



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN

**EFFECTO DE AIB, ANA Y CARBON ACTIVADO SOBRE
EL ENRAIZAMIENTO DE FRESA *in vitro***

T E S I S

**Que para obtener el Título de
INGENIERO AGRICOLA**

p r e s e n t a

LETICIA EMMA OCHOA FRANCO

Director de Tesis: M.C. ANGEL VILLEGAS MONTER

Cuautitlán Izcallí, Edo. de México, 1983



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.

I N D I C E

	PAG.
Lista de Cuadros	viii
Lista de Gráficas	ix
I. RESUMEN	xi
II. INTRODUCCION	1
III. REVISION DE LITERATURA	3
1. Propagación <i>in vitro</i>	3
2. Factores que afectan el enraizamiento <i>in vitro</i>	4
2.1. Especie	5
2.2. Concentración de sales minerales y otros com- puestos del medio nutritivo	6
2.3. Tipo y concentración de reguladores del creci- miento	10
2.4. Cofactores de enraizamiento	17
2.5. Carbón activado	21
2.6. Condiciones ambientales	25
2.7. Tamaño del propágulo, época de corte y edad de la planta madre	27
2.8. Conclusión de la Revisión de Literatura	29
IV. MATERIALES Y METODOS	31
1. Localización	31
2. Descripción del material vegetativo	31
3. Medio de cultivo	32
4. Implantación del material vegetativo	33
5. Condiciones ambientales	34
6. Material y equipo	34

	PAG.
6.1. Material de laboratorio	34
6.2. Equipo	35
7. Fecha de siembra	35
8. Diseño experimental	35
8.1. Efecto del carbón activado	35
8.2. Efecto del tipo y concentración de auxinas	36
9. Toma de datos	36
10. Análisis de los datos	37
V. RESULTADOS	38
1. Efecto de la concentración de carbón activado	38
1.1. Tamaño de planta	38
1.2. Número de raíces	40
1.3. Tamaño de raíz	42
1.4. Porcentaje de enraizamiento	44
2. Efecto del tipo y concentración de auxina	44
2.1. Efecto del tipo de auxina	46
2.1.1. Tamaño de planta	46
2.1.2. Número de raíces	47
2.1.3. Tamaño de raíz	47
2.1.4. Porcentaje de enraizamiento	48
2.2. Efecto de la concentración de auxina	48
2.2.1. Tamaño de planta	48
2.2.2. Número de raíces	50
2.2.3. Tamaño de raíz	52
2.2.4. Porcentaje de enraizamiento	54
VI. DISCUSION	59
1. Efecto de la concentración de carbón activado	59

	PAG.
2. Efecto del tipo y concentración de auxina	59
VII. CONCLUSIONES	62
APENDICE	63
LITERATURA CONSULTADA	67

LISTA DE CUADROS

NUM.		PAG.
1	Comparación de medias para la variable número de plantas de acuerdo a su tamaño, dependiendo de la concentración de carbón activado	40
2	Comparación de medias para la variable número de raíces por planta dependiendo de la concentración de carbón activado	42
3	Comparación de medias para la variable tamaño de raíz, dependiendo de la concentración de carbón activado . .	44
4	Comparación de medias para la variable número de plantas de acuerdo a su tamaño, dependiendo del tipo de auxina	46
5	Comparación de medias para la variable número de raíces dependiendo del tipo de auxina	47
6	Comparación de medias para la variable tamaño de raíz dependiendo del tipo de auxina	48
7	Comparación de medias para la variable número de plantas por tamaño dependiendo de la concentración de auxina	50
8	Comparación de medias para la variable número de raíces dependiendo de la concentración de auxina	52
9	Comparación de medias para la variable tamaño de raíz dependiendo de la concentración de auxina	54
10	Porcentaje de enraizamiento y de plantas aptas para el trasplante	55

LISTA DE GRAFICAS

NUM.		PAG.
1	Efecto de la concentración de carbón activado sobre el número de plantas de fresa <i>in vitro</i> de acuerdo al tamaño	39
2	Efecto de la concentración de carbón activado sobre el número de raíces de plantas de fresa <i>in vitro</i> . .	41
3	Efecto de la concentración de carbón activado sobre el tamaño de raíces en plantas de fresa <i>in vitro</i> . .	43
4	Efecto de la concentración de carbón activado sobre el porcentaje de enraizamiento en plantas de fresa <i>in vitro</i>	45
5	Efecto del tipo y concentración de auxina sobre el número de plantas de fresa <i>in vitro</i> de acuerdo a su tamaño	49
6	Efecto del tipo y concentración de auxinas sobre el número de raíces en plantas de fresa <i>in vitro</i> . . .	51
7	Efecto del tipo y concentración de auxinas sobre el tamaño de raíz en plantas de fresa <i>in vitro</i>	53
8	Efecto del tipo y concentración de auxinas sobre el porcentaje de enraizamiento en plantas de fresa <i>in vitro</i>	56

APENDICE

1A	Soluciones concentradas de las sales inorgánicas del medio modificado de Murashige y Skoog (1962)	64
2A	Significancia de las pruebas de F del factor de variación carbón activado para cada variable estudiada	65

NUM.

PAG.

3A

Significancia de la prueba de los factores de variación, tipo y concentración de auxina para cada variable estudiada

66

I. RESUMEN

Se condujeron 2 investigaciones en donde primero se probaron diferentes concentraciones de carbón activado, y posteriormente diferentes tipos y concentraciones de auxina, para examinar el efecto que producen en el crecimiento y desarrollo de raíces de plantas de fresa cultivadas *in vitro*. Para los dos experimentos correspondientes, como medio de cultivo se emplearon las sales minerales modificadas de Murashige y Skoog (1962) al 50%, complementadas con 1 mg/l de tiamina dicloro, 100 mg/l de mioinositol, 30 g/l de sacarosa y 5 g/l de agar. Además, en el primer experimento se utilizaron 1 mg/l de ácido indolbutírico (AIB) y 0.0, 0.5, 1.0 y 2.0 g/l de carbón activado (CA); durante el segundo experimento se usó 1 g/l de CA y 0.5, 1.0, 1.5 y 2.0 mg/l de AIB y ácido naltalenacético (ANA), de tal forma que resultaron 4 tratamientos en el primer experimento y 8 en el segundo. Se utilizaron brotes vegetativos de fresa del cv Tioga, obtenidos a través de meristemas cultivados *in vitro*.

Las condiciones ambientales en las que se desarrollaron los experimentos fueron iguales, en ambos casos los brotes fueron cultivados en un cuarto con control de luz y temperatura, siendo la duración del fotoperíodo de 16 hrs, la temperatura se mantuvo en $27 \pm 1^{\circ}\text{C}$.

Los resultados obtenidos indican que al aumentarse la concentración de CA se incrementa el número y tamaño de raíces, mostrando ser estadísticamente superior el tratamiento con 1.0 g/l. Además cuando no se empleó CA se retrasó 30 días la transferencia a tierra.

Con relación al tipo de auxina, el AIB resultó ser el más efectivo, lográndose un 98.33% en el enraizamiento, así como un promedio de 3.6 raíces de 2.5 cm por planta.

La concentración de 1.5 mg/l mostró ser la más apropiada para los tipos de auxinas, tanto en el número como en el tamaño de las raíces.

En base a lo anterior se concluye que la utilización de carbón ac tivado permite incrementar la velocidad de enraizamiento así como el número y tamaño de raíz, siendo AIB la auxina que permite lograr los me jores resultados y la concentración de 1.5 mg/l la más apropiada.

II. INTRODUCCION

En México la importancia del cultivo de la fresa radica en ser uno de los principales productos de exportación, que a la vez genera una elevada demanda de mano de obra por unidad de superficie cultivada. Los Estados de Michoacán y Guanajuato son los principales productores de fresa, registrando para 1982 una participación promedio en la producción del 72.17% y 16.33% respectivamente, destinadas en su mayor parte a la exportación. Complementan los Estados de Jalisco, Querétaro, Aguascalientes, México, Veracruz y Zacatecas, quienes producen fundamentalmente para el mercado interno (DGEA, 1983).

En los últimos años la producción de fresa en el país ha disminuído tanto de fresa fresca como congelada, la cual durante el período de 1978-1982 decreció a una tasa promedio anual de 23.5%. Una de las causas principales por las que se presenta esta situación, es que últimamente se presentan problemas en la adquisición de plantas de fresa (importadas de California, E.U.A.), debido a la crisis económica que vive el país.

En el programa de siembra para exportación de fresa fresca y congelada autorizada para la temporada 1982-1983 por la S.A.R.H., la superficie a sembrar deberá operar sobre 3 223 has que se distribuirán entre Michoacán (64.9%) y Guanajuato (35.1%), por lo que será necesario contar con cerca de 97 millones de plantas (DGEA, 1983).

En vista de que en México, además de las restricciones para la importación, no se cuenta con una técnica eficiente para la producción ma

siva de planta de fresa, se plantea la necesidad de desarrollar procedimientos por medio de los cuales sean propagadas estas plantas para evitar la dependencia con Estados Unidos, evitando al mismo tiempo la fuga de divisas.

Como una alternativa, se ha propuesto el uso de la técnica de cultivo de tejidos, que es un método de propagación asexual que presenta las ventajas de obtener en corto tiempo, gran cantidad de plantas uniformes y libres de patógenos.

La finalidad del presente trabajo, es contribuir con las investigaciones realizadas en el Colegio de Postgraduados de Chapingo, Méx., en la obtención de plantas de fresa libre de virus, buscando una optimización de la metodología para obtener plantas en condiciones de ser transplantadas en el menor tiempo posible y con características tales como mayor número y tamaño de raíces, que le permitan un buen desarrollo.

Objetivos. Observar el efecto de la concentración del carbón activado sobre el número y tamaño de raíces en brotes de fresa, así como el resultado de la aplicación de diferentes concentraciones de ácido in dolbutírico y ácido naftalenacético en combinación con carbón activado en el enraizamiento de brotes vegetativos *in vitro*.

III. REVISION DE LITERATURA

1. Propagación *in vitro*

En los últimos años el cultivo de tejidos, propagación *in vitro* o micropropagación, ha tenido gran auge debido a las ventajas que presenta como son: multiplicación masiva y uniforme de plantas, obtención de plantas libres de virus, su utilización en el mejoramiento genético y como Banco de Germoplasma (Murashige, 1974; Cheng, 1978). Inicialmente esta técnica se aplicó en especies herbáceas (ornamentales) y se ha venido extendiendo hasta ser utilizada en especies leñosas, en las que ha tenido un desarrollo más lento (Cheng, 1978).

Para la propagación de plantas a través del cultivo de tejidos, se han establecido una serie de fases, cada una con un objetivo específico y requerimientos diferentes (Murashige, 1974; Villegas 1982b).

Villegas (1982b) caracteriza cuatro fases, tres *in vitro* y una *in vivo*:

- 1) Establecimiento del Cultivo Aséptico. La finalidad primordial es evitar la contaminación y que el propágulo logre tener crecimiento, adaptándose así a las condiciones *in vitro*; en algunos casos cuando se presentan problemas de oxidación, se requiere de la utilización de antioxidantes.
- 2) Multiplicación del Propágulo o Proliferación. En esta fase se busca el rápido aumento del material propagado (brotes vegetativos o callo), siendo importante determinar la concentración de auxinas y

citocininas más apropiado para cada caso.

- 3) Enraizamiento. Esta etapa comprende la inducción y crecimiento de raíces a partir de los brotes obtenidos durante la proliferación, requiriéndose de un medio nutritivo diluido y la eliminación de citocininas del medio de cultivo. Además, en ocasiones deben incluirse compuestos fenólicos para estimular el enraizamiento.
- 4) Y una etapa *in vivo*, que consiste en una aclimatación paulatina de las plantas obtenidas *in vitro*, para estar en condiciones de ser establecidas en campo.

En fresa se ha utilizado ampliamente el cultivo de tejidos, sobre todo para la obtención de plantas libres de virus (Vine, 1968; Smith *et al.*, 1970; Villalobos, 1977; Kartha *et al.*, 1980; McGrew, 1980) y en la conservación de material vegetativo por medio de la criopreservación y almacenamiento en frío (Freeman y Pepin, 1971; Daubeny *et al.*, 1976; Mullin y Shlegel, 1976). Además, se han realizado investigaciones encamiadas hacia la multiplicación masiva (Adams, 1972; Anderson *et al.*, 1982; Belkengren y Miller, 1962; Boxus, 1974; Cossio y Menin, 1982; Damiano, 1978 y 1980; James, 1979; James y Newton, 1977) pero muy pocas de ellas han puesto atención en la fase de enraizamiento.

2. Factores que afectan el enraizamiento *in vitro*

Existen diversos factores que afectan el enraizamiento *in vitro*

- Especie
- Concentración de sales minerales y otros compuestos del medio nutritivo

- Tipo y concentración de reguladores del crecimiento
- Cofactores de enraizamiento (compuestos fenólicos)
- Uso de carbón activado
- Condiciones ambientales
- Tamaño del propágulo, época de corte y edad de la planta madre

2.1. Especie

Se ha encontrado que existen diferentes respuestas al enraizamiento de las plantas *in vitro* dependiendo de la especie y aun de la variedad, existiendo plantas de fácil y difícil enraizamiento.

Adams (1972) reporta el haber obtenido diferentes porcentajes de plantas enraizadas de fresa de acuerdo al cultivar, logrando para el JL 1560 el 90%, en JL 2680 el 84% y en Cumberland 103/25 el 100%. Por su parte, Damiano (1978) menciona que no encontró diferencias significativas en las respuestas dadas por los cvs Gorello, Pocahontas, Belrubi, Fanil, Tioga, Primella y Aliso.

James (1979) reporta que existe una respuesta diferente en el enraizamiento entre los cultivos *in vitro* de *Fragaria* y *Rubus* al utilizar floriglucinol, incrementándose el enraizamiento en *Rubus*, no así en *Fragaria*.

Broome y Zimmerman (1978), reportan diferentes comportamientos de los cultivares de zarzamora probados en el cultivo *in vitro*, mencionando que dos de ellos (Black Satiny y Dirksen Thornless) proliferaron pocos brotes, probablemente como una consecuencia de su tendencia a enraizar;

agregan que esta inclinación que tienen hacia la producción de raíces, puede ser controlada cambiando las cantidades o proporciones de reguladores del crecimiento.

Skirvin *et al.* (1981) trabajando con brotes de zarzamora, encuentra una respuesta diferente al enraizamiento entre 3 cultivares utilizados, observando el mayor porcentaje de enraizamiento en el cv Thornless Boysenberry.

Singha (1982), estudiando el efecto de la concentración de ANA sobre el enraizamiento *in vitro* de manzano silvestre, encuentra que existen diferencias en la respuesta al enraizamiento entre los cvs Calorpa, Eleyi, Hopa y Almey, teniendo un mayor porcentaje de enraizamiento el cv Almey y el menor el cv Eleyi.

Németh (1981), menciona que los datos obtenidos en sus estudios de inducción de raíces adventicias en el cultivo *in vitro* de manzano, sugieren que dicha inducción, está fuertemente influenciada por los antecedentes genéticos del portainjerto o acodo en estudio.

Snir (1982) menciona que las condiciones para el enraizamiento *in vitro* del cerezo son diferentes a las del manzano, ya que este último presenta la tendencia a formar callo en la base.

2.2. Concentración de sales minerales y otros compuestos

Murashige (1974), señala que el medio de cultivo está compuesto por 3 clases de sustancias: sales inorgánicas, compuestos orgánicos y

compuestos naturales; menciona además, que la presencia o ausencia y la concentración de estos compuestos, dependerá de los requerimientos específicos de cada especie y de la fase en que se encuentre el propágulo.

