de la carencia de citocininas, ya que éstas cuando están presentes, ejercen una acción favorable a la buena apariencia del brote, porque mantienen altos niveles de clorofilas y atraen nutrientes hacia la zona donde están presentes (Bidwell,1979). La adición de BA a este medio, para la prevención de la senescencia no se efectuó porque estos brotes tenderían de nuevo a la proliferación por la influencia hormonal, con lo que retornaríamos inevitablemente a la etapa anterior.

El resultado negativo de ambos patrones a la elongación, quizás se debió a que la cantidad de giberelinas suministrada para este objetivo (0.4 mg/l) no fue suficiente como para inducir la respuesta a corto plazo. Por otra parte, está reportado (Jones, 1976a) que además del GA<sub>3</sub>, el floroglucinol añadido al medio estimula el crecimiento de los brotes, la producción foliar y la expansión; efectos que no se hicieron conspicuos quizás debido a la necesidad de una exposición más prolongada a estas sustancias.

Esta fase fue crítica, ya que como se mencionó anteriormente, es una etapa en la cual se predispone a los brotes para un enraizamiento más rápido y uniforme, ya que un brote que tiene un tamaño reducido y es puesto a enraizar, lo hace con mucho mayor dificultad y de una manera menos uniforme que los que presentan un mayor tamaño (Zuccherelli, 1979; De Paoli, 1979).

Existe otra alternativa además de ésta, de obtener un mayor tamaño que facilite las siguientes etapas, y es el de cultivar en la oscuridad los brotes en el medio de proliferación (Liu Shih-Feng, 1978), lo cual produce una etiolación que induce una respuesta de incremento en longitud, mientras se está multiplicando el material. Esta respuesta da origen a brotes de hasta 5.0 cm de longitud y economiza el tiempo que este tejido pasaría en el proceso de elongación.

Para trabajos posteriores es recomendable probar tanto concentraciones más altas de giberelinas, como el método de etiolación de los brotes, de lo cual se podrá obtener la mejor metodología para la obtención de vástagos de mayor tamaño, en los cuales se facilite el enraizamiento.



Fig. 23 .- Brote individualizado con proliferación de callo y oxidación del tejido.

### Fase de Enraizamiento

Después de 45 días de estancia de los patrones EM-26 y MM-106 en el medio específico para la inducción de sistema radicular, encontramos que ambos están respondiendo pobremente, ya que sólo dos brotes, uno de cada portainjerto, han presentado desarrollo de sistema radicular hasta la fecha (Figs. 24, 25 y 26), de lo cual es importante señalar que los dos provienen del medio K, que contenía 1.0 mg/l de AIB. Haciéndose notoria la presencia de raíces a los 30 días de cultivo, llegando después de 15 días de su emergencia a una longitud de  $\pm$  5.0 cm.

No fue posible determinar si las raíces se originaron a partir de floema secundario, cambium, radios vasculares o médula, que de ser así existe una continuidad y una conexión del sistema vascular entre ellas y el brote, lo que le asegura un funcionamiento normal. Si por el contrario la diferenciación de las raíces fue a partir del callo que rodeaba al brote entonces los haces vasculares no estarán interconectados y por lo tanto disminuirían notablemente las posibilidades de sobrevivencia en el campo.

La inducción del sistema radicular fue propiciada por la auxina, la cual estuvo auxiliada por el floriglucinol añadido al medio, ya que éste actúa sinérgicamente con el AIB (por sí sólo no induce el enraizamiento, sino que necesita la auxina), para promover la formación de raíces adventicias

(Jones, 1976a). Además se ha sugerido que el aumento en la respuesta de enraizamiento con este compuesto es debida a que el floroglucinol inhibe la AIA-oxidasa, previniendo así la destrucción de la auxina endógena (Basu, 1969), aunado al hecho de que el AIB es destruido en forma relativamente lenta por este sistema enzimático, asegurando así su permanencia en el medio y por lo tanto su acción, lo cual favorece la conjugación entre el AIA endógeno y aminoácidos, dirigida a la síntesis de proteínas específicas necesarias para la formación de raíces (De Lary, 1979).

