

28

Zej



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN**

**ESTUDIO SOBRE MICROPROPAGACION
Y
MICROINJERTACION DE CEREZO
(Prunus Avium L.)
SOBRE
CAPULIN
(Prunus Capuli Cav.)**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
INGENIERO AGRICOLA
P R E S E N T A :
SERGIO SANCHEZ DE LA BARQUERA BERRALDE

ASEORES:
M.C. OFELIA GRAJALES MURIZ
ING. HUGO LIZALDE VIRAMONTES

TESIS CON FALLA DE ORIGEN CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEX.

MARZO 1996

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIDAD DE LA ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

U. N. A. M.
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES-CUAUTITLÁN



DEPARTAMENTO DE
EXÁMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

DR. JAIME KELLER TORRES
DIRECTOR DE LA FES-CUAUTITLÁN
P R E S E N T E .

AT'NI: Ing. Rafael Rodríguez Ceballos
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la F.E.S. - C.

Con base en el art. 29 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a ustedes que revisamos la TESIS TITULADA:

"Estudio sobre micropropagación y microinjertación de cerezo (Prunus avium L) sobre capulín (Prunus capuli Cav)" .

que presenta el pasante: Sergio Sánchez de la Barquera Serralde con número de cuenta: 7426559-6 para obtener el TÍTULO de: Ingeniero Agrícola .

Considerando que dicha tesis reúne los requisitos necesarios para ser discutida en el EXÁMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

A T E N T A M E N T E .
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cuautitlán Izcalli, Edo. de Mex., a 13 de febrero de 1996

PRESIDENTE	<u>M.C. Ofelia Grajales Nuñez</u>	
VOCAL	<u>Ing. Francisco Cruz Pizarro</u>	
SECRETARIO	<u>Biol. Elva Martínez Holguín</u>	
PRIMER SUPLENTE	<u>Ing. Guillermo Basante Butrón</u>	
SEGUNDO SUPLENTE	<u>Ing. Adolfo Ochoa Ibarra</u>	

ESTUDIO SOBRE MICROPROPAGACION

Y

**MICROINJERTACION DE CEREZO
(Prunus Avium L.)**

sobre

**CAPULIN
(Prunus Capuli Cav.)**

SERGIO SANCHEZ DE LA BARQUERA SERRALDE

***DE TODOS LOS OFICIOS LUCRATIVOS
NINGUNO MEJOR NI MAS PRODUCTIVO
NI MAS DIGNO DE UN HOMBRE LIBRE
QUE LA AGRICULTURA.***

CICERON

DIRECTORES

DE

TESIS

M.C. OFELIA GRAJALES MUÑIZ

ING. HUGO LIZALDE VIRAMONTES

DEDICADO

A

TI

MARTINA LINDENER MUELLER

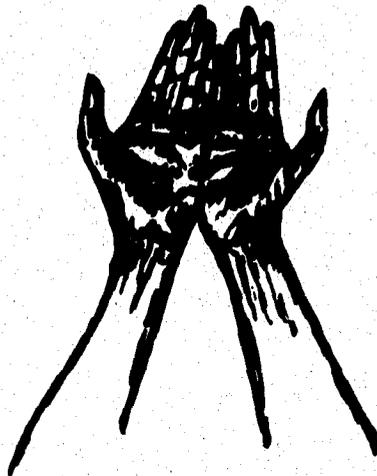
POR TODO TU AMOR,

APOYO, CARIÑO,

PACIENCIA Y COMPRESION.

TE AMO

**A
MI
PADRE
IN MEMORIAM**



***A ESE HOMBRE JUSTO Y HONRADO,
QUE SIEMPRE MI CAMINAR POR LA VIDA GUIO,
SU OBRA PARA MI JAMAS SERA OLVIDADA;
PUES SIEMPRE EN MI RECUERDO VIVIRA.***

**A
MI
MADRE**

**Por guiarme siempre por el sendero del bien,
por brindarme el apoyo total y desinteresado para lograr mi superación
personal,
por darme la fuerza y el valor necesario para seguir adelante en los
momentos más difíciles,
por haberme brindado ese maravilloso Don que es el de la vida,
por haber siempre creído en mí y
por todo lo bello que existe en ti.**

¡MUCHAS GRACIAS MAMA!

AGRADECIMIENTOS

A LA M.C. OFELIA GRAJALES MUÑOZ,

*por toda su colaboración y atinada
orientación para la revisión de
este trabajo.*

AL ING. HUGO LIZALDE VIRAMONTES

*por toda su colaboración, paciencia
y orientación en el desarrollo del
presente estudio.*

AL DR. ANDRÉS QUINTANAR STEPHANO,

*por todo su apoyo, confianza, estímulo
y atinados consejos que en todo momento
me brindó para poder hacer realidad
este sueño.*

*Con estas líneas deseo expresar mi
profundo agradecimiento por todo el apoyo,
carño y comprensión que siempre
he recibido de ellas:*

**A MI HERMANA NORMA V., A MI HERMANO JAIME,
A MIS SOBRINOS ANDREA Y BERNARDO,**

*porque con su valiosa colaboración
aprecio y estímulo hicieron posible
realizar esta Tesis Profesional.*

**A TODOS MIS DEMAS
HERMANOS
MALENA, IRMA, PATRICIA, EUGENIA Y EDMUNDO**

Por todo su aprecio cariño y comprensión

GRACIAS

A MIS TIAS

AMPARO (in memoriam).

AURORA, CELIA Y OTILIA

*por todo su estímulo, cariño,
comprensión y confianza que en
todo momento me han sabido brindar.*

A LA UNIVERSIDAD AUTONOMA DE AGUASCALIENTES,

*por todas las facilidades que me dio durante
todo el desempeño de la presente investigación.*

AL DR. LUIS M. BUSTOS ARANGO,

*decano del Centro Básico de dicha
Universidad, por todas las
facilidades para la elaboración
de esta Tesis en sus instalaciones.*

A TODO EL DEPARTAMENTO DE QUÍMICA Y FISIOLÓGIA

*(de la misma institución), que de una manera o de otra colaboraron para
realizar esta investigación.*

AL PROFESOR DE ESTADISTICA

ING. JUAN R. GARIBAY BERMUDEZ

*por toda su paciencia y atinadas sugerencias para la
revisión estadística.*

A MI SECRETARIA,

*que me ayudó a mecanografiar este trabajo con tanta paciencia y
amabilidad.*

**A
MI
ESCUELA**

*A ese lugar tan especial en donde tuve la oportunidad de encontrar muchos
amigos y adquirir los conocimientos necesarios para el mejor desempeño
de mi vida profesional.*

**A
MI
DIOS**

Por todas sus bendiciones

**AGRADECIMIENTO
E S P E C I A L**

ING. PASCUAL PACHECO SOTELO

**IN
MEMORIAM**

**COMO UN RECUERDO IMBORRABLE
DE TODOS LOS CONOCIMIENTOS Y
EXPERIENCIAS DE FRUTICULTURA
TRANSMITIDOS ASI COMO SU
GUIA, APOYO Y AMISTAD QUE
SIEMPRE SUPO BRINDARME.
POR SIEMPRE LO RECORDARE CON
APRECIO Y GRATITUD.**

CONTENIDO

	PAG
I. RESUMEN	1
II. INTRODUCCION	3
II.1. CAPULIN O CEREZO MEXICANO (Prunus Capuli Cav.)	5
II.1.1 NOMBRES COMUNES	5
II.1.2 CLASIFICACION TAXONOMICA	5
II.1.3 DESCRIPCION BOTANICA	5
II.1.4 USOS	6
II.1.5 OTROS USOS	6
II.1.6 PROBLEMATICA DEL CULTIVO	6
II.1.7 PERSPECTIVAS DE SU UTILIZACION	6
II.1.8 PRODUCCION A NIVEL NACIONAL DEL CAPULIN	7
II.2. EL CEREZO (Prunus Avium L.)	10
II.2.1 NOMBRES COMUNES	10
II.2.2 CLASIFICACION TAXONOMICA	10
II.2.3 DESCRIPCION BOTANICA	10
II.2.4 VARIEDADES DEL CEREZO	13
II.2.4.1 Cerezos Mollares	13
II.2.4.2 Cerezos Garrabales	14
II.2.4.3 Cerezos de frutos Abigarrados	14
II.2.4.4 Cerezos Guindos	14
II.2.5 EXPOSICION Y SITUACION DEL CEREZO	15
II.2.6 ESTABLECIMIENTO Y CULTIVO DEL CEREZO	15
II.2.7 PODA DEL CEREZO	15
II.3. OBJETIVOS	16
II.4. HIPOTESIS	16
III. REVISION LITERARIA	17
III.1 GENERALIDADES SOBRE LA MICROPROPAGACION	17
III.2 TECNICAS GENERALES	17

III.2.1	Medios de cultivo	17
III.2.2	Reguladores de crecimiento	19
III.2.3	Tratamientos pregerminativos	20
III.2.4	Injertación	21
III.2.5	Propagación por injerto	21
III.2.6	Microinjertación	23
III.2.7	Nuevos trabajos sobre la microinjertación	24
III.3	CONCLUSIONES DE LA REVISION LITERARIA	28
IV.	METODOLOGIA Y DESARROLLO	30
IV.1	DESCRIPCION DE LA METODOLOGIA - FASE I	30
IV.1.1	Recolección y clasificación de frutos de capulín	30
IV.1.2	Despulpado	30
IV.1.3	Tratamiento pregerminativo de las semillas de capulín	31
IV.1.3.A	Esterilización	31
IV.1.3.B	Estratificación	31
IV.1.3.C	Escarificación	32
IV.1.4	Desprendimiento de cotiledones	32
IV.1.5	Asepsia de embriones	32
IV.1.6	Implantación de embriones	33
IV.1.7	Sellado y etiquetado de frascos	34
IV.1.8	Incubación de embriones	34
IV.1.9	Plantas de capulín listas para ser microinjertadas	34
IV.2	DISEÑO EXPERIMENTAL	35
IV.2.1	Evaluación de 4 reguladores de crecimiento	35
IV.2.2	Evaluación de 12 combinaciones de reguladores de crecimiento	37
IV.3.	DESCRIPCION DE LA METODOLOGIA - FASE II	39
IV.3.1	Plantas de cerezo (<i>Prunus Avium L.</i>)	39
IV.3.2	Selección de yemas	39
IV.3.3	Asepsia de yemas	39
IV.3.4	Yemas listas para la microinjertación	40