Los medios de cultivo más frecuentemente utilizados en el enraizamiento *in vitro* de la fresa, son el de Murashige y Skoog (MS) y el de Boxus (1974), con algunas modificaciones; generalmente las sales minerales son reducidas al 50%, suprimidas las citocininas y utilizado 1 mg/l de auxina, siendo las más usadas el ácido indolacético (AIA) y ANA. Normalmente el medio se complementa con 100 mg/l de inositol, 0.1 mg/l de tiamina HCl, 0.5 mg/l de ácido nicotínico, 0.5 mg/l de piridoxina HCl y 20 mg/l de glicina.

Varios autores mencionan que la dilución de sales minerales del medio de cultivo elevan los porcentajes de enraizamiento (McGrew, 1980; Villalobos, 1980; Welandery Huntriesser, 1981; Snir, 1982; Singha, 1982; Villalobos *et al.*, 1983).

Algunos investigadores han demostrado que la fresa se adapta *in vitro* a diferentes mezclas de sales minerales (Vine, 1968; Adams, 1972; McGreen, 1980), y se ha propuesto la utilización de un medio más rico en nitrógeno (Lee y DeFossard, 1977; Damiano, 1980; Cossio y Menin, 1982).

Cossio y Menin (1982), probando tres soluciones de macroelementos (Knop, Zuccherelli y MS) durante la fase de enraizamiento en la micropropagación de fresa, reportan que el mayor enraizamiento se obtuvo en

el sustrato de Knop, tanto en el número de raíces como en la velocidad de enraizamiento, presentándose el menor enraizamiento en la solución MS a causa del retardo en la emisión y del más lento desarrollo de la raíz y sobre todo por la aparición de callo esponjoso en la base de la planta.

Damiano (1980) menciona que la fuente y cantidad de nitrógeno tiene una influencia considerable sobre el crecimiento y desarrollo de la planta de fresa cultivada *in vitro*, encontrando que los propágulos no desarrollan cuando únicamente el $(\text{NH}_4)\text{SO}_4$ es usado como fuente de nitrógeno y que concentraciones superiores a 3 mM son severamente tóxicos, en cambio utilizando nitratos como única fuente de nitrógeno se obtienen mejores resultados.

Skirvin *et al.* (1981) reportan la obtención de cerca del 80% de enraizamiento en el cultivo de zarzamora *in vitro* utilizando bajas concentraciones de sales minerales.

Hyndman *et al.* (1982) investigando la estimulación de iniciales de raíz en brotes de rosa (*Rosa hybrida* L.) a través del uso de concentraciones reducidas de sales minerales, obtienen el mayor incremento en el número y longitud de raíces, así como en la velocidad de enraizamiento, cuando utiliza las sales minerales de MS al 50%, exceptuando las sales de nitrógeno, las cuales son reducidas en un mayor grado (de 60 a 7.5 μM); concluyendo que la reducción en la concentración es la razón predominante para el mejor enraizamiento de brotes de rosa.

Werner y Boe (1980) señalan que el alto porcentaje de enraizamiento que obtuvieron (88% a los 18 días y 100% a los 28 días) en brotes del portainjerto Malling Merton 7, probablemente se deba a la reducción de sales minerales a 1/3 de su concentración. Resultados similares reporta Lane (1978), quien obtiene una mejor inducción de iniciales de raíz en un medio que contenía las sales minerales al 50%, mencionando que la eficiencia del enraizamiento tiende a incrementarse al disminuir la concentración de sales.

Otros compuestos del medio nutritivo

Lane (1978) menciona que es importante mantener los niveles normales de sacarosa (3%) ya que con la utilización de dosis inferiores al 2% sólo permiten la aparición de brotes sanos pero no de raíces y que niveles superiores al 5.2% causan una disminución en el enraizamiento.

Snir y Erez (1980), en la propagación *in vitro* del portainjerto Malling Merton 104, 106 y 109, encuentran que existe una relación dependiente entre el contenido de azúcar en el medio y el desarrollo de la raíz, obteniendo un 100% de enraizamiento en el medio completo, mientras que en el medio sin azúcar las raíces no muestran desarrollo.

Zimmerman y Broome (1980a), trabajando con ocho cultivares de manzano, encuentran que la eliminación total de sacarosa del medio de enraizamiento reduce éste hasta cerca del 25% en comparación con cualquiera de las dosis (15-60 g/l), las cuales no presentan variaciones en el efecto sobre el enraizamiento de los cultivares probados.

Snir (1981) reporta que la frambuesa, a diferencia de otras plantas como el manzano y el cerezo, no requiere de la fuente de azúcar para su enraizamiento.

Broome y Zimmerman (1978), en la propagación *in vitro* de zarzamora encuentran que, a diferencia de la etapa de proliferación, durante la etapa de enraizamiento es mejor el uso del medio sólido.

Werner y Boe (1980) mencionan que las bajas concentraciones de agar en el medio (0.27%), aumentan el porcentaje de enraizamiento y facilitan el transplante, causando un daño mínimo a la raíz.

Snir y Erez (1980) reportan un mayor crecimiento de los brotes de manzano en un medio líquido que en un medio con agar y lo atribuyen a un posible incremento en la absorción de hormonas y nutrientes del medio, no sólo a través de la base sino de toda su superficie. Resultados similares son reportados por Zimmerman (1980).

Lee y Fossard (1977) mencionan que las vitaminas tales como la biotina, pantotenato de calcio, riboflavina, ácido ascórbico y cloruro de colina, muestran una gran influencia sobre el crecimiento y desarrollo *in vitro* de la planta de fresa.

2.3. Tipo y concentración de Reguladores del Crecimiento

Everett *et al.* (1977) mencionan que dentro del cultivo *in vitro*, el mayor control del proceso de crecimiento y desarrollo de la planta es ejercido por los niveles de los reguladores del crecimiento, parti-

cularmente por las auxinas y citocininas.

Skoog y Miller citados por Cheng (1978) reportan que la interacción auxina-citocinina dá por resultado la formación de raíces y brotes, encontrando que para la formación de raíces se requieren concentraciones relativamente altas de auxina con respecto a citocininas.

Damiano (1980) menciona que la adición de reguladores del crecimiento al medio de cultivo varía de acuerdo a la fase de propagación *in vitro*, por lo que recomienda la utilización de 1 mg/l de AIB pero sin la adición de giberelinas ni citocininas durante la fase de enraizamiento. La misma sugerencia es hecha por Anderson *et al.* (1982) quienes utilizando 2 ó 5 μM de AIB, obtienen plántulas en condiciones de ser transplantadas a las tres o cuatro semanas de haber sido colocadas en el medio de enraizamiento. En cambio McGrew (1980) no utiliza ningún regulador del crecimiento durante esta fase.

Swartz *et al.* (1981) emplea el medio propuesto por Boxus (1974) pero con la supresión de BA, obteniendo plántulas de fresa en condiciones de ser transplantadas a las 4-6 semanas de haber sido colocadas en el medio para enraizamiento. Del mismo modo, Villegas (1983) sugiere la eliminación de BA del medio de cultivo.

Kartha *et al.* (1980) en sus estudios sobre propagación masiva de plántulas y criopreservación de meristemas de fresa, señalan que el enraizamiento fue obtenido transfiriendo los brotes obtenidos durante la fase de propagación masiva, a un medio MS conteniendo un bajo nivel de

BA ($1 \mu\text{M}$) o en combinación con $1 \mu\text{M}$ de ANA y que también se observó un buen porcentaje de enraizamiento en un medio sin reguladores del crecimiento.

James y Newton (1977) en su trabajo enfocado a determinar las proporciones óptimas de auxina-citocinina (AIB y 6-BAP) para la formación de brotes y raíces de fresa *in vitro*, encuentran que el enraizamiento de todos los cultivares ocurre en ausencia de citocininas siempre y cuando el contenido de AIB no sea alto y que las mejores concentraciones para la obtención de un mayor número de raíces adventicias se encuentra en un rango de 0.5 a $2.5 \mu\text{M/l}$ de AIB. Mencionando además, que se llega a obtener poco enraizamiento en presencia de 6-BAP, y que a medida que la concentración aumenta se va incrementando el tiempo requerido para el enraizamiento.

Damiano (1980) usando un medio que contiene los macronutrientes de Knop, los micronutrientes de Murashige y Skoog, vitaminas, 40 mg/l de glucosa, 8 g/l de agar y 1 mg/l de AIB, reporta el reverdecimiento de hojas y la elongación de la plántula, así como la formación de raíces entre el décimo y doceavo día, alcanzando una longitud de 3 a 4 cm entre los 25 y 30 días.

Varios autores mencionan que el uso de ANA promueve el crecimiento de callos, impidiendo la formación de raíces en fresa (Villalobos, 1977; James, 1979; Waitaka *et al.*, 1980).

Adams (1972) reporta la utilización de un solo medio de cultivo

para todas las fases de propagación *in vitro* de fresa y obtenido un porcentaje de enraizamiento del orden del 80 al 100% entre el primero y el segundo mes, usando 1 mg/l de AIB y 0.1 mg/l de BA.

Anderson (1982) ha observado que en una alta concentración de BA y presencia de AIB, se incrementa la frecuencia de una anomalía morfológica en plantas de fresa cultivadas *in vitro*, conocida como "ápices múltiples"; que la adición de GA₃ disminuye la incidencia de plantas afectadas, y que la frecuencia de esta anomalía varía grandemente entre diferentes cultivares.

Snir (1981) trabajando con frambuesa roja, menciona que este cultivo no necesita de hormonas para el desarrollo de las raíces. Sin embargo, Shchelkunova citado por Anderson (1980a), menciona que el ácido indolbutírico es la auxina más adecuada para ser utilizada en este cultivo.

Broome y Zimmerman (1978) utilizando durante la fase de enraizamiento *in vitro* de zarzamora, las sales minerales de MS, suplementadas con 0.4 mg/l de tiamina HCl, 100 mg/l de mioinositol, 30 g/l de sacarosa, 7 g/l de agar y 1 mg/l de AIB, obtienen propágulos enraizados en un período de 3 a 4 semanas. Por otro lado, Skirvin *et al.* (1981) reportan la obtención del 80% de enraizamiento en zarzamora utilizando bajas concentraciones de ANA.

Litz y Conover (1978) en la propagación *in vitro* de papaya, reportan que la regeneración de raíces no fue observada en ninguna de las

formulaciones de proliferación; en cambio, la transferencia de yemas axilares hacia el medio nutritivo sin reguladores del crecimiento restablece la dominancia apical, pero no favorece el desarrollo de la raíz y sólo con la adición de 0.5 - 5 μ M de AIB ó 0.5 - 15 μ M de ANA en el medio nutritivo, ocurrió la formación de raíz, resultando ser la mejor dosis para el enraizamiento 5 μ M de ANA.

Zimmerman y Broome (1980b) en la micropropagación de arándano, reportan que independientemente de la presencia o ausencia de auxina, se obtuvo un éxito limitado en el enraizamiento, ya que aun cuando los porcentajes de enraizamiento fueron altos existió formación de grandes masas de callos y las raíces adventicias se desarrollaron mejor en el aire que en el medio.

Snir (1982) utilizando brotes obtenidos *in vitro* de 4 cvs de cerezo (*Prunus avium* L.) y puestos a enraizar en un medio que contenía las sales minerales de MS al 50%, 2% de sacarosa, 0.8 mg/l de tiamina, 100 mg/l de mioinositol, 0.7% de agar y 1 mg/l de AIB ó 0.5 mg/l de ANA; reporta una mayor tasa de enraizamiento con ANA que con AIB, mencionando además, que el efectuar una incisión en un lado del brote significó un incremento en el número de raíces por brote, teniendo un porcentaje de enraizamiento (a los 16 días) con AIB de 87% y con ANA de 90%, y un número de raíces por brote de 10.1 ± 1.2 con AIB y de 11.5 ± 1.0 con ANA; en cambio, sin incisión obtuvieron un enraizamiento del 62% con AIB y 80% con ANA siendo el número de raíces 5.4 ± 0.9 y 7.3 ± 0.7 respectivamente.

Villegas y Barrientos (1982) reportan que durante la fase de enraizamiento *in vitro*, al utilizar 1 mg/l de AIB en el medio de cultivo, obtienen el 85% de enraizamiento y 3 raíces de 4 cm en 6 semanas en ciruelo mirabolano.

Miller *et al.* (1982) utilizando diferentes niveles de BA (0.0 y 0.1 mg/l) y ANA (0.0, 0.1, 1.0 y 2.0 mg/l), mencionan que el enraizamiento ocurre en todos los tratamientos, pero fue mayor con 0.1 mg/l de ANA y sin BA, obteniendo después de 6 semanas el 95% de brotes de durazno enraizados.

Villegas (1982a) menciona que uno de los mayores problemas en la propagación *in vitro* del manzano, es la formación de raíces y por ello, sugiere la eliminación de las citocininas y el aumento de auxinas del medio de cultivo.

Lane (1978) encuentra que las altas concentraciones de auxina inhiben el enraizamiento; menciona que esto puede deberse al crecimiento excesivo de callo, ya que cuando hay un crecimiento reducido de callo a altas concentraciones de auxina, las iniciales de raíz son rápidamente inducidas.

Villegas (1982a) trabajando con 5 cultivares de manzano durante la fase de enraizamiento, reporta que la utilización de 1 mg/l de AIB provoca un desarrollo excesivo de callo en la base de las estacas, la detención del crecimiento y la defoliación de hojas; alude que esto pudo haber sido ocasionado porque en ese nivel de auxina se promueve la di-

visión celular, favoreciendo el crecimiento de callo en la base e inhibiendo correlativamente el crecimiento de la parte apical, al mismo tiempo que estimula la liberación de etileno ocasionando senescencia y abscisión de las hojas.

Singha (1982) trabajando con cuatro cultivares de manzano silvestre (Almey, Eley, Hupa y Calorpa) en un medio de cultivo para enraizamiento, utilizando diferentes concentraciones de ANA (0, 0.1, 0.2, 0.4 y 0.8 mg/l), obtiene el mayor porcentaje de enraizamiento para todos los cultivares con 0.4 mg/l, pero menciona que el tamaño y desarrollo de raíces secundarias es inhibido, siendo mejor la utilización de niveles de 0.1 y 0.2 de ANA, ya que aunque no se obtienen los mayores porcentajes de enraizamiento, éstos son buenos presentándose un buen crecimiento y desarrollo de raíces.

Zimmerman y Broome (1981) mencionan que en la mayoría de los cultivares de manzano probados, una baja concentración de AIB (0.1 mg/l) es efectiva para promover el enraizamiento y suficiente para producir un sistema de raíces bien desarrollado; sin embargo, al utilizar 1 mg/l de AIB se estimuló la producción de callo en la base del corte, causando la malformación de raíces e inhibiendo el crecimiento de brotes.

Németh (1981) encuentra, trabajando con portainjertos de manzano, que las auxinas sintéticas: 2-cloro-3 (3-cloro-2 fenilo de metil) propionitrilo (CCMPNN), 2-cloro-3 (2, 3-diclorofenil) propionitrilo (CDPPN) y 2-cloro-3-(2,3 diclorofenil) butironitrilo (CDABN) son activas como hormonas de enraizamiento, que tienen menos efectos inhibitorios en al-

tas concentraciones que el AIB, encontrando que 5×10^{-6} M es la concentración óptima para la inducción de raíces, y que después de esterilizarlos por filtro, pueden incluirse entre las auxinas utilizadas para la inducción de raíces en micropropagación, siendo el CDPPN el más efectivo.

2.4. Cofactores de enraizamiento

Varios autores han mencionado la ventaja de usar compuestos fenólicos durante la etapa de enraizamiento (Jones y Hatfield, 1976; Welander y Huntrieser, 1981; Jones *et al.*, 1980; Cruz, 1983), sin embargo, otros han encontrado que no tiene ventajas y aún más, que son inhibitorios (Snir y Erez, 1980; Zimmerman y Broome, 1981).

Welander y Huntrieser (1981) mencionan que la eficiencia de un compuesto fenólico varía con la especie de planta y que no muestra ningún efecto promotor cuando son aplicados solos, especialmente en especies de madera.