De esto podemos inferir que quizás los brotes requieren, en este caso, de más tiempo para la iniciación de sistema radicular o bien, que haya influido negativamente en la formación de raíces el tamaño reducido de los brotes (como fue discutido en la fase de elongación).

De los resultados hasta ahora obtenidos en esta investigación preliminar, no se puede establecer una conclusión definitiva con respecto a la baja respuesta de ambos patrones, ya que los brotes en este momento siguen en el medio inductor.

Por otra parte, las plantas enraizadas se encuentran en fase de adaptación al medio ambiente, en donde hasta ahora han respondido satisfactoriamente, lo que nos abre la posibilidad de que la propagación de árboles frutales por medio de la técnica de cultivo de tejidos, sea una realidad.

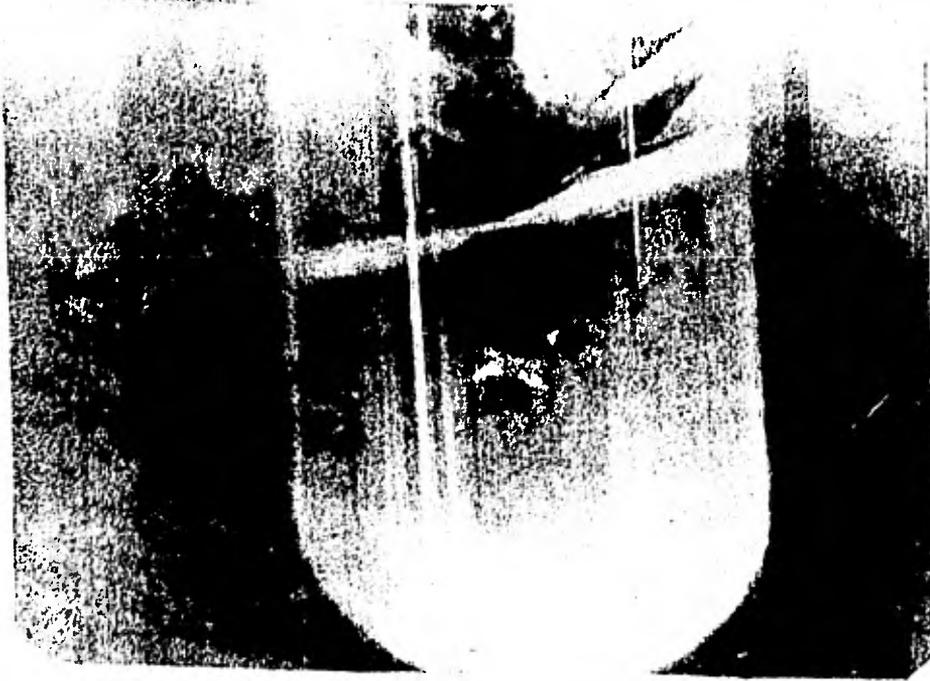


Fig. 24 .- Emergencia de raíces en la base del brote.