IV.4 DESCRIPCION DE LA METODOLOGIA - FASE III	
MICROINJERTACION	41
IV.4.1 Selección de plántulas de capulín	41
IV.4.2 Selección de yemas de cerezo	41
IV.4.3 Preparación de plántulas de capulín para la microinjertación	41
IV.4.4 Microinjertación de yemas de cerezo sobre plántulas de capulín	41
IV.4.5 Cerrado y etiquetado de frascos	42
IV.4.6 Incubación de plántulas microinjertadas	42
IV.4.7 Evaluación de prendimiento de plántulas microinjertadas	42
V. RESULTADOS	43
V.1. RESULTADOS DE 4 REGULADORES DE CRECIMIENTO	43
V.1.1 Tabla número 1	43
Gráfica número 1	45
V.1.2 Tabla número 2	46
Gráfica número 2	47
V.1.3 Tabla número 3	48
Gráfica número 3	49
V.2 RESULTADOS DE 12 REGULADORES DE CRECIMIENTO	50
V.2.1 Tabla número 4	50
Gráfica número 4	55
V.2.2 Tabla número 5	56
Gráfica número 5	58
V.2.3 Tabla número 6	59
Gráfica número 6	61
V.3 RESULTADOS SOBRE LA MICROINJERTACION DE PLANTULAS DE CAPULIN CON YEMAS APICALES DE CEREZO	62
VI. DISCUSION	63
VII. CONCLUSIONES	67

VIII. LITERATURA	08
ANEXO 1 PRODUCCION DE CEREZO A NIVEL MUNDIAL.	76
ANEXO 2 VALORES NUTRICIONALES DEL CEREZO	77
ANEXO 3 MATERIALES, EQUIPO E INSTALACIONES	78
ANEXO 4 COMPOSICION DEL MEDIO MS	80
ANEXO 5 LOS REGULADORES DE CRECIMIENTO EMPLEADOS EN EL PRESENTE ESTUDIO	81
ESQUEMA I FORMULAS ESTRUCTURALES Y NOMBRES DE LOS REGULADORES DE CRECIMIENTO EMPLEADOS EN EL PRESENTE ESTUDIO	82

I. RESUMEN

En el laboratorio de cultivo de tejidos, del Centro Básico de la UNIVERSIDAD AUTONOMA DE AGUASCALIENTES, se realizó una investigación en cultivo *In Vitro*, para producir a través de los métodos asépticos plantas de capulín microinjertadas con yemas de cerezo.

- Fue utilizado como medio de cultivo el de Murashige y Skoog, modificando sus sales al 50% de su concentración original, excepto los nitratos de amonio y potasio, los cuales se redujeron al 10% de su concentración inicial. La determinación de modificar las sales minerales fue tomada de forma experimental dentro del mismo estudio.

- Se realizó el análisis de los reguladores de crecimiento, para romper el letargo de las semillas de capulín, tales como GA₃ (ácido giberélico), BA (6-benzilaminopurina), IAA (ácido indol 3 acético), NAA (ácido naftalenacético) solos y combinados en cinco diferentes concentraciones 0.0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 mg/l.

- Mediante un microscopio estereoscópico, la campana de flujo laminar funcionando, un mechero de Bunsen encendido, con la ayuda de un bisturí y pinzas de disección, se realizó la microinjertación de yemas de cerezo sobre plántulas de capulín.

- Las condiciones ambientales en las que se desarrollaron los experimentos fueron iguales, tanto para el caso de la obtención de plántulas de capulín, como para la microinjertación. Ambos fueron cultivados en un cuarto con controles de temperatura e iluminación, siendo la duración del

fotoperiodo de 16 horas de iluminación por 8 de oscuridad. La temperatura fue mantenida en 27° +/- 1°C

Los resultados obtenidos demostraron que el GA₃ fue el regulador que mayor porcentaje de germinación aportó, obteniéndose el 75% de la germinación de embriones de capulín. Otro regulador en combinación que aportó buenos resultados fue el "NAA + 0.5 mg/l de BA", en una concentración de 0.5 mg/l, obteniéndose un 50% de embriones de capulín germinados.

Fue demostrado que si se ejerce un control absoluto sobre el medio, es posible realizar la unión de dos plantas pertenecientes al mismo género, como lo fueron las yemas de cerezo microinjertadas sobre plántulas de capulín, obteniéndose el 100% de prendimiento de las mismas.

II. INTRODUCCION

En nuestro país debido a la sobrepoblación que sufre día a día y la escasez de recursos tanto económicos como naturales, se vuelve inaplazable el estudio y mejoramiento de especies nativas que puedan servir por sus cualidades de adaptabilidad a las diferentes regiones, como una alternativa más para la alimentación humana, tal es el caso del presente estudio cuya finalidad es la de demostrar que el capulín (*Prunus Capuli Cav.*), debido a sus características de rusticidad, pueda ser la alternativa para producir de manera comercial el cerezo (*Prunus Avium L.*), en la República Mexicana ya que ambas plantas pertenecen al mismo género botánico, obteniéndose con esto ventajas tales como la obtención de grandes poblaciones de árboles, conservando las mismas características genéticas del árbol del que proviene, así como la inducción a una rápida entrada en fructificación. Por otra parte, sus escasos requerimientos de frío, tienden a compensar las otras necesidades que tienen la mayoría de las variedades comerciales de cerezo, gracias a la utilización del capulín como patrón o portainjertos (Calderón, 1983).

El cultivo de cerezo en México es escaso a nivel comercial según estimaciones del Departamento de Estudios Económicos de Conafrut. De 1960 a 1970 fueron importados a nuestro territorio 2,224,432 sajotes de cerezo de diferentes variedades, comprendiendo, árboles, varetas, plántulas, etc.; ignorándose hasta la fecha el número total de individuos que fueron establecidas.

En cambio, en estimaciones de la Dirección General de Información Agropecuaria, Forestal y de Fauna Silvestre para el año de 1993, el cultivo de cerezo a nivel comercial se reporta únicamente en el estado de Sonora, con una superficie de 30 hectáreas cultivadas. No se hace ninguna mención de que dichas hectáreas fueran cosechadas, ni la variedad empleada para las mismas.

Si a todo lo anterior se adicionan los costos de producción y mantenimiento de los árboles se podría obtener una respuesta del por qué no es producido de forma comercial el cerezo en México, esto sumado a las plagas principalmente del suelo que son las más perjudiciales para el cultivo y los patrones sobre los que normalmente son injertados pueden ser más susceptibles a

dichas plagas por no ser nativas de estos lugares. Este punto es de suma importancia ya que dichos patrones son procedentes principalmente de Europa.

Pero lo antes mencionado no es el único problema, pues el consumo de esta fruta en nuestro país es alto, debido a que muchos gustos típicos son adornados con ella, así como algunas bebidas y de manera muy particular en la repostería o también en fresco que es la forma en que mejor aportaciones de vitaminas y minerales pueden obtenerse.

Anualmente por concepto de importación de este producto se gastan alrededor de \$11'200.000.00 dólares.

Por todo lo anterior es necesario plantear soluciones que puedan resolver problemas como éste, para evitar que sigan saliendo año con año cantidades considerables de divisas, por concepto de importación de este tipo de productos.

II.1. CAPULIN O CEREZO MEXICANO (*Prunus Capuli Cav.*)

Esta especie es originaria de Mexico y se ubica en las zonas templadas

II.1.1. NOMBRES COMUNES

capulin (Náhuatl)
iaundai (Zapoteco)
xeugua (Tarasco)
detze (Otomi)

II.1.2. CLASIFICACION TAXONOMICA

REINO	-	Vegetal
DIVISION	-	Plantas superiores
SUB-DIVISION	-	Angiospermae
CLASE	-	Dicotyledonae
GRUPO	-	Primero
ORDEN	-	Rosales
FAMILIA	-	Rosaceae
GENERO	-	<i>Prunus</i>
ESPECIE	-	<i>Prunoides</i>

II.1.3. DESCRIPCION BOTANICA

Arbol de la familia de las rosáceas. de 5 a 10 metros de altura. Presenta hojas alternas, lanceoladas, agudas y acerradas, con una o dos glándulas en el peciolo; flores blancas, chicas y colgantes, agrupadas en racimos; fruto en forma de baya pequeña, esférico de color rojo oscuro, con una semilla grande y una almendra amarga. Florece de enero a marzo y fructifica de mayo a junio. Los frutos son dulces, comestibles, algo astringentes; pueden consumirse crudos o en conservas.

II.1.4 USOS

Las semillas tostadas y saladas son consumidas frecuentemente en algunas regiones de México. Deshuesado y molido son utilizados para preparar tamales. Compotas y otras variedades de dulces que se fabrican con esta fruta son muy apreciadas. También es posible elaborar un tipo de vino que es de excelente calidad, además el consumo de sus frutos en fresco tiene grandes cualidades alimenticias.

II.1.5. OTROS USOS

La madera del capulín es roja brillante y es utilizada en carpintería y ebanistería. La corteza de este árbol cocida se utiliza en medicina popular, para combatir la diarrea y la fiebre; las ramas, la corteza y las raíces, ayudan a combatir algunos trastornos nerviosos y casos de tuberculosis. El extracto que se obtiene de las hojas puede ser utilizado como calmante.

II.1.6. PROBLEMATICA DEL CULTIVO

El cultivo del capulín es primitivo y se realiza en muy baja escala. Esto se debe principalmente a la escasa difusión que se tiene para su consumo, lo cual ha ocasionado poco interés para los agricultores, además por la mala germinación que presenta la semilla ya que ésta requiere de un periodo de postmaduración de por lo menos seis meses a 3°C de temperatura, para poder germinar.

Por todo lo expuesto, el capulín no se explota como cultivo a nivel comercial, sino que únicamente como planta de ornato en la jardinería de paisaje o como complemento de algún pequeño huerto familiar.

II.1.7. PERSPECTIVAS DE SU UTILIZACION

El capulín es un patrón de gran rusticidad, bastante bien adaptado a las condiciones que imperan en la República Mexicana, en cuanto a suelos se refiere, es versátil, tolerante a suelos secos y sueltos, como a suelos pesados y húmedos, además como patrón induce una rápida entrada en fructificación la cual es abundante y de buena calidad, por otra parte sus escasos requerimientos de

frio tienden a compensar las altas necesidades que tiene la mayoría de las variedades comerciales de cerezo. Calderón (1983). (Ver cuadro no. 1)

El capulín es además una planta que debido a su rusticidad es tolerante a cualquier plaga que se encuentre en los suelos donde pueda ser cultivado, debido a todo lo anterior el que se logre utilizar como portainjertos de cerezo, ampliaría de una manera total y definitiva su utilización a nivel comercial.