Pialkoswiki *et al.* (1973) citado por James (1979) mencionan que la efectividad de una combinación en particular de auxina-fenol, varía con la especie y que dentro de las rosáceas hay la posibilidad de controlar el enraizamiento por el sinergismo auxina-fenol, lo cual puede ser sólamente importante en el cultivo de plantas leñosas.

James (1979) investigando sobre el papel que juegan las auxinas y el floriglucinol en la formación de raíces adventicias en los cultivos

in vitro de *Rubus* y *Fragaria*, utilizando el medio de cultivo reportado por Jones *et al.* (1977), complementado con 5×10^{-6} M de AIB o ANA, y 1×10^{-3} de floriglucinol (FG) solos o combinados, reporta que el floriglucinol tiene un efecto estimulador sobre el enraizamiento del híbrido *Rubus* pero no así en fresa, donde su papel parece ser el de regulador de enraizamiento homogéneo de las partes en desarrollo. En el híbrido *Rubus* existió un efecto sinérgico significativo entre el AIB y el floriglucinol, obteniéndose el 100% de enraizamiento con el floriglucinol más AIB, el 95% con floriglucinol y el 92% con AIB; en cambio, en fresa se vio que el floriglucinol puede sustituir al AIB pero la presencia de ambos reduce el enraizamiento, ya que con AIB más FG se observa el 80% de enraizamiento, con AIB el 90% y con FG el 80%. Además, reporta que el ANA demostró no tener efectos sinérgicos con el floriglucinol.

Broome y Zimmerman (1978) mencionan que el floriglucinol es un componente innecesario en la propagación *in vitro* de zarzamora. Sin embargo, James *et al.* (1980) en el cultivo de tejidos de frambuesa, utilizando 1 mg/l de BA y 1 mg/l de AIB, encontraron que la adición de 162 mg/l de floriglucinol incrementaba la multiplicación de brotes y que era además benéfico en el medio de enraizamiento.

Chin (1982) prueba dos medios para la promoción de brotes y raíces de espárrago *in vitro*, uno conteniendo ancymidol y el otro sin él; los demás componentes para ambos medios fueron iguales. Encontró que en el medio sin ancymidol no hay brotes enraizados en dos semanas; en cambio, en el medio con ancymidol el 28% de los brotes enraizaron en dos sema-

nas y el 100% enraizaron en 5 semanas, reduciéndose el período para el trasplante de 20 hasta 8 semanas. Además, los brotes y raíces desarrollados con ancymidol fueron más vigorosos que los desarrollados sin él, y por otro lado, suprime también la formación de callo.

Villegas y Barrientos (1982) al utilizar brotes de 2 a 3 cm de ciruelo mirabolano, desarrollados anteriormente *in vitro*, al colocarlos sobre un medio de cultivo conteniendo las sales minerales de MS al 50%, complementado con 30 g/l de sacarosa, 5 g/l de agar, 100 mg/l de mioinositol, 1 mg/l de tiamina, 1 mg/l de AIB, floroglucinol y BA, encontraron que cuando los brotes son colocados durante 6 días sobre un medio con AIB más floroglucinol y después transferidos a un medio sin reguladores de crecimiento, en dos semanas se logra el 60% de enraizamiento, en 3 semanas el 80% y en 4 semanas el 100%, y cada brote presenta 4 raíces de más de 4 cm; mientras que cuando los brotes son mantenidos en un medio con AIB más floroglucinol, en 4 semanas se tiene el 80% de enraizamiento pero con raíces de 1 cm.

Jones y Hatfield (1976) en el enraizamiento *in vitro* de brotes del portainjerto M26, utilizando diferentes compuestos fenólicos (floroglucinol, ácido florético, pirogalol, ácido caféico y catecol), en combinación con auxinas (AIB, AIA y ANA), mencionan que en ausencia de estos compuestos no hay formación de raíces; que el floroglucinol y el ácido florético incrementan marcadamente el porcentaje de enraizamiento; no así el ácido caféico, el pirogalol y catecol. El mayor porcentaje de enraizamiento lo obtuvieron a concentraciones de 5×10^{-6} M, siendo mejor la utilización de AIB (85% de enraizamiento), siguiendo AIA (50%)

y por último ANA (40%); mencionan además, que los compuestos fenólicos no son efectivos en ausencia de auxinas.

Welander y Huntrieser (1981) utilizando las sales minerales de MS al 50%, suplementadas con 100 mg/l de mioinositol, 30 g/l de sacarosa, 0.4 mg/l de tiamina y 7 g/l de agar, agregando durante la fase de enraizamiento 5, 10 ó 15 x 10⁻⁶ M de AIB combinados con 0, 10⁻⁵, 10⁻⁴ y 10⁻³ M de floroglucinol en el cultivo *in vitro* de brotes de manzano A₂, reportan que el efecto de la promoción en la iniciación de raíces depende de las concentraciones de AIB y floroglucinol, existiendo una acción sinérgica entre ellos; mencionando además, que el floroglucinol tiene efectos benéficos para el enraizamiento, ya que al ir aumentando las concentraciones de AIB, el crecimiento de la raíz muestra la tendencia de disminuir hasta suprimirse, esta inhibición puede ser evitada utilizando 10⁻³ y 10⁻⁴ M de floroglucinol. Por otro lado, se observa que el floroglucinol a 10⁻³ M reduce la formación de callosidades en todas las concentraciones de AIB. Es recomendable el uso de 10 µM de AIB junto con 10⁻⁴ M de FG para la propagación práctica del cv A₂, tanto de propágulos provenientes de plantas en fase juvenil como adulta.

Zimmerman y Broome (1981) probando el efecto del floroglucinol y el AIB durante la fase de enraizamiento *in vitro* de 8 cvs de manzano, encuentran que el floroglucinol incrementa el enraizamiento únicamente en el cv Spartan, no teniendo efecto o siendo éste inconsistente en los otros 7 cultivares y que la sensibilidad de estos cultivares a las bajas concentraciones de AIB, puede relacionarse con su falla

para responder al FG. Mencionan además, que al incorporar AIB dentro del medio, se incrementó el enraizamiento marcadamente en comparación con el obtenido con FG; sin embargo, concluyen que el FG tiene un efecto benéfico sobre el enraizamiento, reduciendo o previniendo la formación de callo.

Villegas (1982a), en el enraizamiento *in vitro* de los cvs de manzano Elah, Michal, Tropical Beauty y Pettingill, menciona que la utilización de 160 mg/l de FG en el medio de cultivo favorece el desarrollo de raíces en todos los cultivares probados.

Cruz (1983) menciona que al emplear 162 mg/l de FG más AIB en el medio de cultivo, para el enraizamiento *in vitro* de manzano, permite incrementar al doble el porcentaje de enraizamiento de cuando solamente es usado AIB.

2.5. Carbón activado

El carbón activado (CA) era ya utilizado en el siglo XV como de colorante; posteriormente fueron descubriéndose sus propiedades como adsorbente de olores y sabores, utilizándose para la purificación del azúcar de caña, aceites y grasas comestibles, agua potable, productos químicos, farmacéuticos, etc.

Existen dos tipos de carbón activado: los blandos y de baja densidad usados para la purificación en fase líquida, y los muy densos utilizados para la adsorción de gases. El primero es el más utilizado

debido a que la adsorción suele ser mayor en soluciones acuosas, siendo casi todas las sustancias adsorbidas más fácilmente del agua que de los disolventes orgánicos.

Diferentes materiales pueden ser empleados como fuente de CA (madera, aserrín, turba, huesos, lignita, etc.) así como también diferentes activantes (ácido bórico, azufre, cloruro de zinc, gas sulfuroso, etc.); dependiendo de éstos y otros factores, como son las propiedades químicas y físicas de las sustancias adsorbibles, el disolvente utilizado, el pH, la presencia simultánea de dos o más solutos, la temperatura, la duración del tiempo de exposición, el método de activación, etc., va a variar el grado de adsorción (Othmer, 1965).

El carbón activado ha sido empleado para estimular formación de embriones, eliminación de oxidación y estimular el crecimiento de raíces en algunos frutales (Wang y Huang, 1976).

Proskaver y Berman (1970) reportan efectos favorables de la adición de CA al medio de cultivo de algas filamentosas y protonema de musgo, atribuyendo estos efectos al oscurecimiento del medio por el carbón, imitando así las características de estimulación que se tienen en el suelo; no obstante, Wang y Huang (1976) mencionan que el efecto del CA no puede ser adjudicado a la condición de oscuridad ya que, en pruebas realizadas por ellos, al cubrir el vaso de cultivo con papel aluminio o colocar el cultivo en oscuridad constante, no se obtienen los mismos resultados que usando CA, y que más bien el mejor crecimiento es debido a que adsorbe metabolitos tóxicos producidos por la planta, lo cual con-

cuerda con lo propuesto por Klein y Boop (1971) quienes además agregan que sólo obtuvieron buenos resultados (con embriones de palma y yemas de gengibre) en el medio que contenía 3 g/l de CA y que la concentración de 0.5 g/l no tuvo ningún efecto significativo.

Damiano (1978) menciona que la adición de CA al medio de cultivo, en la fase de enraizamiento en micropropagación *in vitro* de fresa, acorta el período para la emisión de raíces, acelerando la velocidad de crecimiento. La aparición de raíces en el tratamiento con carbón activo se observa antes del octavo día con una velocidad de aumento de 3.7 mm cada 24 hrs; en cambio, en tratamiento sin CA, la emergencia ocurre al doceavo día de cultivo con una velocidad de aumento de 2.0 mm cada 24 horas. También menciona, en base a los resultados obtenidos, que lo importante es la incorporación de CA y no la cantidad empleada, mas no indica cuál es la cantidad mínima de CA que hay que añadir a la solución para obtener resultados satisfactorios.

Snir (1981) utilizando el medio de Boxus, excepto los microelementos los cuales fueron reemplazados por los de MS, con doble dosis de FeEDTA (40 mg/l) y 5 g de CA, sin reguladores del crecimiento; reporta que cuando el carbón activado fue omitido los brotes de frambuesa no enraizaron, que sólo se logró cerca del 10% de enraizamiento después de dos meses, pero cuando los brotes eran sacados de los tubos de prueba y plantados en pelets Jiffi-7, se logró un rápido enraizamiento. En dos semanas la mayoría de los brotes ya habían enraizado.

Anderson (1980b) probando el efecto de AIB (0.0 - 1.6 mg/l) y del

CA (600 mg/l) en el cultivo de tejidos de frambuesa roja, reporta un mayor porcentaje de enraizamiento (97.3%) cuando está presente el CA que cuando no lo está (55.8%); mencionando que la adición de AIB no tuvo ventaja particular sobre el porcentaje o índice de enraizamiento; sin embargo, el crecimiento total de la planta fue mayor cuando se usó AIB en combinación con CA.

Reuveni y Lilien-Kipnis (1974) citados por Wang y Huang (1976), mencionan que en cultivo de tejidos de palma datilera, así como en otras especies, ha sido observado que se desprende una sustancia intensamente coloreada en el medio, que aparentemente inhibe el desarrollo del tejido cultivado y que la inhibición es superada, pero hasta cierto límite, por la adición del CA al medio nutritivo.

Fridborg y Erickson (1975) utilizando dosis de 0.1%, 1%, 2% y 4% de CA, encuentran que éste inhibe totalmente el desarrollo de células en suspensión de *Glycine max* y *Haplopappus gracilis*, lo cual piensan es debido a que el carbón activado adsorbe sustancias, una de las cuales puede ser la auxina.

Constantin *et al.* (1977) probando el efecto del CA en el crecimiento y organogénesis del tabaco, encuentran que la presencia de CA causa la inhibición de callos y la eliminación del desarrollo de los brotes, argumentando que esto es debido a que las hormonas o nutrientes, presentes en el medio y requeridos para el crecimiento de callos y desarrollo de brotes, son adsorbidos por el CA. También hacen mención de que la habilidad que tienen para enlazar, no va a ser la misma para to

dos los ingredientes del medio y que por el momento sólo se ha estudiado con el AIA, 2ip y la sacarosa, encontrando que el CA sí presenta habilidad para enlazar el AIA y el 2ip pero no a la sacarosa, y que el efecto del CA sólo se observa con la presencia de hormonas.

Snir y Erez (1980) trabajan con brotes del portainjerto de manzano Malling Merton 104, 106 y 119 y utilizan dos medios durante la fase de enraizamiento; el primero conteniendo 1 mg/l de AIB para la iniciación de raíces y el segundo sin AIB, pero con 0.25% de CA, con la finalidad de obtener un mejor desarrollo de raíces. Encuentran que la disminución del período de tratamiento con AIB a sólo 6-8 días evita la formación de callo en la base del brote y que la influencia del CA en el medio, es expresada en la longitud de la raíz (24.5 ± 0.5 mm con CA contra 16.7 ± 0.5 mm sin CA); indican que esto puede ser explicado por la adsorción del exceso de AIB y de otras sustancias inhibitorias del crecimiento desarrolladas en el medio, así como por el efecto de la oscuridad.

Cruz (1983) utilizando 0.2 y 0.5 mg/l de AIB más 1 g/l de CA no obtuvo enraizamiento en el cv Elah ni en el portainjerto MM 106, mencionando que fue debido a que las auxinas quedaron adsorbidas en el CA, no pudiendo manifestar su efecto sobre el enraizamiento, lo cual indica que de emplear el CA deben utilizarse dosis más elevadas de AIB.

2.6. Condiciones ambientales

Cheng (1978) menciona que el medio ambiente (intensidad lumínica, calidad de luz, fotoperíodo y temperatura) bajo el cual se desarrolla

el propágulo *in vitro* tienen una gran influencia sobre la formación de brotes y raíces.

Lee y Fossard (1977) probando diferente duración del fotoperíodo, concluyen que dependiendo de la duración de éste en la incubación del tejido, se requiere el uso de distintos medios de cultivo para optimizar el crecimiento y desarrollo de la fresa *in vitro*. Menciona además que el uso de bajas concentraciones de auxina y altas concentraciones de citocinina parecen mejorar la tasa de crecimiento de cultivos incubados en oscuridad; en cambio, con altas concentraciones de auxina y bajas de citocinina se obtienen mejores resultados en cultivos con 12 hrs luz/12 hrs oscuridad. Por otra parte, Kartha *et al.* (1980) menciona que la formación de raíces en brotes de fresa se aumenta cuando el cultivo es incubado bajo poca intensidad de luz (400-600 lux).

Millar y Stace-Smith, citados por Snir (1981), concluyen que las altas temperaturas aumentan el potencial de enraizamiento en los propágulos de frambuesa.

Algunos autores mencionan que durante la obtención de plantas libres de virus en fresa, al ser la planta madre sometida a tratamientos con calor, los propágulos tomados de ellas tienen un mejor y más rápido crecimiento y desarrollo en comparación con las que no fueron tratadas (Vine, 1968; McGrew, 1980).

2.7. Tamaño del propágulo, época de corte y edad de la planta madre.

Vine (1968) en su investigación sobre la utilización del cultivo de tejidos para obtener plantas de fresa libres de virus, señala que los propágulos menores de 0.4 mm enraizaron con más dificultad que los grandes (0.4 a 0.8 mm), teniendo además un desarrollo más lento hasta llegar al tamaño adecuado para el trasplante.

McGrew (1980) trabajando con propágulos de fresa de 0.1 a 2.5 mm, menciona que existe una relación entre el tamaño del propágulo y el enraizamiento, encontrando que a mayor tamaño del propágulo se obtiene un mayor porcentaje de enraizamiento.

Boxus y Quoirin (1977) estudiando el comportamiento de árboles frutales (*Prunus* y *Malus pumila*) obtenidos a partir del cultivo *in vitro*, mencionan que uno de los factores que influyen en la obtención de un mayor o menor número de plantas, así como en su vigor, es la fecha de extracción.