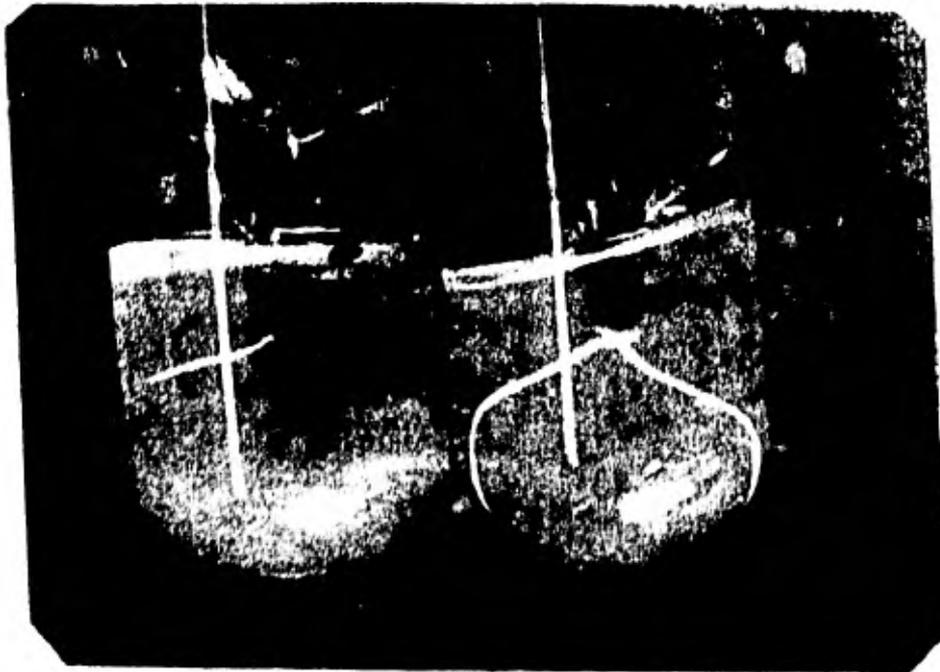


Fig. 25 .- Sistema radicular a los 15 días de haber emergido.



Fig. 26 .- Apariencia general de un árbol de manzano obtenido a través del cultivo de tejidos.

CAPITULO VII

## CONCLUSIONES

- Los resultados negativos obtenidos en la desinfección de las microvaretas, por medio de las técnicas usuales para la eliminación de hongos y bacterias, son debidos a la localización profunda de estos microorganismos dentro del explante y por lo tanto, fuera del alcance de los agentes esterilizantes aquí probados.

- El material idóneo para la propagación de ambos portainjertos del manzano, fueron los ápices de brotes en estado juvenil, los cuales brotaron en un ambiente semi-aséptico, ya que la esterilización del material maduro proveniente del campo, no fue posible por los métodos seguidos.

- Las plantas obtenidas a partir del cultivo de tejidos, tendrán que ser sometidas a estudios de detección, identificación y combate de los patógenos sistémicos para eliminarlos en caso de que esten presentes. Con respecto a la eliminación de virus se tendrán que hacer estudios de cultivo de meristemas de ambos patrones, y posteriormente hacer las pruebas pertinentes para certificar la sanidad de la planta obtenida, porque la manifestación negativa de los patógenos en el medio no indica necesariamente que el tejido esté libre de ellos.

- La fase de adaptación fue un periodo crítico para el explante, debido a los cambios que involucra y por las tensiones a las que es sometido, de tal manera que el resultado final del cultivo depende grandemente de ésta.

- Los factores que determinaron los resultados obtenidos en cada una de las fases de este estudio, fueron en orden de importancia:

- a) Las características intrínsecas de cada patrón;
- b) El medio nutritivo;
- c) El balance hormonal entre citocininas y auxinas.

- El potencial de multiplicación fue comparativamente menor, bajo las mismas condiciones en el patrón MM-106 que en el EM-26. Además de que este último tiene requerimientos citocinínicos menores que el primero, para la inducción de morfogénesis.

- Es posible que durante la propagación se obtengan alteraciones, ya sean genotípicas o sólo fenotípicas, aún cuando los brotes provengan de una yema axilar, ya que una mutación de yema puede presentarse en el transcurso del cultivo o provenir desde la planta madre. Aunado a la muchas veces discutida inestabilidad cromosómica de los brotes adventicios. Este tipo de inestabilidad quizás la presentó el patrón EM-26, en el cual fue posible descartar inmediatamente las formas aberrantes con alteraciones morfológicas. Por lo

tanto, es necesario hacer cariotipos regularmente para poder controlar la clonación.

- La mejor respuesta de organogénesis (brotes) de ambos patrones se obtuvieron en los siguientes balances hormonales:

	BA	AIB	GA <sub>3</sub>
Patrón EM-26 (mg/l)	1.0	0.01	0.1
Patrón MM-106 " "	3.0	0.01	0.1

Es necesario hacer notar que la cantidad de auxina presente en la fase de multiplicación, es determinante para el patrón EM-26, ya que ésta produce un efecto inhibitorio de la morfogénesis, efecto que no fue muy claro para la MM-106. Además de que la sobreabundancia de auxinas en el medio, puede causar una formación excesiva de callo y desviar la organogénesis.