II.1.8. PRODUCCIÓN A NIVEL NACIONAL DEL CAPULÍN

El cultivo del capulín según Conafrut, para el año de 1980, registra un rendimiento de 19,500 toneladas a nivel nacional, como se describe a continuación:

Tabla I

Estado	Toneladas	% de Participación
Edo. De Mex.	5,869	30.1
Puebla	3,549	18.2
Tlaxcala	3,295	16.9
Otros (*)	6,787	34.4
Total Nacional	19,500	100.0

FUENTE: Conafrut, 1985

(*) Chis., D.F., Hgo., Jal., Mich., Mor., Oax., Ver.

Para el año de 1993 la última estimación que se pudo conseguir sobre la producción de capulín se encontró que fue obtenido un rendimiento de 17.672 toneladas a nivel nacional:

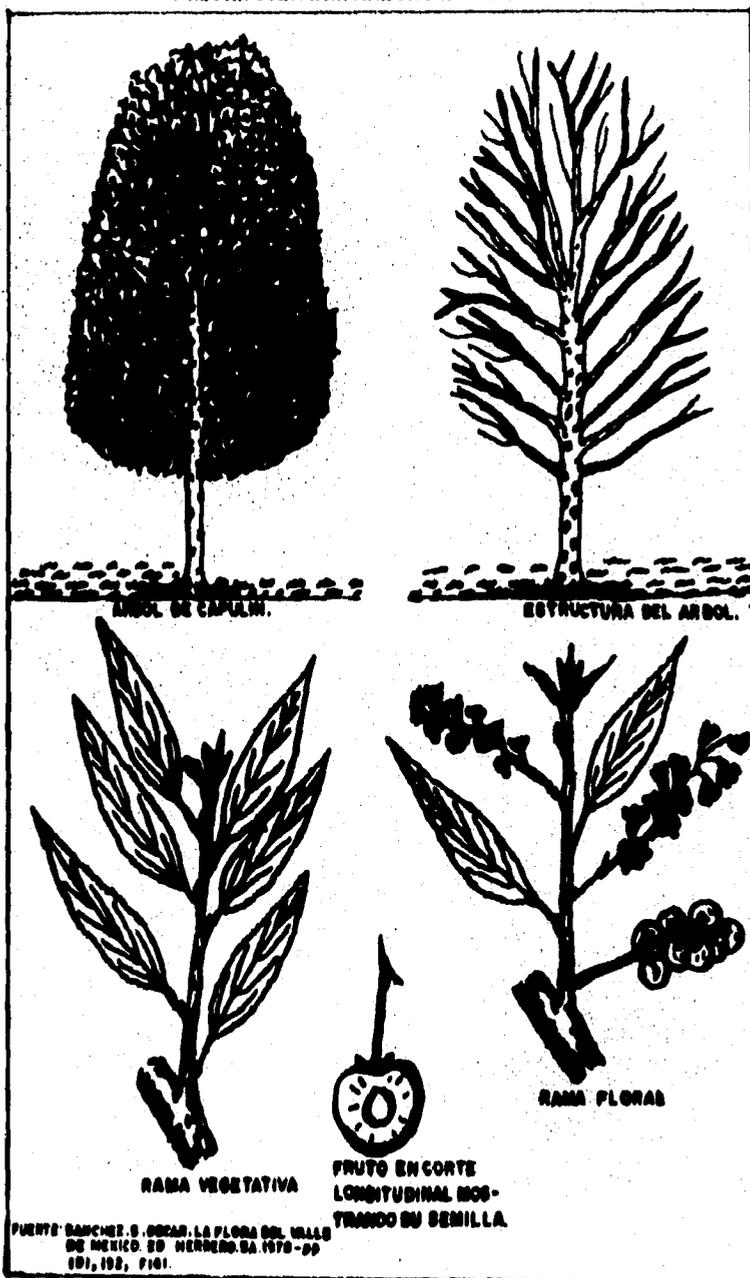
Tabla 2

Estado	Toneladas	valor de la Producción MN
Distrito Federal	1,724	72,500
Guerrero	5,000	41,525
Edo. de Mex.	3,500	308,000
Puebla	4,448	326,017
Veracruz	3,000	151,000
Total Nacional	17,672	899,042

FUENTE: Anuario Estadístico de la Producción Agrícola de los Estados Unidos Mexicanos, TOMO I, 1993.

Comparando la producción para 1980 y la obtenida en 1993, podemos observar una disminución de ésta del orden de 9.37%, con lo que podemos concluir que la demanda de la producción del capulín a disminuido a nivel nacional.

CUADRO NO. 1
DESCRIPCION DEL ARBOL DE CAPULIN



II.2. EL CEREZO (*Prunus Avium* L.)

El cerezo es originario de Europa, Oeste de Asia y Norte de Africa. Se cultivan muchas variedades, tanto por su fruto como por sus flores.

II.2.1. NOMBRES COMUNES

ESPAÑOL	-	Cerezo
ITALIANO	-	Ciliegio
FRANCES	-	Cerisier
ALEMAN	-	Kirschbaum
INGLES	-	Cherry tree

II.2.2. CLASIFICACION TAXONOMICA

REINO	-	Vegetal
DIVISION	-	Plantas superiores
SUB-DIVISION	-	Angiosperma
CLASE	-	Dicotiledoneas
GRUPO	-	Primero
ORDEN	-	Rosadales
FAMILIA	-	Rosaceae
GENERO	-	<i>Prunus</i>
ESPECIE	-	<i>Prunoides</i>
VARIEDAD	-	Molleres

II.2.3. DESCRIPCION BOTANICA

El cerezo es un árbol de la familia de las rosáceas, de 15 a 20 metros de altura en su edad adulta, recto, con muchas ramas casi dispuestas horizontalmente, nunca colgantes y con la extremidad levantada. La corteza en los troncos viejos es coriácea, de un color gris oscuro, destacándose en láminas circulares; en las ramas jóvenes es continua, brillante, lisa, de color gris oscuro y con manchas blancas transversales.

La madera es medianamente dura y fuerte, flexible de color amarillo rojizo venoso.

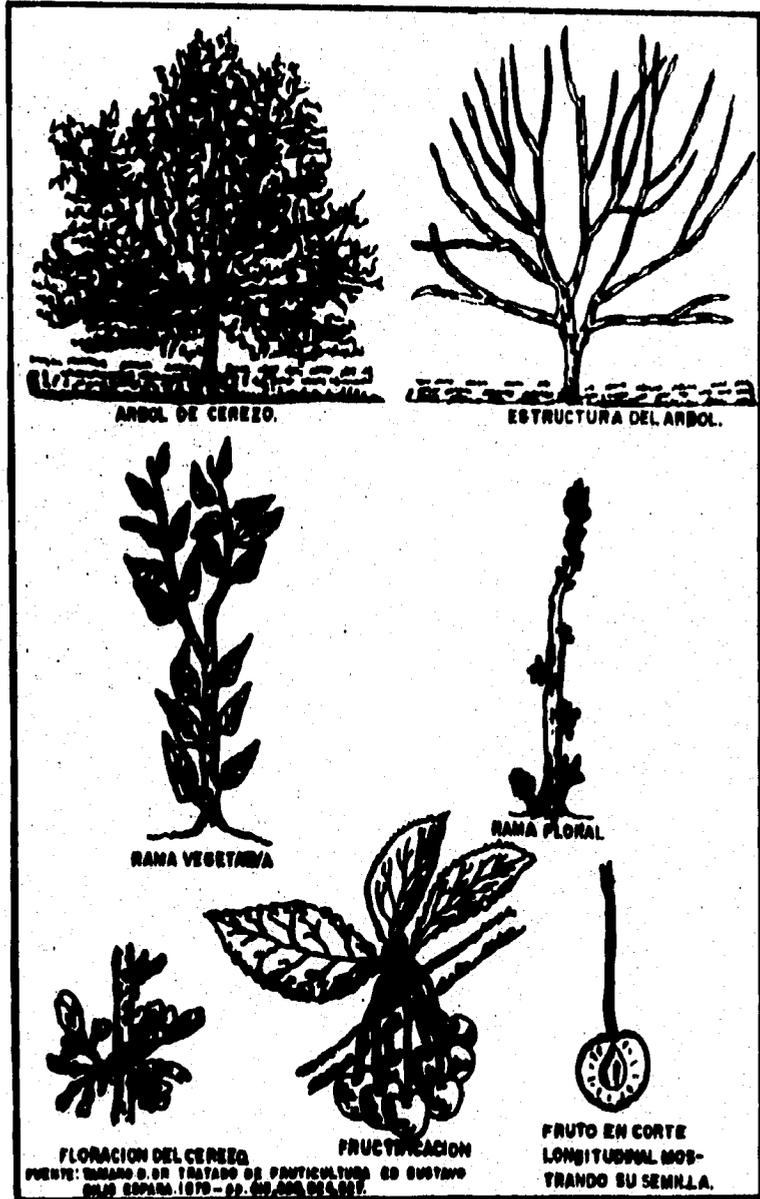
Las hojas son alternas, grandes, ovales, colgantes, lanceoladas, doblemente dentadas, de un verde intenso en la parte del haz, glabras o apenas pelosas en las nervaduras del envés. Salen de las yemas a la vez que las flores en abril y antes de caer, en otoño, amarillean y se toman rojizas.

Las flores son grandes, blancas, olorosas, dispuestas en umbelas sentadas, en racimos de siete u ocho flores cada uno.

Los frutos son drupas jugosas, globosas en forma acorazonada, con la piel adherida a la pulpa, del tamaño de un garbanzo grande de color rojo-negruzco, con jugo rojo y de pulpa dulce, no ácida.

El hueso se encuentra adherido a la pulpa. (Ver cuadro no. 2)

CUADRO NO 2
DESCRIPCION DEL ARBOL DE CEREZO



II 2 4 VARIEDADES DEL CEREZO

Los cerezos (comprendidos entre los guindos) pueden clasificarse de diversas formas.