Adams (1972) obtiene mayores tasas de enraizamiento en propágulos de fresa tomados en Junio (91%) que en las extraídas en Mayo (20%), aunado con una mayor velocidad de enraizamiento para la primera fecha. En cambio, Daubeny *et al.* (1976) mencionan que las condiciones más favorables para la extracción de propágulos de fresa, es en primavera, debido a que en esta época comienza el crecimiento. La misma opinión es compartida por Schelkunova citado por Anderson (1980a), quien estudiando los efectos estacionales sobre las explantas de frambuesa roja cul-

tivada *in vitro*, encontró que el tiempo óptimo para la implantación de este cultivo iba desde Marzo hasta Junio.

Welander y Huntrieser (1981) en el cultivo *in vitro* de manzano A2, menciona que la fase de crecimiento de la planta madre va a tener un efecto determinante en la iniciación y crecimiento de raíz, obteniéndose mejores resultados con propágulos provenientes de plantas jóvenes.

Gupta *et al.* (1980) en sus estudios sobre el cultivo de tejidos en árboles forestales, reporta que la concentración de citocininas para la iniciación de brotes y de las auxinas para el enraizamiento, fue más alto para las explantas provenientes de árboles maduros que para las de plántulas de semilla, obteniendo un mayor y más rápido enraizamiento en brotes originados de plantas jóvenes.

Gupta *et al.* (1981) utilizando diferentes concentraciones y combinaciones de AIA, AIB, AIP, ANA y 2,4-D, reportan que el enraizamiento sólo pudo ser inducido por ANA en los brotes de eucalipto, provenientes de árboles de 20 años únicamente después del tercer subcultivo, en cambio, en brotes de plántulas y árboles de 4 años, hubo enraizamiento desde el primer subcultivo, usando diferentes concentraciones y combinaciones de auxinas. Menciona además, que para el posterior desarrollo de raíces es conveniente, a las 48 hrs, transferirlos a un medio libre de reguladores.

3. Conclusión de la Revisión de Literatura

Existen diferencias en la respuesta al enraizamiento entre diferentes cultivares de fresa; sin embargo, en algunos casos estas diferencias no son significativas.

El medio de cultivo es uno de los factores que tiene mayor importancia en el crecimiento y desarrollo de los tejidos vegetales *in vitro*; habiéndose demostrado que durante la fase de enraizamiento, la dilución de sales minerales del medio de cultivo eleva los porcentajes y velocidad de enraizamiento, así como también el número y longitud de raíces.

La producción y desarrollo de raíces puede ser controlada cambiando los tipos, proporciones y cantidades de reguladores del crecimiento. La eliminación de citocininas del medio de cultivo es recomendable en la fase de enraizamiento. Las altas concentraciones de auxina promueven el desarrollo de callo. Diferentes tipos y concentraciones de auxina han sido probados en el crecimiento y desarrollo de la fresa *in vitro*, pero son pocos los reportes realizados específicamente sobre su efecto en el enraizamiento.

El uso del floriglucinol no incrementa el enraizamiento *in vitro* de fresa, siendo importante su uso especialmente en algunas plantas semileñosas y leñosas.

La adición de carbón activado al medio de cultivo produce efectos favorables en la fase de enraizamiento en varios frutales, ya que incrementa la longitud de raíz, así como el porcentaje y velocidad de

enraizamiento. Sin embargo, en fresa sólo Damiano ha trabajado con CA, encontrando que es la incorporación lo importante y no la dosis empleada.

Las altas temperaturas y baja intensidad luminosa (400-600 lux), aumentan el potencial de enraizamiento.

Existe una relación entre el tamaño del propágulo y el enraizamiento, siendo ésta directamente proporcional.

Hay controversias en lo referente a cuándo es la época adecuada para realizar la extracción del propágulo de la planta madre.

En los reportes publicados una de las deficiencias que se observan es que varios autores no mencionan los parámetros considerados para cuantificar el enraizamiento y sólo reportan si obtuvieron o no buenos resultados, así como tampoco mencionan las condiciones específicas de temperatura y luz, bajo las cuales se desarrollaron.

IV. MATERIALES Y METODOS

1. Localización

El presente estudio fue realizado en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos del Programa de Fruticultura del Centro de Genética del Colegio de Postgraduados de Chapingo, Méx.

2. Descripción del material vegetativo

Fueron utilizados brotes vegetativos obtenidos de meristemas cultivados *in vitro* de plantas de fresa del cv Tioga, desarrollados en un lote del Campo Experimental de San Martín.

Las características del cv Tioga son las siguientes: Originado en Davis, California por Bringhuerst, R. S. y Voth, V.; es pariente de los cvs Fresno y Torrey, proveniente de la crusa Lassen x California 42.8-16; crusa hecha en 1953 y seleccionada en 1955, es introducida comercialmente en 1963. Planta con muy alta producción, vigorosa, altamente susceptible a marchitez por *verticillium* y moderadamente resistente a virus, manifestando ocasionalmente síntomas del enchinado de las hojas, un tanto resistente a la salinidad. Adaptable a todas las áreas de cultivo de California, particularmente en plantación de verano. El fruto tiene un peso promedio de 12 a 14 g, es largo y cónico, de forma acuñada, piel rojo-brillante; aquenios amarillos que brillan en la superficie, pulpa medio roja, excepcionalmente firme, de buen sabor; de 7 a 10% de sólidos solubles con acidez media, excelente para el embarque y con producción muy alta, comparada con otros cultivares incluyen

do el Fresno (Brooks y Olmo, 1972).

3. Medio de cultivo

El medio de cultivo empleado fue una modificación del de Murashige y Skoog (MS) (1962), el cual se elaboró de la siguiente manera: primeramente fueron preparados grupos de sales minerales (soluciones madre I, II, III, IV y V; Cuadro 1A), de las cuales se emplearon 5 ml de cada solución para preparar un litro de medio de cultivo y se vertieron sobre un matraz aforado de 1 litro que contenía 600 ml de agua tridestilada, siguiendo el orden correspondiente. Los demás componentes del medio variaron de acuerdo al experimento que se estuviese realizando y que a continuación se menciona:

a) Enraizamiento empleando carbón activado. Las sales minerales diluidas al 50% fueron complementadas con 1 mg/l de tiamina dicloro, 100 mg/l de mioinositol, 1 mg/l de AIB, 30 g/l de sacarosa y 5 g/l de agar. El carbón activado fue agregado al mismo tiempo que el agar en las siguientes cantidades: $C_1 = 0.0$ g/l, $C_2 = 0.5$ g/l, $C_3 = 1.0$ g/l y $C_4 = 2.0$ g/l.

b) Efecto de AIB y ANA en el enraizamiento con carbón activado. Las sales minerales diluidas al 50% fueron complementadas con 1 mg/l de tiamina dicloro, 100 mg/l de mioinositol, 30 g/l de sacarosa, 5 g/l de agar, 1 g/l de CA y las auxinas se agregaron de acuerdo a las siguientes concentraciones:

Concentración	AIB	ANA
0.5 mg/l	A ₁	A ₅
1.0 mg/l	A ₂	A ₆
1.5 mg/l	A ₃	A ₇
2.0 mg/l	A ₄	A ₈

Para ambos experimentos el pH se ajustó a 5.7 con NaOH o HCl 1 N y fue medido con un potenciómetro (Corning Model 12) antes de agregar el agar y el CA. Para que se disolviera el agar se colocó en "Baño María" dentro de una olla de presión (90°C durante 15 minutos), posteriormente se vació en tubos de ensaye de fondo plano de 160 x 25 mm utilizando una jeringa de flujo continuo (Cornwell 10 cc), agregando 15 ml del medio en cada tubo, los cuales fueron tapados perfectamente con papel aluminio y colocados en una autoclave a 20 lb de presión a 121°C durante 15 minutos con la finalidad de esterilizarlos. Al ser sacados de la autoclave los tubos se agitaron periódicamente para obtener una distribución uniforme del CA.

4. Implantación del material vegetativo

Para la implantación se utilizó una campana de flujo laminar y mecheros de alcohol para mantener las condiciones de asepsia. Se emplearon brotes de 1 mes de crecimiento, los cuales eran colocados en cajas de petri esterilizadas, donde eran separados cada uno de los brotes empleando para ello bisturí y pinzas de disección, los cuales eran colocados en alcohol al 96% y pasadas por fuego antes de cada corte. Cada brote fue implantado en un tubo con medio de cultivo, el cual previamente había sido flameado. Después de la implantación los tubos vol-

vían a ser tapados con papel aluminio flameado con el fin de lograr la mayor asepsia posible, evitando así la contaminación.

5. Condiciones ambientales

Los tubos fueron colocados en el cuarto de cultivo con ambiente controlado; el fotoperíodo fue de 16 hrs/luz al día, con una intensidad lumínica de 1500 lux aproximadamente, en tanto que la temperatura fue controlada a $27 \pm 1^\circ\text{C}$.

6. Materiales y equipo

6.1. Materiales de laboratorio

- Tubos de ensaye de fondo plano de 25 x 160 mm
- Vasos de precipitado de 20 y 100 ml
- Matraces aforados de 500 a 1000 ml
- Matraces Erlenmeyer de 500 y 1000 ml
- Pipetas graduadas de 1, 5 y 10 ml
- Rejillas circulares metálicas de 28 cm de diámetro
- Pinzas de disección
- Mangos para bisturí (No. 3)
- Navajas para bisturí (No. 11)
- Mecheros de alcohol
- Cajas de petri
- Reactivos
- Papel aluminio 1001 usos (Reynolds Wrap)
- Ligas de hule
- Marcador Esterbrook

6.2. Equipo

- Autoclave vertical y horizontal
- Potenciómetro (Corning Model 12)
- Jeringa de flujo continuo (Cornwell 10 cc)
- Campana de flujo laminar
- Cuarto de incubación con control de tiempo y lámparas fluorescentes
- Balanza analítica
- Balanza granataria
- Refrigerador
- Calentador (solar automático IEM)

7. Fecha de siembra

El 15 de Octubre de 1982 se tomaron los brotes que se utilizaron para el experimento con carbón activado, y el 25 de Enero de 1983, los brotes empleados en la investigación del efecto de diferentes dosis de AIB y ANA.

8. Diseño experimental

8.1. Efecto del carbón activado

Se utilizaron brotes de 1 cm de longitud, los cuales fueron colocados sobre 4 medios que contenían diferentes concentraciones de CA (C_1 , C_2 , C_3 y C_4). El diseño experimental utilizado fue completamente al azar con 25 repeticiones para cada tratamiento. La unidad experimental estuvo constituida por 1 tubo de ensaye (1 brote). Todo esto dio un total de 100 tubos.

El factor de estudio a probar fue la dosis de carbón activado.

8.2. Efecto del tipo y concentración de auxinas.

Se tomaron brotes de 1 cm que fueron colocados en 8 medios diferentes, 4 que contenían AIB en diferentes concentraciones (A_1 , A_2 , A_3 y A_4) y los otros 4, diferentes concentraciones de ANA (A_5 , A_6 , A_7 y A_8). El diseño experimental empleado fue completamente al azar con 15 repeticiones, y la unidad experimental estuvo constituida por 1 tubo de ensaye, dando un total de 120 tubos.

9. Toma de datos

La toma de datos se realizó en base a las siguientes variables:

- a) Porcentaje de enraizamiento
- b) Número de plantas grandes y número y tamaño de raíces
- c) Número de plantas pequeñas y número y tamaño de raíces

Para el experimento con CA, en los tratamientos 2, 3 y 4, el conteo se realizó a las cuatro semanas de haberse implantado, mientras que en el tratamiento 1 se llevó a cabo un mes después, debido a que las plantas estaban muy pequeñas y no era conveniente transplantarlas.

En el experimento de tipo y concentración de auxinas el conteo se hizo al mes de haberse implantado.

En ambos experimentos, fueron consideradas como plantas grandes aquellas que tenían más de 3 cm, obteniéndose plantas hasta de 8 cm y

como plantas pequeñas aquellas con un tamaño menor de 3 cm, presentando la mayoría 1 cm.

Las plantas consideradas como aptas para el trasplante fueron aquellas mayores de 3 cm de altura y por lo menos con 4 raíces mayores de 2 cm. El número y tamaño de raíces se contó y midió en forma individual.

Las plantas fueron trasplantadas bajo condiciones de nebulización en charolas de plástico que contenían tierra de monte mezclada con agrolita.

10. Análisis de datos

Los datos fueron analizados en base a sus medias aritméticas y porcentaje de enraizamiento, tomando para ello el total de datos obtenidos y registrándolos gráficamente; también se llevó a cabo un análisis de varianza y comparación de medias.

V. RESULTADOS

1. Efecto de la concentración de carbón activado

El análisis de varianza de los datos obtenidos (Cuadro 2A) indica que existen diferencias altamente significativas para las variables plantas grandes y su tamaño de raíces, mientras que para el número de raíces no existe diferencia significativa. Con relación a las plantas pequeñas se observan diferencias altamente significativas para el número de plantas obtenidas, así como para el número y tamaño de raíces.

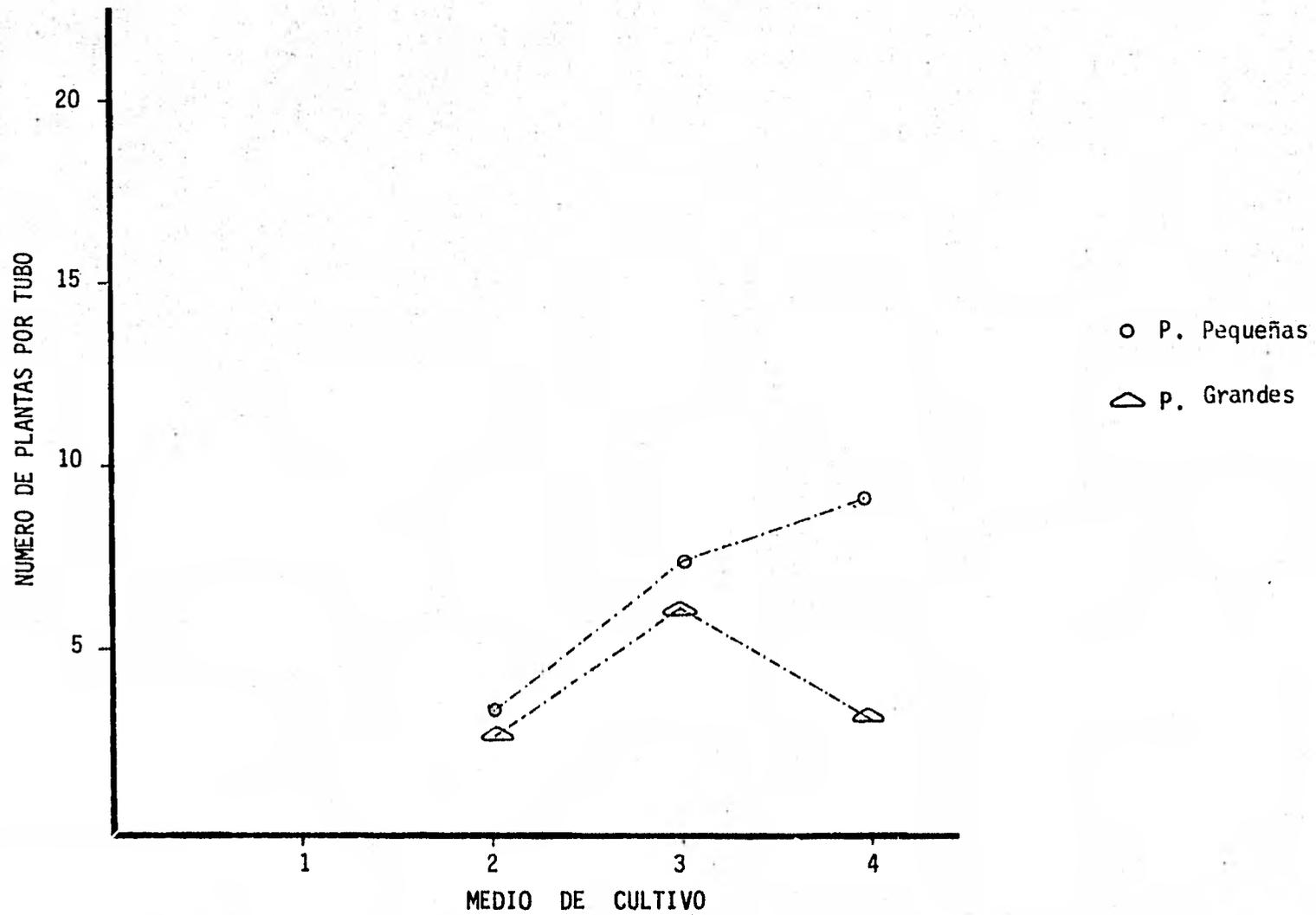
Debido a que la toma de datos para el tratamiento 1 se realizó 30 días después, únicamente se analizaron los tratamientos 2, 3 y 4.