- El medio mineral de MS, es satisfactorio como suministro de los minerales necesarios para mantener tejido vivo y en constante multiplicación; además, sin deficiencias aparentes durante cada una de las fases, en comparación con el medio de Knop, el cual, en este caso es deficiente en algunos macronutrientes y en especial de nitrógeno, de tal suerte que este medio no es recomendable para este frutal.

- El número de brotes obtenido representa una pequeña fracción del gran potencial de producción de un solo ápice. Asumiendo que se obtuvieron 190 brotes en dos meses, a partir

de uno sólo y que su número se duplicaba cada 15 días, tenemos que en 12 meses podríamos obtener varios millones de plantas.

- La fase de elongación es un requisito indispensable para facilitar la morfogénesis radicular, por lo que hay que probar en investigaciones futuras mayores cantidades de giberelinas o en todo caso el método de etiolación de los brotes.

- Se logró el enraizamiento de los brotes producidos "in vitro", pero hay que realizar más estudios para poder disminuir ya sea el tiempo de inducción del sistema radicular o anular los factores que actúen en contra de la formación de éste, por lo tanto es necesario probar condiciones nutricionales, hormonales y ambientales para poder determinar con exactitud las mejores condiciones para incrementar la inducción del sistema radicular.

- Las ventajas que nos proporciona el utilizar esta técnica de multiplicación de árboles frutales son:

- a) Propagación anual en proporciones elevadas ( $\times 10^6$ ).
- b) Ciclos de generación cortos.
- c) Obtención de plantas durante todo el año.
- d) Inducción de mutaciones favorables y obtención de poliploides.
- e) Propagación de plantas exactamente iguales a

sus progenitores.

f) Obtención de plantas libres de patógenos:

- Este método es un recurso para poder establecer huertas de cultivos intensivos con los patrones enanizantes que se propagaron, las cuales requieren grandes cantidades de árboles por hectárea.

BIBLIOGRAFIA

- Abbot, A.J. and E. Whiteley. 1976. Culture of Mallus tissues "in vitro". I. Multiplication of apple - plants from isolated shoot apices. Scientia Hort. 4:183-189.
- Abbot, A.J. 1977. Propagating temperate woody species in tissue culture. Scientific Horticulture. ---- 28(4):155-162.
- ----- 1978. Practice and promise of micropropagation of woody species. Acta Horticulturae. No. 79.
- Alvarez, R.S. 1974. El manzano. Pub. de Extención Agraria. Madrid, España.
- Bair, W.I. 1971. New York orchard and vineyard survey. - N.Y. Crop reporting service. Albany. AMA Release. No. 125.
- Barrientos, F. 1980. Comunicación personal.
- Basu, A., Taper, C.D. and G.H. Towers. 1979. Auxin synergists in the rooting of cutting. Physiologia Plantarum. 22:649-652.
- Bianchini, F. 1974. Frutos de la tierra. Ed. AEDOS. -- Barcelona, Esp.
- Bidwell, R.G.S. 1979. Plant Physiology. Mc. Millan Publishing Co. N.Y.

- Bottomley, W., N.P. Kefford, J.A. Zward. 1963. Kinin activity from plant extracts. I. Biological assay and sources of activity. Aust. J. Biol. Sci. 16:395-406.
- Brase, K.D. and R.D. Way. 1975. Rootstocks and methods used for dwarfing fruit trees. N.Y. State. Agr. Exp. Sta., Geneva. Bull 783.
- Cape, F. 1979. Apples and man. Van Nostrand Ed., Reinhold, N.Y.
- Child, R.D. 1972. Meadow orchards workable but still many problems to solve. Grower, 77:179-181.
- Coutanseau, M. 1970. Fruticultura. Oikos-Tau Ed., España.
- Cummins, J.N. 1972. Fitting the spacing, apple variety, and rootstock choices to tomorrow needs; Proc. Mass. Fruit Growers Assn. 78: 99-104.
- Cummins, J.N. and H.S. Adwinckle. 1973. Fire blight -- susceptibility of fruit trees; Hort. Science. 8:176-178.
- ----- 1974. Breeding apple rootstocks. HortScience. Vol. 9(4).
- De Lary, J.A. and C.C. Wright. 1979. Root formation in cuttings of apple in relation to auxin applications and to etiolation. New Phytol. 82:341-347.
- Elliot, R.F. 1972. Axenic culture of shoot apices of apple. New Zealand Journal of Botany. 20:254-258.