Desde el punto de vista agrícola pueden formarse cuatro grupos:

- 1.- cerezos mollares
- 2.- cerezos garrafales
- 3.- cerezos de fruto abigarrados
- 4.- cerezos guindos

II 2.4.1. CEREZOS MOLLARES

Los cerezos mollares de este grupo son de vegetación regular; su fruto es de sabor dulce o algo ácido y de zumo incoloro. Las cerezas son de forma redondeada, truncada y acorazonada; su piel es de color rojo claro, más oscuro en el lado que recibe directamente los rayos del sol. Entre las variedades correspondientes a este grupo figuran las siguientes, colocadas en orden de acuerdo a su madurez:

- a) INGLESA TEMPRANA
- b) REAL DE INGLATERRA
- c) EMPERATRIZ
- d) BELLA DE CHOISY
- e) REINA HORTENSIA
- f) LEMERCIER
- g) GRUESA TRANSPARENTE
- h) MONTMORENCY
- i) GOBET
- j) BELLA DE CHATENAY
- k) CEREZO FRANCO O COMUN

II.2.4.2. CEREZOS GARRAFALES

Son árboles bastante productivos y que resisten los inviernos severos, que abundan en las diferentes regiones de Europa septentrional. Sus cerezos son de color púrpura-negruzco, de carne tierna, de zumo coloreado y ácido. A continuación son enumerados de acuerdo a su maduración:

- a) EL NEGRO
- b) EL DEL NORTE
- c) EL DE PORTUGAL

II.2.4.3. CEREZOS DE FRUTO ABIGARRADOS

Son vigorosos, altos y bastante productivos, se desarrollan bien en suelos áridos; la carne de sus frutos es compacta y poco jugosa. Corresponden a éste grupo por orden de maduración las siguientes variedades:

- a) FRUTO BLANCO
- b) AMARILLA DE BUTTNER
- c) FRUTO ROSADO
- d) NAPOLEON
- e) FRUTO ROJO
- f) MAZEL
- g) FRUTO NEGRO
- h) CORAZON NEGRO

II.2.4.4. CEREZOS GUINDOS

Son árboles bastante productivos, sus frutos llamados guindos, tienen la carne tierna y jugosa, raras veces coloreada. Dentro de este grupo se encuentran las siguientes:

- a) GUINDA PRECOZ
- b) GUINDA PURPURA TEMPRANA
- c) GUINDA DE OHIO

II.2.5. EXPOSICION Y SITUACION DEL CEREZO

Para el cerezo son benéficas las alturas, pendientes y llanos en que circula libremente el viento. Su hábitat principia en las regiones en que se cultivan los ciricos y finaliza en los límites geográficos del encino o roble. (Quercus)

Aunque el cerezo tiene este amplio margen de adaptación en cuanto a regiones se trata, es en las zonas en que se cultiva la vid, en donde se puede obtener los mejores beneficios de producción y calidad de sus frutos; Rigau (1975).

II.2.6. ESTABLECIMIENTO Y CULTIVO DEL CEREZO

El cerezo se reproduce en la mayoría de sus variedades por injerto. La distancia mínima entre plantas debe ser de 4.00 metros, bajo el sistema de tres bolillo, cuando los árboles adquieren gran desarrollo, su distancia en explotaciones comerciales puede ser desde los 8 hasta los 10 metros, como máximo entre plantas.

En conjunto, el cultivo del cerezo se reduce a algunas labores, manteniendo limpio el suelo del terreno. Es necesario fertilizar los árboles después de la cosecha, para poder con esto, asegurar un rápido desarrollo de los árboles jóvenes y para que éstos se mantengan vigorosos. En algunos casos es conveniente mejorar las condiciones del suelo, adicionando cal o azufre según sea el caso para mejorar su P^H y efectuar un estudio de los suelos previo a la fertilización, para que éste pueda ser adecuado para el cultivo, Rigau (1975).

II.2.7. PODA DEL CEREZO

Durante los primeros años se debe dar una poda de formación, simplemente para obtener una buena disposición de las ramas principales; después el árbol se equilibra por sí mismo. La poda de fructificación deberá ser moderada y llevarse a cabo cada año mediante aclareos, ligeros o severos y que tendrán por objeto favorecer la formación de bouquets de mayo de relativo vigor en las ramas de madera, así como revigorar aquellos bouquets de mayo ya existentes y que se

encuentran en producción, para que no se sequen o tengan una producción de manera incorrecta.
Calderón (1983)

II. 3. OBJETIVOS

Los objetivos que se pretenden alcanzar con el presente estudio son los siguientes:

1. **Producir las plántulas de capulín en cultivo *In Vitro* necesarias, para realizar la microinjertación de cerezo, mediante la utilización de reguladores de crecimiento evaluándose:**
 - a) **el regulador de crecimiento más apropiado para romper la latencia (letargo) de las semillas de capulín;**
 - b) **determinar la concentración del regulador de crecimiento, que aportara el mayor porcentaje de germinación de las semillas de capulín.**
2. **Que a través del cultivo *In Vitro* se logre producir plántulas de capulín, microinjertadas con cerezo.**
3. **Lograr una adecuada unión entre el portainjerto de capulín y el injerto de cerezo.**

II. 4. HIPOTESIS

A través de los medios asépticos de propagación (cultivo *In Vitro*) y mediante la utilización de reguladores de crecimiento, se puede lograr romper la latencia de las semillas de capulín y también la compatibilidad entre el capulín (*Prunus Capuli*, Cav.) y el cerezo agrio (*Prunus Avium* L.) mediante la técnica de la microinjertación.

III. REVISION LITERARIA

III.1. GENERALIDADES SOBRE LA MICROPROPAGACION

El cultivo de brotes ha sido establecido en numerosas especies de plantas superiores Murashige, (1978), Vasil et al, (1980). El término "Cultivo de tejidos" describe los tejidos sin raíces que se desarrollan, utilizando como medio de sostén al agar. El cultivo de tejidos es extensamente utilizado para la propagación clonal de helechos, árboles y plantas ornamentales, en investigaciones bioquímicas, fisiológicas y genéticas.

III.2. TECNICAS GENERALES

III.2.1. MEDIOS DE CULTIVO

El éxito que se obtenga en un cultivo de tejidos vegetales depende del uso del medio nutritivo adecuado, como también del empleo de tejidos viables, incubación, calidad de reactivos, etc.

El medio de Murashige, y Skoog (1962) en concentraciones relativamente altas de macro- y micronutrientes es comúnmente utilizada para cultivos de brotes, conteniendo este medio también una alta concentración de nitrógeno en forma de nitratos NH_4NO_3 (nitrato de amonio) y KNO_3 (nitrato de potasio). Por su parte Evans (1981) reportó, que la formación directa de tejido a partir de explantes utilizando el medio MS, se obtuvo un desarrollo de alrededor del 88% de especies no gramíneas que fueron probadas.

El medio nutritivo se encuentra compuesto por tres clases de sustancias: sales inorgánicas, compuestos orgánicos y compuestos naturales; la presencia o ausencia y la concentración de estos compuestos depende de los requerimientos específicos de cada especie y de la fase en que se encuentre el propágulo (Murashige, 1974), la dilución de sales minerales del medio de cultivo elevan el porcentaje de enraizamiento.

Skirvin, et al (1981) utilizando zarzamora en el cultivo *In Vitro* obtuvo hasta un 80% de enraizamiento, con bajas concentraciones de sales minerales.

Es decir, a través del uso de menores concentraciones de sales minerales se puede obtener un mayor incremento en el número y longitud de raíces, así como el de poder obtener un aumento en la velocidad de enraizamiento, cuando son utilizadas las sales minerales al 50% de (MS) exceptuando los nitratos, los cuales son reducidos en mayor grado, y se han logrado mejores resultados en la iniciación de raíz en tejidos de rosa, Hydman et al (1982). Resultados similares han sido obtenidos con el portainjerto Malling Merton, teniéndose entre un 80 y 100% de enraizamiento, utilizando una tercera parte de la concentración de las sales minerales, Werner y Bor (1980). Lo mismo es constatado por Hurtado y Merino (1987) dando la referencia de estas sales minerales, que se emplean en una dilución de 3 a 1.

Otros compuestos importantes que deben ser analizados son: la sacarosa, el agar y los compuestos orgánicos. Es importante mantener los niveles de sacarosa en un 3%, ya que con la utilización de dosis inferiores al 2%, solo permiten la aparición de tejidos sanos, pero no de raíces y además cuando los niveles de sacarosa son superiores al 5.2% provocan una disminución en el enraizamiento, Lane (1978). Por otra parte la eliminación total de azúcares del medio de enraizamiento reduce éste, hasta cerca del 25% en comparación a dosis probadas de manzano, Zimmerman y Broome (1980). Un mejor desarrollo en el crecimiento de tejidos, se puede lograr con un medio líquido, que con uno sólido, que contenga agar. Este se atribuye a un posible incremento en la absorción de hormonas y nutrientes del medio, no solo a través de la base del tejido o explante sino a toda la superficie que pueda quedar en contacto con el medio, Zimmerman, (1980).

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 del cultivo *In Vitro* de frasa. Lee y Fossard (1977).

III.2.2. REGULADORES DE CRECIMIENTO

Para determinar las necesidades de auxinas y citocininas, puede ser útil el saber que, mientras sustancias hormonales son básicas para todos los procesos de desarrollo de las plantas, las auxinas son particularmente importantes para estimular la iniciación de raíces y que las citocininas promueven la formación de brotes. Frecuentemente son efectos antagónicos, una de las sustancias inhibe la acción de la otra.

La adición de reguladores de crecimiento al medio de cultivo varía de acuerdo a la fase de propagación que se trate, en muchos experimentos, utilizando de 2 a 5 mg/l. de auxinas han sido obtenidas plántulas en condiciones de ser transplantadas a las tres o cuatro semanas de que han sido colocadas en el medio de enraizamiento, Anderson et al (1982). En altas concentraciones de citocinina (BA) y en presencia de auxinas (AIB), se incrementa la frecuencia de una anomalía morfológica en plantas de fresas cultivadas *In vitro*, conocidas como "Apices Múltiples"; que con la adición de ácido giberélico (GA₃) disminuye la incidencia de plantas afectadas, y la frecuencia de éstas anomalías varía notablemente entre diferentes cultivares, Anderson (1982).

Ha sido obtenido hasta un 80% de enraizamiento de zarzamora utilizando bajas concentraciones de auxinas (ANA), Skirvin, et al (1981).

En experimentos realizados con cerezo (*Prunus Avium L.*), aplicando 1 mg/l de AIB o 0.5 mg/l de ANA, adicionados al medio de cultivo, se ha obtenido una mayor tasa de enraizamiento con ANA que con AIB, y además al realizar una incisión en un lado de los brotes, provocó un incremento en el número de raíces por brote, teniéndose un porcentaje de enraizamiento del 87% con AIB y un 90% con ANA. En cambio, a los que no se les realizó esta incisión, se logró un enraizamiento del 62% con AIB y un 80% con ANA, Snir (1982).