1.1. Tamaño de planta

En la comparación de las medias para la variable plantas grandes de acuerdo a la prueba DMSH de Tukey, se encontró que el tratamiento 3 presentó una media de 7.24 que difiere significativamente con los tratamientos 4 y 2, siendo estos dos estadísticamente iguales. También se observa para la variable plantas pequeñas que existen diferencias significativas entre el tratamiento 3 y el 4 (Cuadro 1).

En la Gráfica 1 visualiza que en el tratamiento 3 se obtiene un mayor número de plantas grandes y con el 2 el menor, mientras que con el tratamiento 4 se logra el mayor número de plantas pequeñas.

Gráfica 1. Efecto de la concentración de carbón activado sobre el número de plantas de fresa *in vitro* de acuerdo al tamaño.



Cuadro 1. Comparación de medias para la variable número de plantas de acuerdo a su tamaño, dependiendo de la concentración de carbón activado

Tratamiento	Conc. CA g/l	Media P. G.	Media P. P.
2	0.5	3.40 b ¹	4.12 b
3	1.0	7.24 a	8.76 ab
4	2.0	3.68 b	11.52 a

¹Valores con la misma letra son estadísticamente iguales, de acuerdo con la prueba DMSH de Tukey.

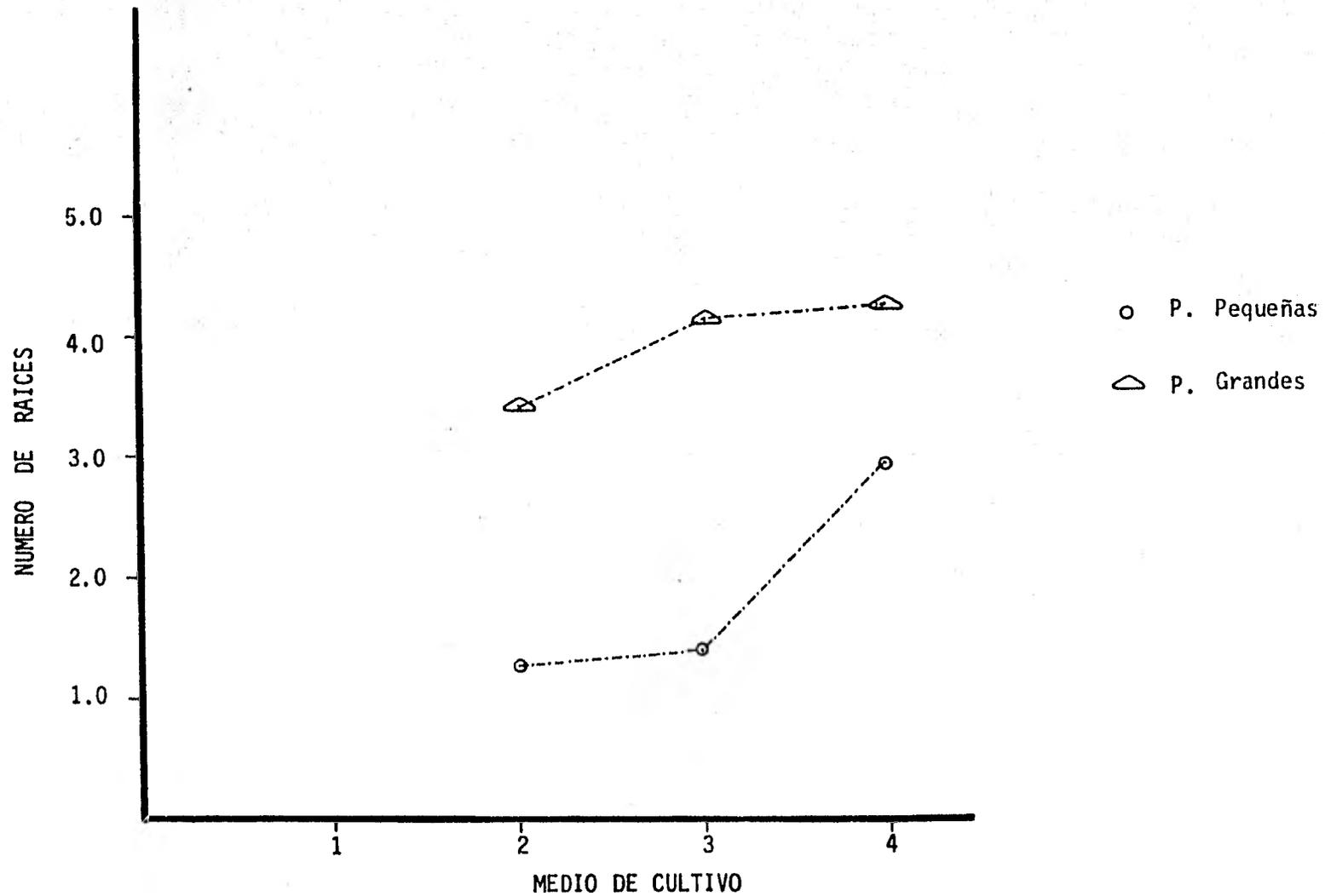
Plantas Grandes (PG) $p \geq 0.5 = 2.37$

Plantas Pequeñas (PP) $p \geq 0.5 = 4.94$

1.2. Número de raíces

La comparación de medias para la variable número de raíces en plantas grandes no muestra diferencias significativas. En las medias para la misma variable pero en plantas pequeñas se observa, que el tratamiento 4 es estadísticamente superior a los tratamientos 3 y 2, que a su vez son estadísticamente iguales (Cuadro 2). De la misma forma, la Gráfica 2 nos indica que el tratamiento 4 es en el que se obtiene un mayor número de raíces por planta grande, siguiéndole los tratamientos 3 y 2. Además, se observa que el número de raíces en plantas pequeñas crece a medida que aumenta la concentración de CA, siendo el tratamiento 4 el que presenta mayor número.

Gráfica 2. Efecto de la concentración de carbón activado sobre el número de raíces de plantas de fresa *in vitro*.



Cuadro 2. Comparación de medias para la variable número de raíces por planta dependiendo de la concentración de carbón activado

Tratamiento	Conc. CA g/l	Media P. G.	Media P. P.
2	0.5	3.44 a ¹	1.28 b
3	1.0	4.16 a	1.38 b
4	2.0	4.18 a	2.92 a

¹Valores con las mismas letras son estadísticamente iguales, de acuerdo con la prueba DMSH de Tukey.

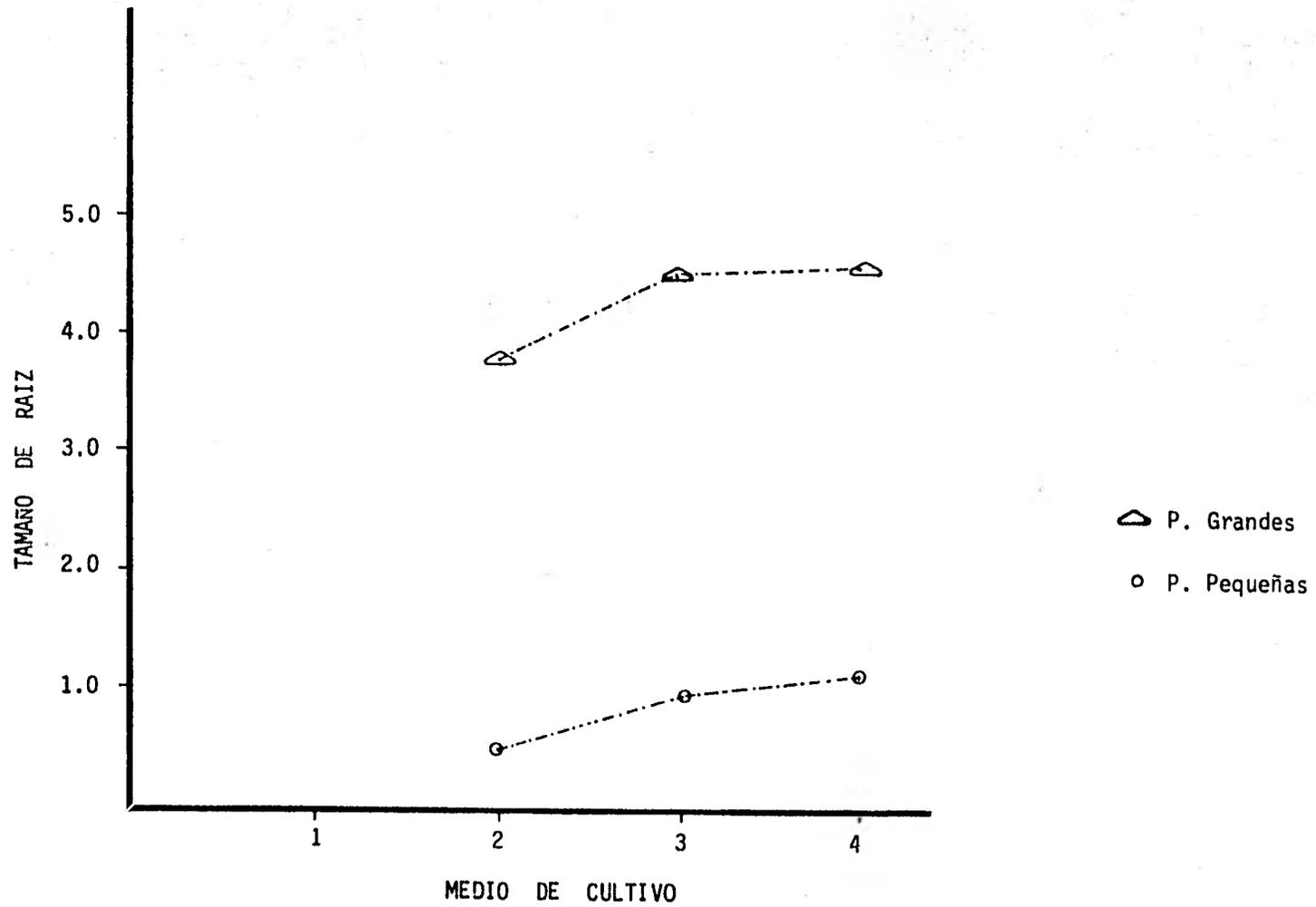
Plantas Grandes (P.G.) $p \geq 0.5 = 0.85$

Plantas Pequeñas (P.P.) $p \geq 0.5 = 0.95$

1.3. Tamaño de raíz

Para la variable tamaño de raíz tenemos que al hacer la comparación de las medias, los tratamientos 4 y 3 son estadísticamente iguales, pero superiores significativamente al tratamiento 2 (Cuadro 3). Cabe mencionar que el tratamiento 1 en esta fecha presentaba un tamaño promedio de más o menos 0.5 cm. En la Gráfica 3 observamos que aunque es poca, sí existe diferencia entre el tratamiento 3 y 4, de tal forma que podemos apreciar que tanto en plantas grandes como en plantas pequeñas, a mayor concentración de carbón activado mayor es el tamaño de raíz.

Gráfica 3. Efecto de la concentración de carbón activado sobre el tamaño de raíces en plantas de fresa *in vitro*.



Cuadro 3. Comparación de medias para la variable tamaño de raíz dependiendo de la concentración de carbón activado

Tratamiento	Conc. CA g/l	Media P. G.	Media P. P.
2	0.5	3.81 b ¹	0.52 b
3	1.0	4.50 a	0.95 a
4	2.0	4.56 a	1.09 a

¹Valores con la misma letra son estadísticamente iguales, de acuerdo a la prueba DMSH de Tukey.

Plantas Grandes (P.G.) $p \geq 0.5 = 0.60$

Plantas Pequeñas (P.P) $p > 0.5 = 0.41$

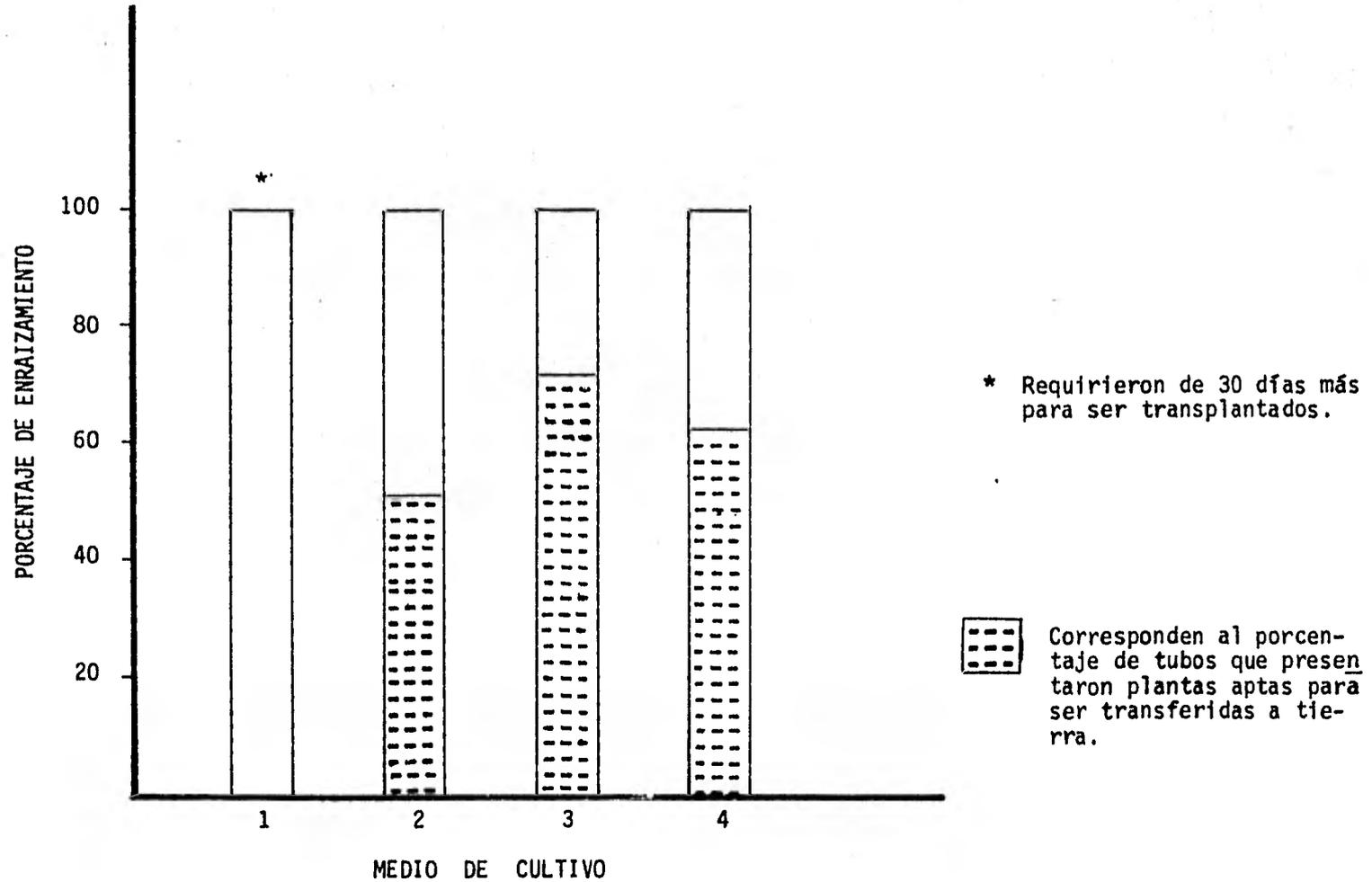
1.4. Porcentaje de enraizamiento

En la Gráfica 4, se puede observar que todos los tubos presentaron plantas enraizadas; sin embargo, el porcentaje de tubos que contenía plantas aptas para ser transplantadas fue menor, siendo el tratamiento 1 el que no presentó tubos con plantas listas para el transplante, mientras que el tratamiento 3 fue el que presentó el mayor porcentaje (72%).