- Elliot, R.F. 1972. Axenic culture of shoot apices of apple. *New Zealand Journal of Botany*. 10:254-258.
- Fisher, D.V. 1969. High density plantings for high profits. *Proc. N.Y. State Hort. Soc.* 114:185-194.
- Garner, R.J. 1953. The nursery behavior of the MM and EM apple rootstocks. *Annu. Rpt. East Malling Res. Sta. for 1952*. 64-66.
- Gamborg, O.L.; Murashige, I. and Thorpe, T.A. 1976. Plant tissue culture media, in: *Journal of the tissue culture association in vitro*. 12(7).
- Garner, R.J. 1966. Propagation of M-26 rootstocks by hardwood cuttings for direct lining out. *Annu. Rpt. East Malling Res. Sta. for 1965*:77-79.
- Gillomee, J.H. and D.K. Strydom. 1968. Northern Spy, Merton and Malling-Merton rootstocks susceptible to woolly aphid, *Eriosoma lanigerum* in the western cape. *S. Afr. J. Agr. Sci.* 11:183-186.
- Gur, A. and R.M. Samish. 1968. The role of auxins and auxin destruction in the vigor effect induced by various apple rootstocks. *Beitr. Biol. Pflanz.* 45:91-111.
- Hartman, H.T. and C.J. Hansen. 1965. Propagation of apple rootstocks by hardwood cuttings. *Calif. Agr.* 19(6):4-5.
- Hartman, H. and Kester. 1980. *Propagación de plantas - principios y practicas*. Ed. Continental, Mex. 2a. ed.

- Huang, L.C. and T. Murashige. 1976. Plant tissue culture media: Major constituents, their preparation - and some applications. TCA Manual, 3( 1 ): 539-548.
- Hudson, J.P. 1971. Meadow orchards. Agriculture 78:157-160.
- Hutchinson, A. 1967. Inheritance of stature, stooling, - rooting ability, and other characteristics in progenies of Malling-IX. Rpt. Hort. Res. Inst. Ontario for 1966: 76-82.
- ----- 1969. Rootstock for fruit trees. Ontario Dept. Agr. and Food. Toronto, Pub. 334.
- Janick, J. 1979. Horticultural Science. W.H. Freeman - and Co., San Fco., U.S.A.
- Jones, O.P. 1965. Observation of growth effects of xilem sap from apple trees. Rep. East Malling Res. - Stn. for 1964: 119-123.
- ----- 1967. Effect of Benzyl adenine in isolated - apple shoots. Nature, Lond., 215:1514-1515.
- Jones, O.P. and H.J. Lacey. 1968. Gibberelin-like sub-- stances in the transpiration stream of apple - and pear trees. J. Exp. Bot. 19: 526-531.
- Jones, O.P. 1973. Effects of cytokinins in xilem sap - apple trees on apple shoot growth. J. Hort. Sci. 48:181-188.
- ----- 1976a. Effect of phloridzin and phlorogluci- nol on apple shoots. Nature. Vol. 262