En experimentos realizados con durazno, utilizando diferentes niveles de citocinina BA (0.5 y 1.0 mg/l.) y auxina ANA (0.5, 1.0, 1.5 y 2.0 mg/l), el enraizamiento ocurrió en todos los tratamientos, pero fue mayor con 1.0 mg/l de ANA y sin BA, obteniéndose hasta un 95% de brotes, Miller, et al (1982).

Las auxinas, citocininas y giberelinas pueden servir de promotores del crecimiento. Esto fue comprobado en experimentos realizados con semillas de cerezo silvestre, Pillay, (1966).

La aplicación de promotores tales como los reguladores de crecimiento suelen poner fin al reposo de las semillas. Esto fue comprobado adicionando GA₃ a semillas de vid. Yeou-Der, et al (1968).

Aplicando giberelinas (GA₃) a semillas de cerezo pudo interrumpirse el letargo, propiciando la germinación, Fogle y McCrory, (1960).

Aplicando GA₃ a muchas especies leñosas se pudo comprobar que se podía interrumpir el letargo de sus semillas, Frankland, (1961).

La mala germinación del cerezo (*Prunus Avium L.*), sobre todo en las variedades de maduración temprana, han sido un problema importante para muchos productores en los Estados Unidos, ya que las semillas del cerezo requieren de un periodo de postmaduración de por lo menos 6 meses a una temperatura de 4°C (estratificación) para poder germinar. Las giberelinas GA₃ pueden sustituir parte de esos periodos de postmaduración, sustituyendo de manera considerable este periodo, Fogle (1958).

III.2.3 TRATAMIENTOS PREGERMINATIVOS

Experimentos realizados con semillas de cerezos silvestres "Mazzard y Mahaleb", difieren mucho en cuanto al espesor del endocarpio, por lo que se requiere la aplicación de un tratamiento denominado escarificación. Dicho tratamiento consiste en retirar la cubierta dura de las semillas. Se comprobó que el cerezo Mazzard requiera de entre 120 y 150 días de postmaduración a una temperatura de 7°C, una vez que había sido retirado del endocarpio (escarificado) y en un medio húmedo, en cambio el Mahaleb requirió de 79 a 90 días en las mismas condiciones que el anterior, además se constató que remojando las semillas en giberelina se incrementaba entre un 75 y un 90% la germinación. Esto fue demostrado por Pillay, et al (1966).

Las semillas de algunas plantas incluyendo muchas especies leñosas, tienen cubiertas o testas tan resistentes, que los embriones no pueden extenderse y desarrollarse, Weaver, (1976).

El ser humano puede eliminar las barreras de la cubierta de las semillas de muchas plantas, mediante procedimientos mecánicos de escarificación u otros tratamientos que debiliten o rompan las cubiertas de las semillas lo suficiente para que el agua pueda penetrar fácilmente en ellas, Werner, (1965).

Muchas semillas requieren ser expuestas a bajas temperaturas (de 0°- 10°C) y a la humedad, para interrumpir su reposo. Dicho tratamiento se denomina estratificación de la semilla. El tiempo que requiere la interrupción del reposo varía de unas cuantas horas a varios meses. Esto se probó en diferentes semillas de plantas leñosas, Werner (1967).

En experimentos realizados con arándanos, fresas, frambuesas y zarzamoras se demostró, que la iluminación resulta esencial en la germinación de muchas semillas y promueve la germinación en otras, Scott et al, (1967).

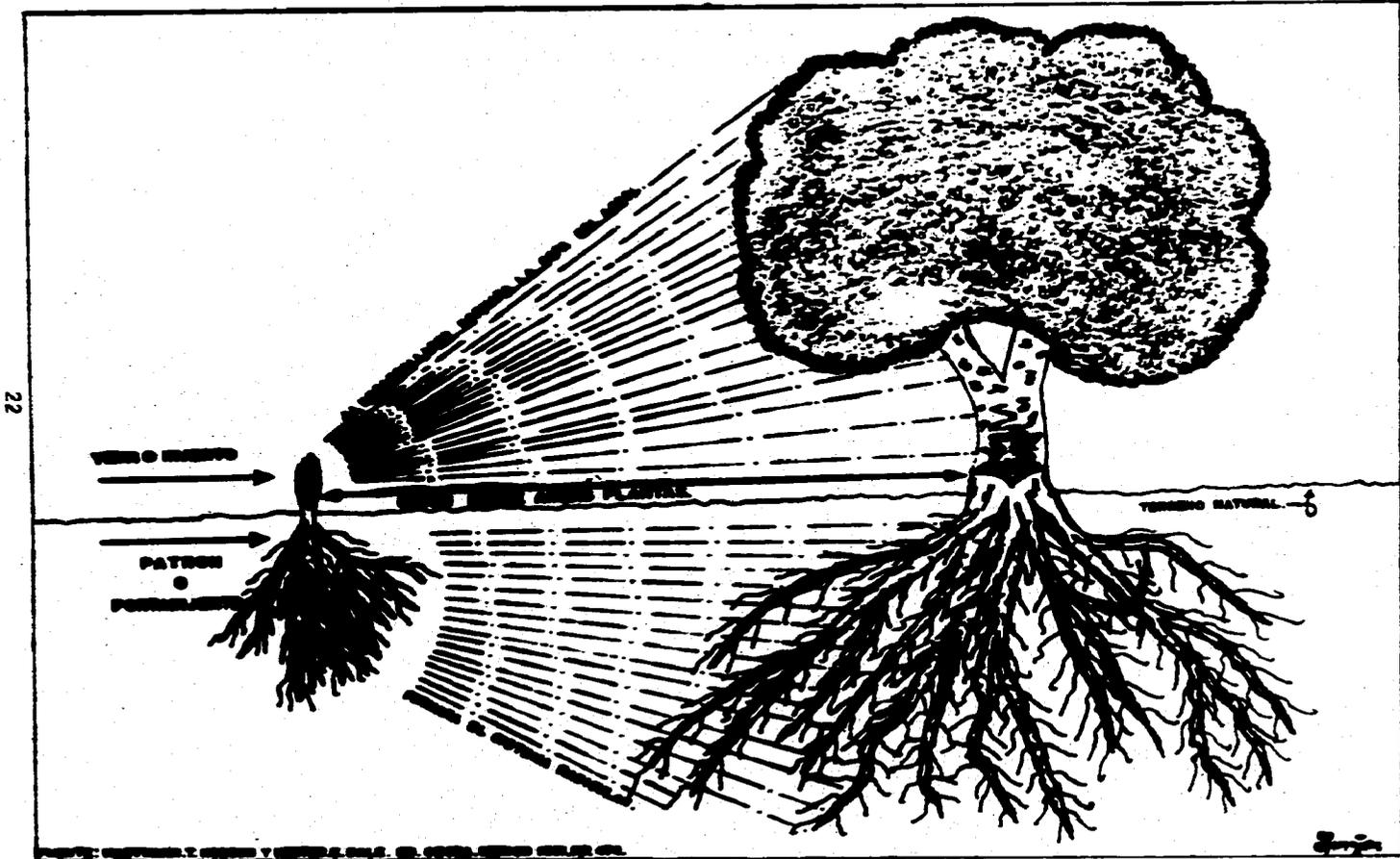
III.2.4 INJERTACION

La injertación es sin lugar a duda, uno de los procedimientos más importantes para la propagación de árboles frutales y quizás el más empleado, ya que ofrece bastantes ventajas sobre muchos otros procedimientos de propagación de frutales.

III.2.5. PROPAGACION POR INJERTO

Consiste en la unión íntima que se efectúa entre dos partes vegetales, de tal manera que el tejido de ambas se une y continúa su vida de esa forma, dependiendo una de la otra, formando una especie de asociación biológica. Una de las partes generalmente forma el sistema radical y constituye el patrón o portainjerto. La otra parte da origen a la porción aérea llamándose injerto, variedad o cultivar, pudiendo derivar de una simple yema o brote vegetativo. (ver cuadro número 3).

CUADRO NO. 3
DESCRIPCION DEL INERTO



El fenómeno de la injertación requiere para su éxito la presencia simultánea de condiciones de dos tipos, las cuales son impredecibles e imprescindibles. Una de ellas es la de orden físico y consiste en el hecho de poner en contacto el cambium de una parte vegetal con el cambium de la otra en la mayor proporción posible, y hacer que ese contacto continúe normalmente durante mucho tiempo.

Siendo el cambium un tejido parenquimatoso, meristemático, succulento, es fácilmente dañado al exponerse al aire y a la intemperie, en general pudiendo en poco tiempo deshidratarse las células exteriores que lo componen, con lo que el prendimiento puede mermar o dejar de realizarse. Por esto es necesario que la operación sea realizada en el menor tiempo posible para lograr el éxito deseado.

III.2.6. MICROINJERTACION.

Estudios realizados sobre la incompatibilidad entre el durazno y el ciruelo, Herrero y et al (1969), en los que se emplearon plantas en estado coledonario, no se presentaron signos de incompatibilidad de estas dos especies pertenecientes al mismo género (*Prunus* sp), y aún cuando los árboles microinjertados tenían trece años de haberse realizado la microinjertación. Es posible que algunos factores a los que se deben los síntomas de incompatibilidad no se presenten en los tejidos juveniles de las plantas.

a: Microinjertación de yema

Este tipo de injerto, fue utilizado con mucho éxito por vez primera en cítricos y ha sido de importancia comercial en el sureste de Australia, Duarte, et al (1971).

b: Microinjerto en ápices de ramas

Este fue un método utilizado para producir clones de cítricos libres de virus. La técnica consiste en hacer microinjertos a ápices de tallos libres de virus en plantas patronas obtenidas por semillas libres de agentes patógenos cultivadas *In Vitro*. Murashige, et al, (1972).

III.2.7. NUEVOS TRABAJOS SOBRE LA MICROINJERTACION

Todos los reportes que se incluyen aquí sobre microinjertación han sido posteriores a lo presentado en este estudio y por lo tanto no fueron tomados en cuenta en el mismo. Se anexan únicamente con el afán de aportar lo realizado sobre trabajos similares hasta la actualidad.