2. Efecto del tipo y concentración de auxina

El análisis de varianza (Cuadro 3A) muestra que existen diferencias altamente significativas para las variables plantas grandes, y su número y tamaño de raíces dependiendo del tipo de auxina, no así para las variables plantas pequeñas, su número y tamaño de raíces, las cuales mostraron no ser significativas.

Gráfica 4. Efecto de la concentración de carbón activado sobre el porcentaje de enraizamiento en plantas de fresa *in vitro*.



En cuanto a la concentración de auxina, el análisis de varianza indica que no existen diferencias significativas para la variable plantas grandes, pero para su número y tamaño de raíz encontramos diferencias altamente significativas. Para la variable plantas pequeñas así como para número y tamaño de raíces se encontró que no existen diferencias significativas.

2.1. Efecto del tipo de auxina

2.1.1. Tamaño de planta

En la comparación de medias (Cuadro 4) encontramos que existen diferencias significativas para la variable número de plantas grandes por tubo, siendo el AIB el que presenta la media más alta (1.90), mientras que para plantas pequeñas, aun cuando el AIB y ANA son estadísticamente iguales la media más alta se obtiene con AIB (2.43).

Cuadro 4. Comparación de medias para la variable número de plantas de acuerdo a su tamaño, dependiendo del tipo de auxina

Tipo	Media P. G.	Media P. P.
AIB	1.90 a ¹	2.43 a
ANA	0.85 b	1.96 a

¹Valores con la misma letra son estadísticamente iguales, de acuerdo a la prueba DMSH de Tukey.

Plantas Grandes (P.G.) $p \geq 0.5 = 0.51$

Plantas Pequeñas (P.P.) $p \geq 0.5 = 0.85$

2.1.2. Número de raíces

Las medias para la variable número de raíces en plantas grandes de acuerdo a la prueba DMSH de Tukey, señala la existencia de diferencias significativas entre el tipo de auxina, presentando mejores resultados el AIB; en cambio, para la misma variable, pero en plantas pequeñas, no muestran diferencias significativas; sin embargo, la media de AIB resulta ser superior a la obtenida con ANA (Cuadro 5).

Cuadro 5. Comparación de medias para la variable número de raíces dependiendo del tipo de auxina

Tipo	Media P. G.	Media P. P.
AIB	3.16 a ¹	1.75 a
ANA	1.90 b	1.45 a

2.1.3. Tamaño de raíz

Al comparar las medias de la variable tamaño de raíz, tenemos que existen diferencias significativas en plantas grandes, siendo el mejor tipo de auxina el AIB; en cambio, en plantas pequeñas no hay tales diferencias; no obstante, la media de AIB (0.85) es mayor que la de ANA (Cuadro 6).

Cuadro 6. Comparación de medias para la variable tamaño de raíz dependiendo del tipo de auxina

Tipo	Media P.G.	Media P. P.
AIB	2.52 a ¹	0.85 a
ANA	1.46 b	0.71 a

¹Valores con las mismas letras son estadísticamente iguales, de acuerdo con la prueba DMSH de Tukey.

P. Grandes (P.G.) $p \geq 0.5 = 0.55$

P. Pequeñas (P.P.) $p \geq 0.5 = 0.25$

2.1.4. Porcentaje de enraizamiento

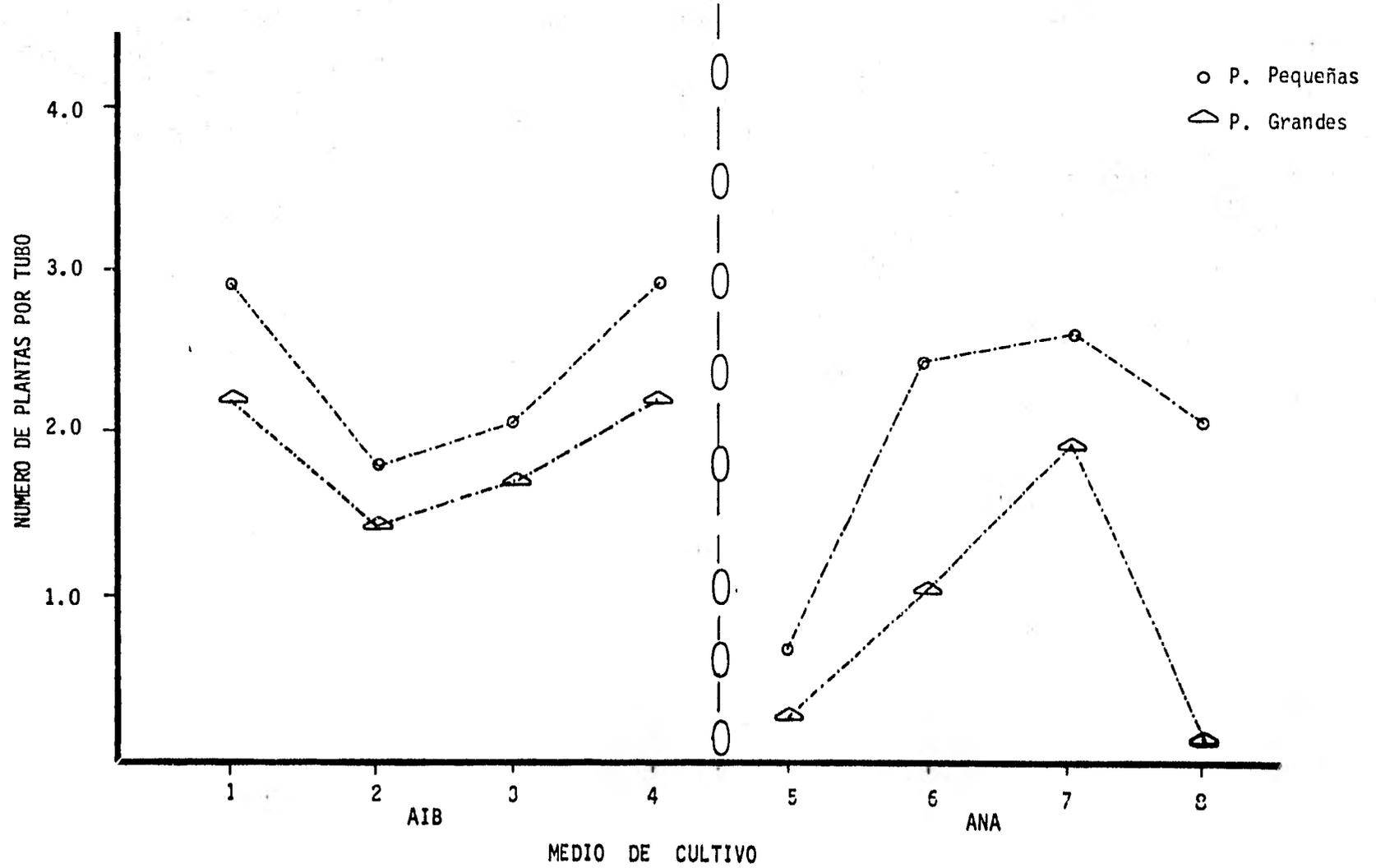
Los porcentajes muestran que para el tipo de auxina, los tratamientos que contienen AIB son los que presentan más altos porcentajes de enraizamiento (98.3%); siendo también, en general, los que presentan el mayor número de tubos con plantas en condiciones de ser transferidas a tierra (78.33%).

2.2. Efecto de la concentración de auxina

2.2.1. Tamaño de planta

En los tratamientos con AIB, las concentraciones de 0.5 y 2.0 mg/l lograron el mayor número de plantas por tubo tanto grandes como pequeñas; sin embargo, mostraron ser estadísticamente iguales a la concentración de 1.5 mg/l, pero superiores a 1.0 mg/l, mientras que en los que se utilizó ANA, la mejor concentración resultó ser 1.5 mg/l existiendo diferencias significativas entre éste y los demás trata

Gráfica 5. Efecto del tipo y concentración de auxina sobre el número de plantas de fresa *in vitro* de acuerdo a su tamaño.



mientos en plantas grandes, en cambio para plantas pequeñas, 1.0, 1.5 y 2.0 mg/l fueron estadísticamente iguales; no obstante, en la gráfica se observa que a la concentración de 1.5 mg/l se obtiene un mayor tamaño de planta (Cuadro 7 y Gráfica 5).

Cuadro 7. Comparación de medias para la variable número de plantas por tamaño dependiendo de la concentración de auxina

Tipo	Concentración mg/l	Media P. G.	Media P. P.
AIB	0.5	2.20 a ¹	2.93 a
	1.0	1.46 b	1.80 b
	1.5	1.73 ab	2.06 ab
	2.0	2.20 a	2.93 a
ANA	0.5	0.26 c	0.73 b
	1.0	1.06 b	2.46 a
	1.5	1.93 a	2.60 a
	2.0	0.13 c	2.06 a

¹Valores con las mismas letras son estadísticamente iguales, de acuerdo a la prueba DMSH de Tukey.

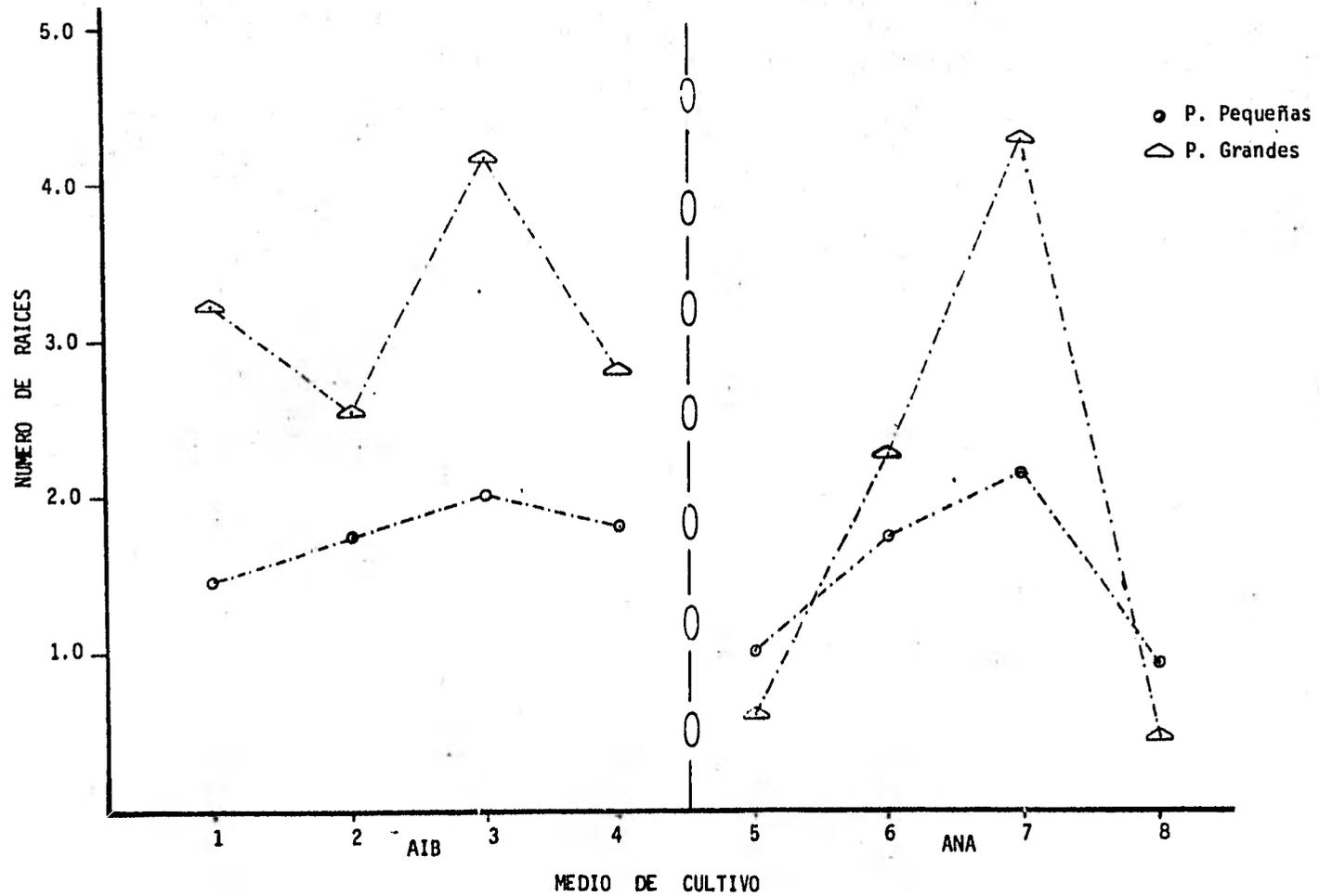
Plantas Grandes (P.G.) $p \geq 0.5 = 0.62$

Plantas Pequeñas (P.P.) $p \geq 0.5 = 0.78$

2.2.2. Número de raíces

Al comparar las medias para esta variable, encontramos que existe una gran diferencia en el comportamiento por efecto de la concentración dependiendo del tipo de auxina. Con AIB tenemos que para plantas pequeñas no hay diferencias significativas, pero la media mayor fue con seguida con 1.5 mg/l; en plantas grandes se logró el máximo número de raíces con 1.5 mg/l, siendo estadísticamente igual con 0.5 y 2.0 mg/l y difiriendo con 1.0 mg/l. Utilizando ANA, tanto en plantas grandes

Gráfica 6. Efecto del tipo y concentración de auxina sobre el número de raíces en plantas de fresa *in vitro*.



como en pequeñas, 1.5 mg/l resultó ser la concentración en la cual se consiguió el mayor número de raíces, siguiendo 1.0 mg/l y por último las concentraciones de 0.5 y 2.0 mg/l, no existiendo diferencias significativas entre estos dos últimos, mostrando como tendencia general, que tanto a las concentraciones más altas (2.00) como a las más bajas (0.5) se obtiene un menor número de raíces. (Cuadro 8 y Gráfica 6).