- Jones, O.P. and S.G.S. Hatfield. 1976b. Root initiation in apple shoots cultured "in vitro" with auxins and phenolic compounds. J. of Hort. Science. 51: 495-499.
- ----- E.M. Hoopgood and D. O'farrell. 1977. Propagation "in vitro" of M-26 apple rootstocks. J. Hort. Sci. 52:235-238.
- ----- C. A. Pontikis, M. E. Hopgood. 1979a. Propagation "in vitro" of five scion cultivars. J. Hort. Sci. 54(2): 155-158.
- ----- 1979b. Metodi ed applicazioni della propagazione "in vitro" delle piante da frutto. En: - Mem. della propagazione su vasta scala delle - specie ortoflorofrutticole. Pistoia, Italia.
- ----- 1980. Propagation "in vitro" of apple trees and other woody fruit plants: Methods and applications report of East Malling Research Stn. - for 1980.
- Juscafresa, B. 1963. Fruticultura intensiva. Ed. AEDOS. Barcelona, España.
- Kharta, K. 1980. Comunicación personal.
- Lamonarca, F. 1978. Los árboles frutales. Ed. De Vecchi, Barcelona, España.
- Letham, D. S. and M. W. Williams. 1969. Regulators of cell division in plant tissue. VII. The cytokinins of the apple trees. Physiologia Pl. 22: 925-936.

- Letham, D.S. and M. W. Williams. 1967. Chemistry and -- Physiology of kinetin-like compounds. Annual Rev. Plant. Physiol. 18: 349-364.
- Liu Shih- Feng, et.al. 1978. Shoot tip culture of apple rootstocks and apple seedlings "in vitro". En: Proc. of Symp. on Plant tissue culture. Peking, China.
- Luckwill, L. C. and P. Whyte. 1968. Hormons in the xilem sap of apple trees. En: Plant Growth Regulators, Being Soc. Chem. Ind. Mongr. 3: 87-101.
- ----- and R. D. Child. 1973. The meadow orchard, a new concept of apple production based on growth regulators. Acta Hort. 34: 313-320.
- Messer, G. and S. Lavee. 1960. Studies on vigour and - dwarfism of apple trees in a "in vitro" tissue culture system. J. Hort. Sci. 44: 219-233.
- Milewska, E. 1977. Induction of androgenesis "in vitro" in Mallus domestica. Acta Horticulturae. 78.
- Moore, J. and J. Janick. 1975. Advances in fruit breed- ing. Purdue Univ. Press. Indiana, U.S.A.: 4-5.
- Morel, J. M. 1960. Producing virus-free Cymbidiums. Amer. Orchid. Soc. Bull. 29: 495-497.
- Morini, S. 1979. Indagini preliminari sulla micropropa- gazione del melo. (ver Jones, 1979b.)
- Mullins, C. A. 1972. Twenty years' research with size - controlling apple rootstock on the Cumberland - plateau. Tenn. Agr. Exp. Sta. Bull. 488.

- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum*. 15.
  
- ----- 1974a. Plant cell and organ culture methods in the establishment of pathogen-free stock. 2nd. Annual A. W. Dimock Lecture, Cornell Univ. N. Y.
  
- ----- 1974b. Propagation through tissue cultures. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 25: 135-166.
  
- ----- 1977a. Clonal crops through tissue culture. Eds: W. Barz., E. Reinhard, and M. H. Zenk, Eds. *Plant tissue culture and its bio-technological application*. Springer-Verlag, Berlin.
  
- ----- 1977b. Manipulation of organ initiation in plant tissue cultures. *Bot. Bull. Academia Sinica*. 18: 1-24.
  
- Nuty, R. V. 1979. Le colture "in vitro" vegetali e l' Agricoltura (ver Jones, 1979b.).
  
- Paoli, De, G. 1979. Eficienza de alcuni mezzi di coltura nella moltiplicazione de la varietà "Perleberg 3". (ver Jones, 1979b.).
  
- Pieniazak, J. 1964. *Acta Agrobotanica*. 16: 157-169.
  
- ----- and L. S. Jankiewics. 1965. Acropetal and basipetal transmission of 6-Benzylaminopurine - effect in dormant apple seedlings. *Bull. de l'Academie Polonaise des Sciences*. cl. V-vol. XIII, No. 10.