Pierik (1990). El micro-injerto resulta de gran importancia en el caso de que un meristemo no crezca, o un vástago obtenido por cultivo de meristemos no sea capaz de formar raíces, es posible injertar el meristemo sobre un patrón (plántula) libre de virus, que se cultiva o multiplica in-vitro. El microinjerto resulta de gran importancia en el caso de especies leñosas, ya que en este grupo el cultivo de meristemos es frecuentemente imposible.

Ozzambak, et al (1991). Brotes cultivados in vitro de los retoños de cultivares de Burlat y Viola, y de los patrones F12/1 y 209/1 (con o sin raíces) fueron injertados in-vitro. En un segundo experimento, plantas grandes de 25 a 30 cm de patrones F12/1 Y 209/1, propagados in-vitro y cultivados en el invernadero, fueron usados en injertos in-vivo de brotes provenientes de cultivo in-vitro. Fueron utilizados injertos de hendidura. Cuando se usó material bien desarrollado, cultivado bajo condiciones óptimas, los resultados obtenidos con retoños in-vitro fueron comparables con aquellos cultivados in-vivo en el vivero, pero la técnica requirió de más tiempo. La injertación fue más exitosa en el segundo experimento.

Aboalim, et al (1992). En un estudio preliminar, plántulas de 12 días de edad provenientes de semillas del cv Mateur que fueron polinizadas libremente, creciendo en el norte de Morocco, fueron utilizadas como patrón. Los retoños consistían de puntas de brotes de 8 a 10 mm de longitud con 2 - 3 yemas axilares distinguibles y fueron obtenidos de la segunda fase de un mismo cultivar de árboles de 4 años de edad. Los patrones fueron decapitados dejando 15 a 20 mm del epicotilo; La raíz principal fue cortada de 30 - 40 mm y los cotiledones y sus yemas axilares fueron removidos. Los retoños, con sus bases cortados en forma de una cuña suavemente deslizada, fueron insertados en las hendiduras verticales en la superficie cortada de los epicotilos. Las plántulas microinjertadas fueron cultivadas sobre un medio líquido de MS usando un papel filtro como puente. En un segundo experimento,

semillas desinfectados en su superficie fueron cultivados directamente sobre el soporte de una fibra de polipropileno (Milcap) y después de 12 días las plantulas fueron microinjertadas in situ con retoños; Las raíces secundarias del patrón se quedaron intactas. Los mejores resultados fueron obtenidos usando el ultimo método mencionado, y las conexiones vasculares fueron establecidas a través de injertos 21 días después de haberse injertado. Yemas axilares fueron producidos por 60% de los retoños. Los soportes de polipropileno (Milcap) permitieron un buen crecimiento y desarrollo del sistema radicular y previnieron daños a las raíces durante la injertación.

Cupidi (1992). Técnicas de microinjertación in-vitro usadas para obtener material de propagación libre de virus, incluyendo la preparación de patrones libres de virus cultivados in-vitro, separación de ápices e injertación, crecimiento y endurecimiento in-vitro de plantulas obtenidas están descritas brevemente. Un alto porcentaje de supervivencia de ápices (70 - 80%) estaban libre de virus. Recomendaciones especiales para la microinjertación in-vitro de almendras, duraznos, ciruelas, chabacano, cereza y manzana son incluidos. Esta publicación fue presentada en el seminario de microinjertación in-vitro, llevado a cabo en el Instituto Experimental de Patología de plantas en Roma, Italia, del 14-15 de Febrero del 1991.

Starratino (1992). Se describe una técnica de microinjertación usada para obtener clones de citrus, libre de virus y enfermedades parecidos a virus. Esto incluye injertos de puntas de brotes de ápices muy pequeños (0.1 - 0.3 mm) sobre los ápices o partes laterales de patrones de plantulas epicotilo decapitados cultivados in vitro. La parte apical del patrón en microinjertaciones es decapitado después de la germinación del ápice injertado. La tasa del porcentaje de la germinación fue aumentado por medio de inmersión del ápice y las plantulas en una solución de 6-BAP ((benzylaminopurine) (benziladenina)) con 0.5 p.p.m. Esta publicación fue presentada en el seminario de microinjertación in-vitro, llevado a cabo en el Instituto Experimental de Patología de Plantas en Roma, Italia, del 14-15 de Febrero del 1991.

Martino (1992). Microinjertación In-Vitro de uvas esta descrito y incluye la selección del mejor médium de cultivo para obtener plantulas de patrones y técnicas para la separación de ápices e injertación. Fue concluido que el porcentaje de injertos sobrevivientes fueron

satisfactorio, pero que las condiciones de crecimiento de las plantulas injertadas requieren mejoras. Esta publicación fue presentada en el seminario de microinjertación in-vitro, llevado a cabo en el Instituto Experimental de Patología de Plantas en Roma, Italia, del 14-15 de Febrero del 1991.

Ke, et al (1993 - 1994). Los brotes (prooclones) de kiwi derivados de protoplastos se injertaron de hendidura directamente de las condiciones in vitro sobre patrones maduros bajo condiciones de campo en varias diferentes fechas de Junio a Agosto en 1987 y 1988. Los brotes fueron tomados de cultivos basales, preparados para hacer un injerto de hendidura, puesto en una hendidura sobre un patrón, cubierto con un tubo de cultivo de cristal y sellado con fibras algodón. Otras plantas fueron auto-enraizadas in vitro y plantadas en el campo, para comparar la tasa de crecimiento y maduración de los dos tipos de plantas. La tasa de éxito del injerto dependía del tiempo del año en cual había sido injertado y del cuidado que se le daba a la incisión y al patrón después de ser injertado. Las plantas injertadas florecieron y fructificaron 2 - 3 años antes que las plantas auto-enraizadas. Esta técnica puede acortar el tiempo requerido para examinar el fenotipo de plantas derivadas del cultivo in vitro y puede ser útil para propagar clones difíciles de enraizar.

Cupido, et al (1993). Microinjertación in-vitro de uvas esta descrito para obtener plantas libre de virus y organismos parecidos a virus.

Detrez, (1994). Dos experimentos se llevaron a cabo de propagación de brotes de explantes maduros de arboles de *Acacia tortilis* subsp. *Raddiana* (CA. *Raddiana*) un árbol de la familia de las leguminosas tropicales como un paso hacia propagación clonal de genotipos superiores selectos. En el primer experimento fueron colectados barras lignificadas de 50 cm de largo en un campo cerca de Bandia, Senegal en Diciembre de 1989 y en Febrero de 1990 de arboles de 12 años de edad, de las cuales 2 fueron previamente cortados (en 1977). Cortes multinodales de 15 cm de longitud y con 6 - 8 nudos fueron preparados y agrupados en clases de diámetros de 3, 7 y 11 mm. Las mitades inferiores de los cortes fueron metidos dentro de Rhizopon (4 % IBA polvo) antes de plantar en bolsas de plástico de 1 litro con arena/vermiculita/perlita (2:1:1) en un invernadero. Un bajo porcentaje (<4%) o ningún

desarrollo de brotes de yemas axilares fueron encontrados en cortes con un diámetro de 3 y 7 mm y 1/0 de arboles no recortados. Sin embargo, cortes de 12 mm de diámetro de arboles recortados dieron menos del 37% de brotes. Solamente 11% de los cortes de los brotes enraizaron. De las muestras de Febrero brotaron 12 % de cortes con diámetros de 12 mm de los arboles recortados y el 10% enraizaron. Tratamientos con Rhizopon no provocaron ningún efecto. En el segundo experimento los ápices de retoños, las yemas axilares de jóvenes, pequeños herbáceos o ramas lignificadas de yemas axilares de un árbol maduro (de 15 años de edad) y yemas axilares obtenidas del mismo árbol, pero también cultivado in vitro como microcortes multinodales para promover in vitro enramado axilar, fueron todos exitosamente microinjertados en patrones de plantulas, aunque ambos la producción de callo y la elongación de yemas fueron mas grande en los injertos de yemas de plantulas. Se reportó un procedimiento de esterilización para explantes en campo. La propagación por medio de cortes y microinjertos fue discutido con referencia al rejuvenecimiento de arboles maduros como donadores.

Montauis, (1994). La posibilidad de usar brotes meristemáticos microinjertados in vitro, fue investigada en un clon de 18 años de edad de *P. Abies* proveniente de Noruega. La tasa de éxito fue altamente influida por la técnica de injertación utilizada y por la luz; un periodo de obscuridad de 2 a 3 semanas aplicado a los patrones justo después que ellos fueron injertados, tuvieron un efecto positivo y resultaron con un promedio de éxito de mas de 50%. Sin embargo, existía una variabilidad sustancial en términos de expansión de brotes entre las plantas injertadas, ambos durante el cultivo in-vitro y después de haber sido transferidos en condiciones ex-vitro.

Perrin, et al (1994). Apices de brotes maduros de 2 *Hevea* genotipos (IRCA 1B y PB 235) fueron microinjertados sobre plantulas de 3 semanas de edad crecidos en in-vitro. Se llevó a cabo una exitosa micropropagación de los microcortes del material microinjertado.

III.3 CONCLUSIONES DE LA REVISION LITERARIA

El cultivo *In Vitro* según lo expuesto a través de todos los autores citados demuestra que es un medio muy propio para la investigación de cualquier tipo de tejidos vegetales ya que es posible controlar totalmente el entorno que rodea el vegetal del que se esté investigando.

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 el medio más empleado durante la fase de desarrollo según lo expuesto por muchos autores, ha sido el de MS (Murashige y Skoog 1962), pero que la dilución de sus sales minerales eleva el desarrollo celular de los tejidos sometidos a algún análisis determinado.

La adición de reguladores de crecimiento al medio de cultivo tales como giberelinas, citoquininas y auxinas en diferentes concentraciones de 0.5, 1.0, 1.5 y 2.0 mg/l, provocan en general la estimulación de la multiplicación y división celular, pero solamente en cantidades apropiadas y analizadas para cada tipo de tejido y de vegetal que se trate.

Los tratamientos a los que se someten las semillas tales como la "escarificación" (que consiste en retirar a cubierta dura de la semilla) y la "estratificación" (que consiste en someter las semillas a una baja temperatura entre los 0°C - 10°C), según lo expuesto por algunos autores, estimula el rompimiento del letargo o latencia de las semillas, pues ayuda a que penetre el agua y el oxígeno a los tejidos en reposo del embrión, y de esta forma se inicie el proceso de la germinación.

El controlar los factores tales como la temperatura, iluminación y humedad son puntos de importancia, que le permiten al investigador acelerar o frenar el desarrollo del tejido que se encuentre analizando.