Cuadro 8. Comparación de medias para la variable número de raíces de pendiendo de la concentración de auxina

Tipo	Concentración mg/l	Media P.G.	Media P.P.
AIB	0.5	3.20 ab ¹	1.46 a
	1.0	2.53 b	1.73 a
	1.5	4.13 a	2.00 a
	2.0	2.80 ab	1.80 a
ANA	0.5	0.60 c	1.00 bc
	1.0	2.26 b	1.73 ab
	1.5	4.26 a	2.13 a
	2.0	0.46 c.	0.93 c

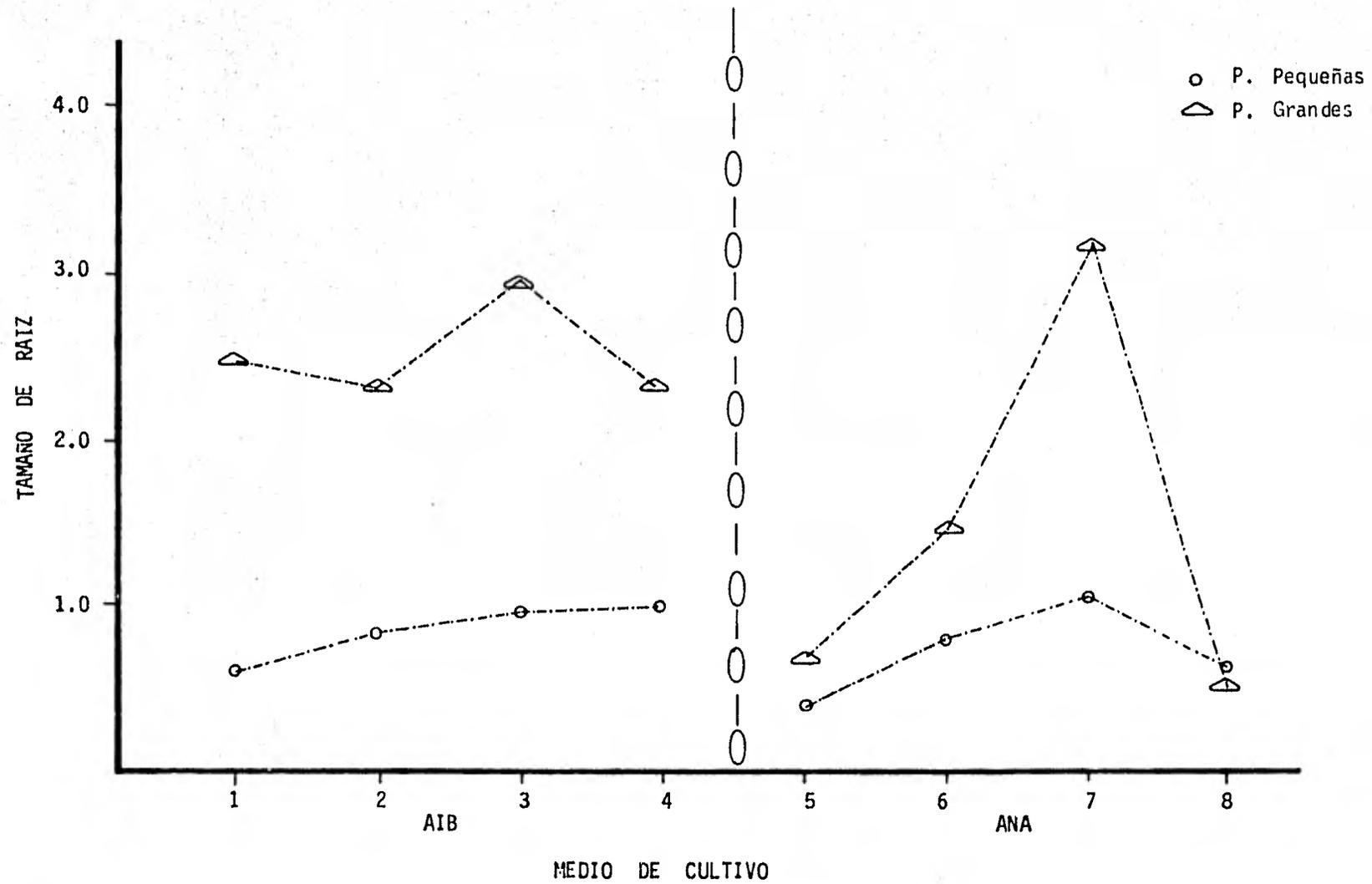
¹Valores con la misma letra son estadísticamente iguales, de acuerdo con la prueba DMSH de Tukey.

P.G. $p \geq 0.5 = 1.44$

P.P. $p \geq 0.5 = 0.61$

2.2.3. Tamaño de raíz

En la comparación de medias para la variable tamaño de raíz de acuerdo a la concentración de auxina, se encontró que los tratamientos resultaron ser estadísticamente iguales para plantas pequeñas con ambos tipos de auxina, sin embargo, se observa que a mayor concentración

Gráfica 7. Efecto del tipo y concentración de auxina sobre el tamaño de raíz en plantas de fresa *in vitro*.

de AIB, se incrementa el tamaño de raíz, y que con ANA el mayor tamaño es logrado con 1.5 mg/l. En plantas grandes, con AIB no se tienen diferencias significativas, aunque se observa que la media más alta se obtiene con 1.5 mg/l y la menor con 1.0 mg/l; en cambio, con ANA, la concentración de 1.5 mg/l es la mejor y muestra diferencias significativas con las otras concentraciones, obteniendo el menor tamaño de raíz a 2.0 mg/l (Cuadro 9 y Gráfica 7).

Cuadro 9. Comparación de medias para la variable tamaño de raíz dependiendo de la concentración de auxina

Tipo	Concentración mg/l	Media P.G.	Media P. P.
AIB	0.5	2.45 a ¹	0.61 a
	1.0	2.33 a	0.81 a
	1.5	2.95 a	0.96 a
	2.0	2.35 a	1.00 a
ANA	0.5	0.70 bc	0.41 a
	1.0	1.48 b	0.80 a
	1.5	3.18 a	1.03 a
	2.0	0.50 c	0.61 a

¹Valores con las mismas letras son estadísticamente iguales, de acuerdo a la prueba DMSH de Tukey.

P.G. $p \geq 0.5 = 0.67$

P.P. $p \geq 0.5 = 0.54$

2.2.4. Porcentaje de enraizamiento

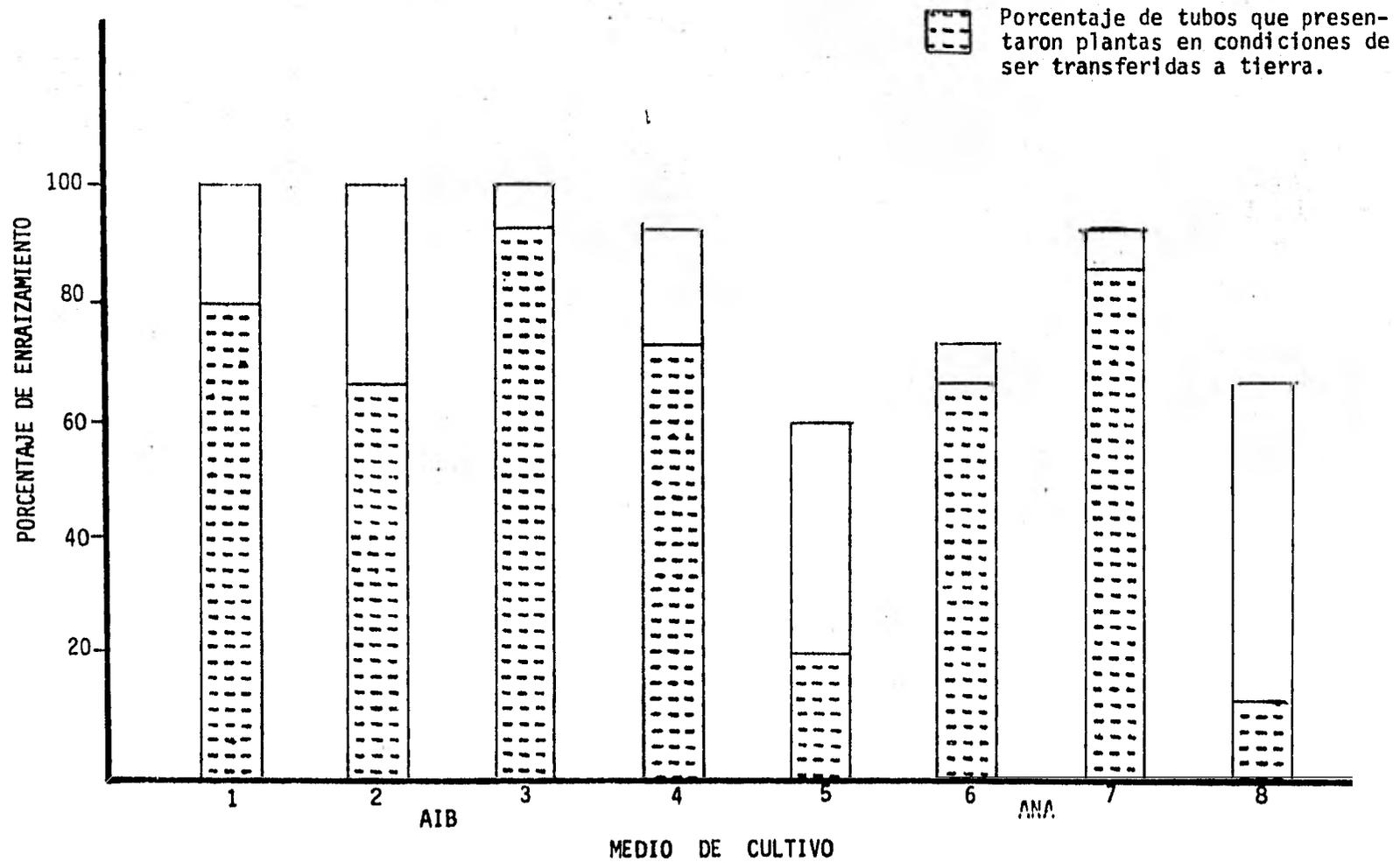
En el Cuadro 10 y en la Gráfica 8, se puede apreciar que la concentración de auxina en la cual se obtiene un mayor porcentaje de enraizamiento, así como un mayor número de plantas aptas para el trans-

plante, es la de 1.5 mg/l para ambas auxinas; no obstante, se observa que el efecto que causa la concentración varía de acuerdo al tipo de auxina.

Cuadro 10. Porcentaje de enraizamiento y de plantas aptas para el trasplante

Tipo	Concentración mg/l	Porcentajes	
		Enraizamiento	Plantas aptas
AIB	0.5	100.00	80.00
	1.0	100.00	66.66
	1.5	100.00	93.33
	2.0	93.33	73.33
	\bar{x}	98.33	78.33
ANA	0.5	60.00	20.00
	1.0	73.33	66.66
	1.5	93.33	86.66
	2.0	66.66	13.33
	\bar{x}	73.33	46.66

Gráfica 8. Efecto del tipo y concentración de auxina sobre el porcentaje de enraizamiento en plantas de fresa *in vitro*.



VI. DISCUSION

1. Efecto de la concentración de Carbón Activado

En base a los resultados obtenidos observamos, que a pesar de que el número de raíces en plantas grandes no muestra diferencias significativas y que en plantas pequeñas sólo existe diferencia entre el tratamiento 4 y los demás, el número de raíces por planta aumenta al elevarse la concentración de carbón activado (CA). La misma tendencia se tiene en el tamaño de raíz, en donde tenemos que no existe diferencia significativa al usar 1 ó 2 g/l de CA y sí la hay al probar 0.5 g/l. Lo anterior puede ser causado por la concentración de carbón activado que al ser más elevada adsorba una mayor concentración de auxina y esto permita un mayor crecimiento y número de raíces. Los resultados obtenidos difieren con lo encontrado por Damiano (1978) quien menciona que no importa la cantidad de carbón activado que se emplee, si no que éste se encuentre presente en el medio de cultivo.

En todos los tratamientos se obtuvo el 100% de enraizamiento; sin embargo, el porcentaje de plantas aptas para el trasplante fue mayor con 1 g/l. Además, en el tratamiento 1 (sin carbón activado), la planta tardó un mes más en estar lista para ser transferida a tierra, lo cual refleja lo reportado por Damiano (1980), quien encuentra que la adición del carbón activado al medio de cultivo durante la fase de enraizamiento, acorta el período de emisión de raíces acelerando la velocidad de enraizamiento.

En el número de plantas pequeñas se observa que a medida que au-

menta la concentración de CA aumenta el número de plantas por tubo, no así en plantas grandes donde la mejor dosis resultó ser la de 1 g/l; el que no se haya obtenido un mayor número de plantas grandes con la mayor dosis se debió probablemente a que con este tratamiento hubo una mayor proliferación.

El efecto benéfico del carbón activado sobre el enraizamiento puede atribuirse, principalmente, a que adsorbe ciertos metabolitos tóxicos que son producidos por el brote, de acuerdo a lo propuesto por Klein y Boop, 1971; Reuveni y Lilien-Kipnes, 1974 y Wang y Huang, 1976.

Otra de las causas que puede provocar este crecimiento y desarrollo de raíces, es la propiedad de adsorción que tiene el CA sobre algunos componentes del medio, principalmente de las auxinas (según lo reporta Fridborg y Erickson, 1975; Constantin *et al.*, 1977; Snir y Erez, 1980 y Cruz, 1983), las cuales si bien inducen la formación de iniciales de raíz inhiben el desarrollo de las mismas de acuerdo con lo encontrado por Cheng y Voqui - Dinh (1976).

En el experimento se empleó 1 mg/l de AIB, el cual de acuerdo con lo reportado por James y Newton (1977) es una concentración elevada, ya que encuentran que el rango de las concentraciones para la obtención de un mayor enraizamiento es de 0.5 a 2.5 μ M/l de AIB (0.1 - 0.5 mg/l). Sin embargo, el que se logre un buen enraizamiento con 1 mg/l puede deberse a que con esa concentración se provoca una rápida estimulación en las iniciales de raíz y si la dosis continuara siendo la misma, probablemente ocurriría la formación de callo o bien el retraso en el desa-

rrollo de la raíz como se observa en el tratamiento 1, pero como el carbón activado adsorbe la auxina provoca una disminución en la cantidad existente en el medio, la cual ya no es inhibitoria y permite el desarrollo de la raíz.

2. Efectos del tipo y concentración de auxina

De acuerdo al análisis de varianza las diferencias altamente significativas, dependiendo del tipo de auxina utilizado, las encontramos en plantas grandes y en su número y tamaño de raíces, mostrando ser el AIB la mejor auxina. Por otro lado, a pesar de que no existen diferencias significativas en plantas pequeñas, su número y tamaño de raíces, las medias más altas son obtenidas con AIB. También el porcentaje de enraizamiento y de plantas aptas para el trasplante, el AIB resultó ser el mejor tipo de auxina, obteniéndose 98.33% y 78.33%. Esto puede deberse a que el AIB tiene una acción auxínica lenta pero por un tiempo más prolongada.

En cuanto al efecto de la concentración de las auxinas tenemos un comportamiento diferente entre ellas, mostrando AIB menor variación entre concentraciones, mientras que ANA presenta diferencias mayores; lo anterior da una idea de la consistencia de cada una de las auxinas.

La tendencia general que se presenta en las dos auxinas, nos indica que en la medida que se incrementa la concentración de 0.5 a 1.5 mg/l, existe un incremento en el número y tamaño de raíces por planta, logrando su máxima expresión a esta última concentración; sin embargo, al elevarse la concentración a 2.0 mg/l existe una disminución en el nú

mero de raíces. Lo anterior puede deberse a que en ese nivel las auxinas inhiban el desarrollo de raíz, ya que probablemente, la cantidad de carbón activado empleada se sature y quede libre una concentración de auxina tal que sea inhibitoria, coincidiendo este resultado con el reportado por Cheng y Voqui-Dinh (1976). Por otro lado, la reducción que se observa con 1 mg/l de AIB pudiera ser causado por el tipo de propágulo empleado y no a la concentración.

Con respecto al porcentaje de enraizamiento se observa que con AIB en las 3 primeras dosis se logra el 100%, pero con la concentración más elevada disminuye a 93.33%. Una tendencia similar se refleja en el porcentaje de plantas aptas para ser transferidas a tierra.

En relación al ANA, esta auxina muestra la misma tendencia pero con una mayor variación, siendo el mínimo 13 y el máximo 86% para el porcentaje de plantas aptas y de 60 a 93% para el enraizamiento respectivamente.

La tendencia mostrada por las dos auxinas, de reducir los porcentajes de enraizamiento al aumentar la dosis a 2 mg/l, puede deberse, como se mencionó anteriormente, a que esos niveles sean inhibitorios.

Una cuestión importante que se observa al comparar los 2 experimentos, donde las dosis de carbón activado y AIB son iguales (1 g/l y 1 mg/l), se obtienen resultados muy diferentes siendo mayores los logros durante la investigación del efecto de la concentración del carbón activado; esto puede atribuirse a que en el caso del efecto del tipo y

concentración de auxina, los brotes utilizados tenían un mayor número de recultivos, lo cual pudo ocasionar las diferencias observadas tanto en el número de plantas por tubo como en el número y tamaño de raíz.