- Pieniazek, J. and L. S. Jankiewicz. 1966. Development of collateral buds due to Benzyladenine in dormant apple shoots. Bull. de L'Academie Polonaise des Sciences. 14(3): 185-189.
- ----- 1966b. Combined effect of NAA and 6-BA on bud development and on initiation of cambial activity in dormant apple seedlings. Bull. de L'Academie Polon. des Sciences. 14: 11-12.
- ----- 1968. The growth "in vitro" of isolated apple shoot tips from young seedlings on media containing growth regulators. Bull. de L'Academie Polon. des Sci. Ser. Sci. Biol. 16: 179-183.
- Powell, L. E. and C. Pratt. 1964. Kinins in the embryo and endosperm of Prunus persica. Nature 204: 602-603.
- ----- 1973. Naturally occurring plant growth regulators and the physiological rules in fruit trees. Acta Hort. 34: 33-40.
- Preston, A. P. 1953. Five new apples rootstocks. Ann. Rep. East Malling Res. Station. for 1952. - 169-170.
- ----- 1958a. Apple rootstocks studies: Thyrtty-five years' results with Lane's Prince Albert on clonal rootstocks. J. Hort. Sci. 33: 29-38.
- ----- 1958b. Apple rootstocks studies: Thyrtty-five years' results with Cox's Orange Pippin on clonal rootstocks. J. Hort. Sci. 33: 194-201.

- Preston, A. P. 1971. Apple rootstock 3431 (M-27). Ann. Rpt. East Malling Res. Sta. for 1970. 143-147.
- Quoirin, M. 1974. Premiers resultats obtenus dans la -- culture "in vitro" meristeme apical de sujets port-graffe de pommier. Bull. des Recherches Agronomiques de Gembloux. 9(2): 189-192.
- Richter, G. 1972. Fisiología del metabolismo de las plantas. Ed. C.E.C.S.A. México.
- Rogers, W. F. and A. B. Beakbane. 1957. Stock and scion relations. Ann. Rev. Plant Physiol. 8:217-236.
- Rom, R. C. 1971. Fire blight susceptibility of apple root stocks in Arkansas. Fruit Vars. and Hort. Dig. 24: 43-45.
- Ruehle, G.D. 1958. The Florida avocado industry. FLA. - Agr. Exp. Sta. Bull. 602.
- Singha, S. and L.E. Pawell. 1978. Response of apple buds cultured in vitro to Abscisic Acid. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 103(5): 620-622.
- Standardi, A. 1979. Indagine preliminare sull' influenza della luce nella propagazione di alcune specie legnose. (ver Jones, 1979b.).
- Street, H.E. 1977. Plant tissue and cell culture. California Press. U.S.A.
- Tamaro. 1968. Tratado de fruticultura. Gustavo Gil Ed. Barcelona, España.

- Thorpe, T. A. 1979. Organogenesis "in vitro": structural, physiological and biochemical aspects. (no publicado).
- Van Overbeck, J., J. E. Loeffler and M. Iona., R. Mason. 1967. Dorming (Abscicin II), inhibitor of plant DNA synthesis. Science 156: 1497-1499.
- Valdovinos, J. G. and C. C. Leland. 1967. Effect of Ethylene and Gibberellic Acid on auxin synthesis - in plant tissues. Plant Physiol. 42: 1803-1806.
- Walkey, D. G. 1972. Production of apple plantlets from axillary bud meristems. Can. J. Plant. Sci. 52: 1085-1087.
- Werner, E. N. and A. A. Boe. 1980. In vitro propagation of Malling 7 apple rootstock. HortScience. 15 (4): 509-510.
- Wildung, D. K., C. J. Welser and H. M. Pellett. 1973. Cold hardiness of Malling clonal apple rootstocks under different conditions of winter cover. Can. J. Plant. Sci. 53: 323-329.
- Williams, M. W. and E. A. Sthaly. 1970. Effects of cytokinins and Gibberellins on shape of "Delicious" apple fruits. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 94: 17-19.
- ----- and H. D. Billingsley. 1971. Increasing the number and crocht apple of primary branches of apple trees by cytokinins and Gibberellic Acid. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 95: 649-651.

- Zeiger, D. and H.B. Tukey. 1960. An historical review -  
of the Malling apple rootstocks in America. -  
Mich. State Univ., Cir. Bul. 226.
  
- Zuccherelli, G. 1979. Moltiplicazione "in vitro" del --  
portinnesti clonali del pesco. Frutticoltura.  
2: 15-20.