La técnica de la microinjertación es un proceso bastante útil para propagar plantas no sólo de importancia para la fruticultura, sino también para plantas medicinales y ornamentales, ya que reduce los periodos de tiempo para producirlas.

Los autores que han citado a la microinjertación en esta revisión bibliográfica, solo se han limitado a exponer los resultados de cada una de sus investigaciones, pero desafortunadamente nunca describieron la metodología que utilizaron, en la cual nuevas investigaciones la pudieran tomar como punto de partida, como es el caso del presente estudio.

La bibliografía que se anexa en el capítulo III 2.7 se ha incorporado al presente estudio con la finalidad de enriquecerlo, ya que el tiempo en que fue realizado el presente trabajo fue entre los años de 1987-1989 por lo que no se tomó en cuenta la bibliografía posterior a 1989.

IV. METODOLOGIA Y DESARROLLO

LOCALIZACION

El presente estudio fue realizado en el laboratorio de cultivo de tejidos del Centro Básico de la Universidad Autónoma de Aguascalientes durante los años de 1987 - 1989.

IV.1. DESCRIPCION DE LA METODOLOGIA

FASE I

Introducción de embriones y mantenimiento de plantas de capulín para la microinjertación.

IV.1.1. RECOLECCION Y CLASIFICACION DE FRUTOS DE CAPULIN

Para poder obtener plántulas sanas y vigorosas de capulín a fin de utilizarlas como portainjerto del cerezo se procedió a utilizar semillas de éste, colectadas como frutos en la región denominada Sierra Fria, ubicada en la parte oeste del estado de Aguascalientes. En dicho lugar se encuentra el capulín de manera silvestre y que por la cercanía con la Universidad, resultaba el sitio donde poder obtener dicho material de manera abundante; pudo haberse empleado cualquier otro método de reproducción para obtener las plántulas de capulín, tales como la utilización de embrioides, cultivo de meristemos o de polen pero cualquiera de éstos hubiera resultado más tardado, laborioso y costoso que el que se describe aquí.

Fueron seleccionados los frutos de mejor calidad en cuanto a color y textura, también de acuerdo a su tamaño y maduración, para obtener plantas de mejor calidad y que no presentaran anomalías genéticas que pudieran interferir en la microinjertación del cerezo. Todos aquellos frutos de menor tamaño o con malformaciones fueron desechados.

IV.1.2. DESPULPADO

A los frutos se les retiró de manera mecánica la pulpa (macerándolos), quedando al descubierto las semillas para poder dar los tratamientos necesarios a las mismas.

IV.1.3 TRATAMIENTO PREGERMINATIVO DE LAS SEMILLAS DE CAPULIN

Una vez obtenidas las semillas de capulín se procedió a dar los tratamientos pregerminativos, necesarios para romper la latencia de los embriones con reguladores de crecimiento, tales como auxinas, citocininas y giberelinas y determinar cual o cuales tratamientos eran los mejores para poder inducir a la germinación.

IV.1.3.A ESTERILIZACION

Las semillas necesarias para cada sesión de cultivo de tejidos se depositaron en un frasco (Gerber) para iniciar su tratamiento pregerminativo: se le adicionaron 80 ml de una solución concentrada de hipoclorito de calcio al 2%, además dicha solución contenía 0.005 ml de detergente líquido libre de fosfatos (Twing) con la finalidad de dar una mejor penetración de la solución esterilizadora a las semillas.

Una vez realizada esta operación, fue tapado el frasco y se agitó fuertemente por medio de un agitador mecánico, con la finalidad de que pudieran removerse fácilmente cualquier residuo de la pulpa del fruto, esto fue por un lapso de 15 minutos.

Una vez concluido este tiempo, se retiraba la solución limpiadora de las semillas y se lavaron con agua corriente durante 25 horas. Posteriormente se les retiró el agua, dejando únicamente la humedad que contenía cada semilla.

IV.1.3.B. ESTRATIFICACION

El tratamiento consistió en someter a las semillas a una baja temperatura para romper el letargo y de esta forma promover una pronta germinación, por lo que se procedió de la siguiente forma: Colocando las semillas juntas en un frasco de cristal conteniendo únicamente la humedad que habían absorbido durante el lavado y tapando dicho recipiente de cristal, se sometían las semillas a una temperatura de 4°C durante un lapso de 48 horas, en el refrigerador.

IV.1.3.C ESCARIFICACION

El objeto de este tratamiento fue el de retirar las capas protectoras de las semillas (endocarpio) por medio de una prensa, para hacer que estas fueran más permeables al agua y al aire.

Una vez concluida la escarificación, las semillas fueron depositadas en una caja de Petri que contenía 20 ml de agua destilada dejándolas sumergidas por un lapso de una hora. El tratamiento se realizó con la finalidad de darles una absorción inicial rápida de agua.

IV.1.4. DESPRENDIMIENTO DE COTILEDONES

Este tratamiento se dio a las semillas con el objeto de hacer que los embriones de capulín pudieran depender totalmente del medio nutritivo y de esta forma determinar el regulador de crecimiento y la concentración más adecuada para lograr un mayor porcentaje de germinación de embriones de capulín. Se procedió de la siguiente manera:

Con la ayuda de unas pinzas de disección y un bisturí, fueron retiradas las tres cuartas partes de los cotiledones de cada una de las semillas quedando adherido al embrión solo una pequeña porción de los mismos.

IV.1.5. ASEPSIA DE EMBRIONES

a: Tratamientos con etanol al 70%

La caja de Petri que contenía los embriones fue trasladada al recinto en donde se llevaría a cabo la implantación. Una vez dentro de éste, los embriones fueron colocados en un frasco (Gerber) para darles un nuevo tratamiento; éste consistió en sumergir los embriones en etanol al 70% durante 60 segundos, con la finalidad de retirar perfectamente las grasas de la superficie de los embriones, además de desecar en cierta forma la superficie expuesta, buscando con esto una mejor penetración de la solución esterilizadora.

b: Esterilización

Con la finalidad de dejar a los embriones libres de cualquier patógeno que pudiera alterar el experimento, fueron tratados de la siguiente manera: Se adicionaron 80 ml de una solución concentrada de hipoclorito de calcio al 2%. (además dicha solución contenía 0.005 ml de detergente líquido libre de fosfatos (Twing) y agua destilada) agitando los embriones fuertemente en el frasco por un lapso de 15 minutos, tiempo suficiente para lograr dicho objetivo.

c: Enjuagado

Una vez esterilizados, los embriones fueron enjuagados con agua destilada y esterilizada en auto clave (a 15 libras de presión por espacio de una hora). Una vez enjuagados los embriones se depositaron en una caja de Petri esterilizada y de esta forma quedaron listos para ser implantados en el medio nutritivo.

IV. 1. 6. IMPLANTACION DE EMBRIONES

Una vez que estuvo todo el material listo, se procedió a realizar la implantación de embriones de la manera siguiente:

a: Con la ayuda de un mechero de Bunsen encendido y funcionando la campana de flujo laminar, se introdujeron los frascos con el medio de cultivo previamente esterilizado. A cada uno, colocando frente a la flama del mechero, se le fue retirando la tapadera de plástico. Después con unas pinzas de disección sumergidas en alcohol al 70%, fueron pasadas por la flama antes de ser tomado cada uno de los embriones y de esta forma implantados en el medio de cultivo.

b: En cada frasco fueron introducidos cinco embriones, quedando estos directamente en contacto con el medio nutritivo, de tal forma que se pudieran obtener un total de 10 frascos implantados para cada uno de los tratamientos con los reguladores.

IV.1.7. SELLADO Y ETIQUETADO DE FRASCOS

Una vez cerrados los frascos se procedió a sellarlos con una película elástica y adherente (parafilm). A cada frasco se colocó una etiqueta que contenía nombre de la planta, regulador empleado, así como la concentración del mismo, la fecha en que se había realizado, con la finalidad de poder saber en todo momento que tratamiento se estaba empleando en cada caso.

IV.1.8. INCUBACION DE EMBRIONES

Una vez concluida la operación anterior, se trasladaron los frascos al recinto en donde serían cultivados. Dicho lugar contaba con controles automáticos para conservar el medio adecuado para los embriones, tales como:

El fotoperiodo fue controlado por medio de un reloj controlador (timer) manteniéndose constante la iluminación durante 16 horas diarias por ocho de oscuridad a 1500 luxes con lámparas fluorescentes (luz de día).

La temperatura fue mantenida por medio de un calefactor con termostato y un sistema de aire acondicionado a $27 \pm 1^{\circ}\text{C}$.

IV.1.9. PLANTAS DE CAPULIN LISTAS PARA SER MICROINJERTADAS

Una vez concluido el tiempo de incubación, todas las plantas cuyos tamaños y diámetros de tallos eran los apropiados, se tuvieron listas para la microinjertación.

IV.2. DISEÑO EXPERIMENTAL.

IV.2.1 EVALUACION DE CUATRO REGULADORES DE CRECIMIENTO

Para evaluar el efecto de los reguladores de crecimiento sobre la germinación de los embriones de capulín, se utilizó un diseño experimental completamente al azar.

En relación al efecto de los reguladores de crecimiento evaluados por separado, se utilizó un arreglo factorial de 4×5 , es decir cuatro reguladores con cinco concentraciones distintas, obteniéndose 10 repeticiones aportando una muestra de 200 valores.

A cada una de las muestras (unidades experimentales o frascos), se les depositaron 5 embriones, teniendo en total una población de 1000 embriones para el presente análisis.

$x_{i j k}$	= % de germinación de semillas de capulín
$1 \leq i \leq 4$	reg. (reguladores)
$1 \leq j \leq 5$	columnas (concentraciones)
$1 \leq k \leq 10$	rep (frascos)
$n = 200$	V.E. (total de frascos)

Por lo tanto este es un arreglo factorial 4×5 con $t^{(*)} = 20$ y un arreglo de las V.E. $(**)^2$ completamente al azar.

Factor R= Reguladores con 4 niveles y Factor C= Concentración de 5 niveles.