VII. CONCLUSIONES

- El carbón activado muestra un efecto benéfico sobre el crecimiento y desarrollo de raíces en plantas de fresa cultivadas *in vitro*.
- Al aumentar la dosis de carbón activado se incrementa el número y tamaño de raíces, resultando ser la mejor dosis 1 g/l.
- El ácido indolbutírico presenta una respuesta más consistente que el ácido naftalenacético. Además, con ácido indolbutírico se obtiene el mayor y mejor enraizamiento.
- La mejor concentración para ambos tipos de auxina es 1.5 mg/l.
- La utilización de 2.0 mg/l de ácido indolbutírico y ácido naftalenacético ocasiona una reducción en el enraizamiento.
- Existen diferentes respuestas al enraizamiento dependiendo del número de recultivos del propágulo utilizado.

A P E N D I C E

Cuadro 1A. Soluciones concentradas de las sales inorgánicas del medio modificado de Murashige y Skoog (1962)

I. NITRATOS	g/l
Nitrato de Amonio (NH_4NO_3)	165.0
Nitrato de Potasio (KNO_3)	190.0
II. SULFATOS	
Sulfato de Magnesio ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	37.0
Sulfato de Manganeso ($\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)	1.690
Sulfato de Zinc ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0.860
Sulfato Cúprico ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)	0.0025
III. HALOGENOS	
Cloruro de Calcio ($\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$)	44.00
Ioduro de Potasio (KI)	0.083
Cloruro de Cobalto ($\text{CoCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	0.0025
IV. $\text{PO}_4\text{BO}_3, \text{MoO}_4$	
Fosfato de Potasio (KH_2PO_4)	17.00
Acido Bórico (H_3BO_4)	0.620
Molibdato de Sodio ($\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	0.025
V. NaFeEDTA	
Sulfato Ferroso ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	2.784
Acido Etilendinitrilotetra-acetato (Na_2EDTA)	3.724

Cuadro 2A. Significancia de las pruebas de F del factor de variación carbón activado para cada variable estudiada

V a r i a b l e	C. A.	C. V.
Plantas grandes	**	65.68
Número de raíces	N.S.	29.82
Tamaño de raíz	**	59.58
Plantas pequeñas	**	61.12
Número de raíces	**	76.19
Tamaño de raíz	**	73.36

N.S. = No significativo

** = Significativo al 1%

C.A. = Carbón activado

C.V. = Coeficiente de variación

Cuadro 3A. Significancia de la prueba de los factores de variación tipo y concentración de auxina para cada variable estudiada

V a r i a b l e	Tipo	Concentración	C. V.
Plantas grandes	**	N.S.	104.29
Número de raíces	**	**	75.93
Tamaño de raíz	**	**	77.33
Plantas pequeñas	N.S.	N.S.	108.00
Número de raíces	N.S.	N.S.	84.33
Tamaño de raíz	N.S.	N.S.	88.28

N.S. = No significativo

**** = Significativo al 1%**

C.V. = Coeficiente de variación

LITERATURA CONSULTADA

- Adams, A. N. 1972. An improved medium for strawberry meristem culture. *J. Hort. Sci.* 47: 263-264.
- Aitchison, P. A., A. J. Macleod and M. M. Yeoman. 1977. Growth patterns in tissue (callus) cultures. *Plant Tissue and Cell Culture*. Ed. by H. E. Street. 2nd ed. Blackwell Scientific Public. p. 31-59.
- Anderson, W. C. 1980 (a). Tissue culture propagation of red and black raspberries, *Rubus idaeus* and *R. occidentalis*. *Acta Horticulturae*. 112: 13-20.
- _____. 1980 (b). Tissue culture propagation of red raspberries. Proc. conference nursery production of fruit plants through tissue culture applications and feasibility. USDA. Agricultural Research Results. p. 27-34.
- Anderson, H. M. 1981. Field assessment trial of micropropagated strawberry plants. *Grower* 96: 66-68.
- _____, A. J. Abbot and S. Wiltshire. 1982. Micropropagation of strawberry plants *in vitro* effect of growth regulators on incidence of multi-apex abnormality. *Scientia Horticulturae*. 16: 331-341.
- Belkengren, R. O. and P. W. Miller. 1962. Culture of apical meristems of *Fragaria vesca* strawberry plants as a method of excluding latent a virus. *Plant. Dis. Rep.* 46: 119-121.
- Boxus, Ph. 1974. The production of strawberry plants by *in vitro* micro propagation. *J. Hort. Sci.* 49: 209-210.
- _____, et M. Quirin. 1977. Comportament en pepiniere d'arbres fruitiers issus de culture *in vitro*. *Acta Horticulturae*. 78: 373-379.
- Brooks, R. M. and H. P. Olmo. 1972. Register of new fruit and nut varieties. 2nd. Edit. Univ. of Calif. Press. p. 602-603.
- Broome, O. C. and R. H. Zimmerman. 1978. *In vitro* propagation of blackberry. *Hort. Sci.* 13: 151-153.
- Constantin, M. J., R. R. Henke and M. A. Mansur. 1977. Effect of activated charcoal on callus growth and shoot organogenesis in tobacco. *In vitro*. 13: 295.
- Converse, R. H. 1981. Relation of prior heat treatment to growth and fruiting of 'Thornless Oregon Evergreen' blackberry. *HortSci.* 16: 312-313.
- Cossio, F. e G. Menin. 1982. Micropropagazione della fragole confronto tra substrati contenenti differenti miscele di macroelementi. *Frutt.* 44: 54-57.

- Cruz, F. P. 1983. Propagación *in vitro* de manzano (*Malus pumila* Mill) Tesis profesional. FES-C. UNAM. Cuautitlán, Méx. 68 pp.
- Cheng, T. Y. 1978. Propagation woody plants through tissue culture. *Amer. Nur.* 7-8: 94-100.
- _____ and T. H. Voquin-Dinh. 1977. Clonal propagation on selected deciduous. Trees through tissue culture. *Science* 198: 306-307.
- Chin, Ch. K. 1982. Promotion of shoot and root formation in asparagus *in vitro* by ancimydol. *HortSci.* 17: 590-591.
- Damiano, C. 1978. Il carbone attivo nella cultura *in vitro* della Fragola. *Frutt.* 40: 49-50.
- _____ . 1980. Strawberry micropropagation. Proc. conference nursery production o- fruit plants through tissue culture application and feasibility. USDA. Agricultural Research Results. p. 11-22.
- Daubeny, H. A., J. A. Freemant and H. S. Pepin. 1976. Field performance of cold stored plants of strawberry cultivars and selections in the Pacific Northwest. *HortSci.* 11: 353-444.
- D. G. E. A. 1983. Programa siembra-exportación de fresa. Temporada 1982-83. Dirección General de Economía Agrícola. S.A.R.H. México, D. F. 31 pp.
- Everett, N. P., T. L. Wang and H. E. Street. 1977. Hormone regulation of cell growth and development *in vitro*. *Plant Tissue and Cell Culture*. Edited by H. E. Street. 2nd. ed. Blackwell Scientific Public. p. 307-316.
- Fosket, D. E. and D. A. Tepfer. 1978. Hormonal regulation of growth in cultured plant cells. *In vitro.* 14: 63-65.
- Freeman, J. A. and H. S. Pepin. 1971. Influence of plant size, date of digging and duration of cold storage on the growth of strawberry plants. *Can. J. Plant. Sci.* 51: 267-274.
- Fridborg, G. and T. Eriksson. 1975. Effects of activated charcoal on growth and morphogenesis in cell cultures. *Physiol. Plant.* 34: 306-308.
- Gamborg, O. L., T. Murashige, T. H. Thorpe and I. K. Vasil. 1976. Plant tissue culture media. *In vitro.* 12: 473-478.
- Granada, C. L. 1980. Propagación *in vitro* de *Discorea compositae* Hemsl. Tesis profesional. UACH. Chapingo, Méx.

- Gresshoff, P. M. 1978. Phytohormones and growth and differentiation of cells and tissues cultured *in vitro*. Phytohormones and related compounds a comprehensive treatise. Vol. 2. Ed. Letham D. S., P. Goodwin and T. J. Whiggin. Elsevier/North-Holland Biomedical Press Amsterdam.
- Gupta, P. K., A. L. Nadgir, A. F. Mascarenhas and V. Jaganahathan. 1980. Tissue culture of forest trees: clonal multiplication of *Tectona grandis* L. (Teak) by tissue culture. *Plant Sci. Lett.* 17: 259-268.
- _____, A. F. Mascarenhas and V. Jaganahathan. 1981. Tissue culture of forest trees clonal propagation of mature trees of *Eucalyptus citriodora* Hook, by tissue culture. *Plant. Sci. Lett.* 20: 195-201.
- Hartmann, H. T. y D. E. Kester. 1982. Propagación de plantas. Principios y prácticas. 3a. impresión. Ed. CECSA. p. 639-666.
- James, D. J. and B. Newton. 1977. Auxin: Cytokinin interactions in the *in vitro* micropropagation of strawberry plants. *Acta Horticulturae* 78: 321-329.
- _____. 1979. The role of auxins and phloroglucinol in adventitious root formation in *Rubus* and *Fragaria in vitro*. *J. Hort. Sci.* 54: 275-277.
- _____, V. H. Knight and I. J. Thurbon. 1980. Micropropagation of red raspberry and the influence of phloroglucinol. *Scientia Horticulturae* 12: 313-319.
- Jones, O. P. and S. G. Hatfield. 1976. Root initiation in apple shoots cultured *in vitro* with auxins and phenolic compounds. *J. Hort. Sci.* 51: 495-499.
- Kartha, K. K., N. L. Leung and K. Pahl. 1980. Cryopreservation of strawberry meristems and mass propagation of plantlets. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 105: 481-484.
- Klein, B. and M. Bopp. 1971. Effect of activated charcoal in agar on the culture of lower plants. *Nature* 230: 474.
- Lane, W. D. 1978. Regeneration of apple plants from shoot meristems-tips. *Plant Sci. Lett.* 13: 281-285.
- Lee, E. C. M. and R. A. DeFossard. 1977. Some factors affecting multiple bud formation of strawberry (*Fragaria x ananassa* Duchesne) *in vitro*. *Acta Horticulturae* 78: 187-195.
- Litz, R. E. and R. A. Conover. 1978. *In vitro* propagation of papaya. *HortSci.* 13: 241-242.

- Maas, J. L. and D. H. Scott. 1973. Preharvest benomyl application to increase survival on quality of cold-stored strawberry nursery plants. *HortSci.* 8: 121-123.
- McGrew, J. R. 1980. Meristems culture for production of virus free strawberries. Proc. Conference nursery production of fruit plants through tissue culture applications and feasibility. USDA Agricultural Research Results. p. 80-85.
- Miller, G. A., D. C. Coston, E. G. Denny and M. E. Romeo. 1982. *In vitro* propagation of "Nemaguard" peach rootstock. *HortSci.* 17: 194.
- Mullin, R. H. and D. E. Schlegel. 1976. Cold storage maintenance of strawberry meristems plantlets. *HortSci.* 11: 100-101.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-494.
- _____. 1974. Plant propagation through tissue cultures. *Ann. Rev. Plant. Physiol.* 25: 135-166.
- _____. 1977. Plant cell and organ cultures as horticultural practices. *Acta Horticulturae* 78: 17-30.
- _____. 1978. The impact of plant tissue culture on agriculture. *Frontiers of plant tissue culture*. Ed. by T. A. Thorpe. Published by the International Association for plant tissue culture. Economy Bookbinding Co. Ltd. Calgary. p. 15-26.
- Németh, G. 1981. Adventitious root induction by substituted 2-chloro-3-phenyl-propionitriles in apple rootstocks cultured *in vitro*. *Scientia Horticulturae* 14: 253-259.
- Othmer, K. 1965. Carbón activado. *Enciclopedia de Tecnología Química*. Ed. Hispanoamericana 5: 583-601.
- Proskauer, J. and R. Berman. 1970. Agar culture medium modified to approximate soil conditions. *Nature.* 227: 1161.
- Sansavini, S. e G. Gherardi. 1980. Selezione clonale e stabilità genetica di fragole micropropagate. *Frutt.* 42: 39-46.
- _____, G. Brighenti e F. Camorani. 1982. Variazione fenotipiche residuali indotte da propazione *in vitro* su quattro cultivar di fragola in vivaio e in pieno campo. *Frutt.* 44: 71-82.
- Singha, S. 1982. *In vitro* propagation of crabapple cultivars. *HortSci.* 17: 191-192.
- Skirvin, R. M., M. C. Chu and E. Gómez. 1981. *In vitro* propagation of thornless trailing blackberries. *HortSci.* 16: 310-312.

- Smith, S. H., R. E. Hilton and N. W. Frazier. 1970. Meristem culture for the elimination of strawberry viruses. *Calif. Agric.* 24: 9-10.
- Snir, I. and A. Erez. 1980. *In vitro* propagation of Malling Merton apple rootstocks. *HortSci.* 15: 597-598.
- _____. 1981. Micropropagation of red raspberry. *Scientia Horticulturae.* 14: 139-143.
- _____. 1982. *In vitro* propagation of sweet cherry cultivars. *Hort Sci.* 17: 192-193.
- Swartz, H. J., G. J. Galleta and R. H. Zimmerman. 1981. Field performance and phenotypic stability of tissue culture propagated strawberries. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 106: 667-673.
- Villalobos, V. M. 1977. Cultivo meristemático de *Fragaria* spp. *in vitro*. Tesis profesional. ENA. Chapingo, Méx.
- _____. 1980. Plantas libres de virus. *Ciencia y Desarrollo. CONACYT* 33: 36-49.
- _____. 1982. Contribuciones del cultivo de tejidos al mejoramiento y conservación de las plantas. Centro de Genética. C.P. Chapingo, Méx.
- _____, T. A. Thorpe y E. C. Yeung. 1983. Aplicaciones del cultivo de tejidos en especies forestales. *Ciencia y Desarrollo. CONACYT.* 51: 43-59.
- Villegas M., A. 1982 (a). Propagación de cultivares de manzano (*Malus pumila* Mill.) *in vitro*. Tesis M. C. C. P. Chapingo, Méx.
- _____. 1982 (b). Apuntes de clase de propagación de plantas. No publicado. FES-C UNAM.
- _____, y F. Barrientos. 1982. Micropropagación de ciruelo mirabolano. Resúmenes del IX Congreso Nacional de Fitogenética. Saltillo, Coah. p. 114.
- _____. 1983. Multiplicación de plantas de fresa libres de virus. No publicado. Chapingo, Méx.
- Vine, S. J. 1968. Improved culture of apical tissues for production of virus - free strawberries. *J. Hort. Sci.* 43: 293-297.
- Waithaka, K., A. C. Hildebrandt and M. N. Dana. 1980. Hormonal control of strawberry axillary bud development *in vitro*. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 105: 428-430.
- Wallner, S. J. 1977. Apple fruit explant responses *in vitro* and textural characteristics of derived tissue cultures. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 102: 743-747.

- Wang, P. J. and L. C. Huang. 1976. Beneficial effects of activated charcoal on plant tissue. *In vitro* 12: 260-262.
- Weaver, R. J. 1976. Reguladores del crecimiento de las plantas en la agricultura. Edit. Trillas. México. 622 pp.
- Welander, M. and I. Huntrieser. 1981. The rooting ability of shoots raised *in vitro* from the apple rootstock A in juvenile and in adult growth phase. *Physiol. Plant.* 53: 301-306.
- Werner, E. M. and A. A. Boe. 1980. *In vitro* propagation of Malling 7 apple rootstock. *HortSci.* 15: 505-510.
- Zimmerman, R. H. 1980. Fruit plants micropropagation at Beltsville fruit laboratory and in North America. *Riv. Ortoflorofrutt.* 64: 214-256.
- _____ and O. C. Broome. 1980 (a). Apple cultivar micropropagation. Proc. conference nursery production of fruit plants through tissue culture application and feasibility. USDA. Agricultural Research Results. p. 54-59.
- _____ and _____. 1980 (b). Blueberry micropropagation. Proc. conference nursery production of fruit plants through tissue culture application and feasibility. USDA. Agricultural Research Results. p. 44-47.
- _____ and _____. 1981. Phloroglucinol and *in vitro* rooting of apple cultivar cuttings. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 106: 648-652.