1 (*) t = Tratamientos

2 (**) V.E. = Variable Experimental

**CUADRO DE REGULADORES DE CRECIMIENTO UTILIZADOS EN
DIFERENTES CONCENTRACIONES PARA PROMOVER LA
GERMINACION DE EMBRIONES DE CAPULIN.**

**CONCENTRACIONES
EN mg/l**

		0.0	0.5	1.0	1.5	2.0	
		R					
E	1	NAA	NAA 0.0	NAA 0.5	NAA 1.0	NAA 1.5	NAA 2.0
L	2	IAA	IAA 0.0	IAA 0.5	IAA 1.0	IAA 1.5	IAA 2.0
A	3	BA	BA 0.0	BA 0.5	BA 1.0	BA 1.5	BA 2.0
D	4	GA3	GA3 0.0	GA3 0.5	GA3 1.0	GA3 1.5	GA3 2.0
O							
R							
E							
S							

IV 2.2. EVALUACION DE 12 COMBINACIONES DE REGULADORES DE CRECIMIENTO

De la misma forma para evaluar el efecto de los reguladores de crecimiento sobre la germinación de los embriones de capulín, se utilizó un diseño experimental completamente al azar.

En relación al efecto de los reguladores de crecimiento evaluados en combinaciones entre sí, tal fue el caso de NAA, IAA con BA, en 5 diferentes concentraciones 0,0, 0,5, 1,0, 1,5, 2,0 mg/l, en comparación con el GA₃ se utilizó un arreglo factorial de 12 x 5, es decir doce reguladores con cinco concentraciones distintas, obteniéndose 10 repeticiones aportando una muestra de 600 valores.

A cada una de las muestras (unidades experimentales o frascos), se les depositaron 5 embriones, teniendo en total una población de 3000 embriones para el presente análisis.

$x \leq ijk$	= % de germinación
$1 \leq i \leq 12$	reglones (reguladores)
$1 \leq j \leq 5$	columnas (concentraciones)
$1 \leq k \leq 10$	repeticiones (frascos)

$n = 600$	V.E. (total de frascos)

Por lo tanto este es un arreglo factorial 5×12 con $t^{(*)} = 60$ y un arreglo de las V.E. $(**)^4$
= Completamente al azar.

Factor R = Reguladores con 12 niveles y Factor C = concentración con 5 niveles.

3(*) (= Tratamientos

4(**) V.E. = Variable experimental

**CUADRO DE COMBINACIONES DE REGULADORES DE CRECIMIENTO
UTILIZADOS EN DIFERENTES CONCENTRACIONES PARA PROMOVER
LA GERMINACION DE EMBRIONES DE CAPULIN.**

**CONCENTRACIONES
EN mg/l**

		0.0	0.5	1.0	1.5	2.0	
R E G U L A D O R E S	1	NAA	NAA 0.0	NAA 0.5	NAA 1.0	NAA 1.5	NAA 2.0
	2	IAA	IAA 0.0	IAA 0.5	IAA 1.0	IAA 1.5	IAA 2.0
	3	BA	BA 0.0	BA 0.5	BA 1.0	BA 1.5	BA 2.0
	4	GAG	GAG 0.0	GAG 0.5	GAG 1.0	GAG 1.5	GAG 2.0
	5	NAA + 0.5 BA	NAA 0.0 + 0.0 BA	NAA 0.5 + 0.5 BA	NAA 1.0 + 0.5 BA	NAA 1.5 + 0.5 BA	NAA 2.0 + 0.5 BA
	6	NAA + 1.0 BA	NAA 0.0 + 0.0 BA	NAA 0.5 + 1.0 BA	NAA 1.0 + 1.0 BA	NAA 1.5 + 1.0 BA	NAA 2.0 + 1.0 BA
	7	NAA + 1.5 BA	NAA 0.0 + 0.0 BA	NAA 0.5 + 1.5 BA	NAA 1.0 + 1.5 BA	NAA 1.5 + 1.5 BA	NAA 2.0 + 1.5 BA
	8	NAA + 2.0 BA	NAA 0.0 + 0.0 BA	NAA 0.5 + 2.0 BA	NAA 1.0 + 2.0 BA	NAA 1.5 + 2.0 BA	NAA 2.0 + 2.0 BA
	9	IAA + 0.5 BA	IAA 0.0 + 0.0 BA	IAA 0.5 + 0.5 BA	IAA 1.0 + 0.5 BA	IAA 1.5 + 0.5 BA	IAA 2.0 + 0.5 BA
	10	IAA + 1.0 BA	IAA 0.0 + 0.0 BA	IAA 0.5 + 1.0 BA	IAA 1.0 + 1.0 BA	IAA 1.5 + 1.0 BA	IAA 2.0 + 1.0 BA
	11	IAA + 1.5 BA	IAA 0.0 + 0.0 BA	IAA 0.5 + 1.5 BA	IAA 1.0 + 1.5 BA	IAA 1.5 + 1.5 BA	IAA 2.0 + 1.5 BA
	12	IAA + 2.0 BA	IAA 0.0 + 0.0 BA	IAA 0.5 + 2.0 BA	IAA 1.0 + 2.0 BA	IAA 1.5 + 2.0 BA	IAA 2.0 + 2.0 BA

IV.3 DESCRIPCION DE LA METODOLOGIA

FASE II

IV.3.1 PLANTAS DE CEREZO (Prunus Avium L.)

Para obtener material vegetativo de cerezo (*Prunus Avium L.*) fue necesario la importación de las plantas provenientes de los Estados Unidos de un viverista del estado de Oregon, debido a que en nuestro país fue prácticamente imposible conseguirlos, ya que esta planta es muy poco conocida.

Las plantas de cerezo (*Prunus Avium L.*) fueron traídas de Europa a los Estados Unidos en 1950 y propagadas para ser utilizadas en cultivos comerciales. Se eligió dicha variedad de cerezo para ser utilizada en el presente estudio debido a que la mayoría de las variedades comerciales son derivadas de esta, por lo tanto podría ser utilizada como un injerto intermedio entre el capulín y cualquiera de las variedades que se quisiera manejar de forma comercial.

IV.3.2. SELECCION DE YEMAS

Fueron seleccionadas yemas apicales de cerezo cuya formación había sido durante el ciclo de desarrollo anterior al tiempo de ser injertadas con capulín, procurando siempre extraer los que fueran de desarrollo vegetativo (dardos) y que además coincidieran más o menos con el diámetro de los tallos de las plántulas de capulín. Esto es que tuvieran un diámetro aproximado de 2.5 a 3.0 mm y con una longitud de 5 a 7 mm. Estas medidas fueron determinadas por medio de un Bernier. Además solo se obtenían las yemas necesarias para cada sesión de microinjertación, debido a lo escaso de dicho material.

IV.3.3. ASEPSIA DE YEMAS

Las yemas obtenidas del cerezo una vez que habían sido seleccionadas, fueron sometidas a un proceso de limpieza (similar al que se dio a los embriones de capulín) antes de ser microinjertadas. Dicha limpieza se describe a continuación:

- a. Todas las yemas que iban a ser utilizadas se depositaban en una caja de Petri en donde eran sumergidas en etanol al 70% durante 60 segundos.
- b. Concluido el tiempo de inmersión se retiró el etanol de los frascos. Inmediatamente fueron esterilizadas las yemas con 80 ml de una solución a base de hipoclorito de calcio, detergente libre de fosfatos (Twing) y agua desilada, por un lapso de 15 minutos.
- c. Una vez concluida la esterilización las yemas de igual forma fueron lavadas con agua destilada y esterilizada, para retirar de su superficie cualquier residuo de cloro o detergente, que pudiera alterar de alguna forma la microinjertación.

IV.3.4. YEMAS LISTAS PARA LA MICROINJERTACION

Ya concluida la asepsia de las yemas, éstas quedaron listas para ser microinjertadas.

IV. 4. DESCRIPCION DE LA METODOLOGIA

F A S F III - MICROINJERTACION

IV.4.1 SELECCION DE PLÁNTULAS DE CAPULIN

Las plántulas que se habían obtenido a través del cultivo de embriones, cuyos diámetros se encontraban entre los 2.1 y 2.3 mm. determinadas estas medidas con un Bernier fueron las más aptas para realizar la microinjertación.

IV.4.2. SELECCIONADO DE YEMAS DE CEREZO

Las yemas de cerezo ya una vez esterilizadas en cajas de Petri bajo microscopio estereoscópico, fueron seccionadas realizando dos cortes diagonales, uno a cada lado de la yema.

IV.4.3. PREPARACION DE PLÁNTULAS DE CAPULIN PARA LA MICROINJERTACION

Las plántulas de capulín fueron decapitadas, quedando solo una porción de aproximadamente 3 cm a partir de la corona de la raíz, volviéndose a realizar otro corte perpendicular sobre la superficie del tallo que había sido cercenado.

IV.4.4. MICROINJERTACION DE YEMAS DE CEREZO SOBRE PLÁNTULAS DE CAPULIN

Concluidos los cortes necesarios y con la ayuda de dos pinzas de disección y del microscopio estereoscópico fueron unidas ambas plantas, procurando que quedaran en unión los tejidos de cambium de la yema con el tejido más externo de la plántula de capulín.

IV.4.5 CERRADO Y ETIQUETADO DE FRASCOS

Concluidas las operaciones anteriores y procurando no mover mucho las plántulas ya microinjertadas, fueron nuevamente implantadas en un nuevo medio nutritivo de Murashige y Skoog (1962) con sus concentraciones modificadas. Una vez colocados los microinjertos en el medio de cultivo, fueron cerrados los frascos (frente al mechero encendido), e inmediatamente sellados los mismos con sus tapas por medio de una película elástica (parafilm).

Concluido el cerrado de los frascos, se colocó una etiqueta de papel en la cual únicamente fue anotado la fecha de realización del microinjerto, buscando con esto mayor control del trabajo realizado.

IV.4.6. INCUBACION DE PLÁNTULAS MICROINJERTADAS

Una vez que se concluyó el sellado y etiquetado de los frascos, éstos fueron trasladados al recinto en donde serían cultivados, manteniéndose un control permanente sobre:

El fotoperiodo fue controlado (al igual que en el caso de los embriones de capulín), manteniéndose constante la iluminación por un lapso de 16 horas diarias por 8 de oscuridad a 1500 luxes.

De igual forma la temperatura empleada para esta fase del experimento también fue mantenida de manera constante a $27 \pm 1^\circ \text{C}$.

IV.4.7. EVALUACION DE PRENDIMIENTO DE PLÁNTULAS MICROINJERTADAS

Después de permanecer todas las plántulas microinjertadas por un mes en el recinto con controles de temperatura e iluminación, se llevó a cabo su evaluación en función del prendimiento de los microinjertos.

V. RESULTADOS

Todos los resultados que se presentan a continuación en cuanto a los reguladores de crecimiento, fueron para determinar el efecto de rompimiento de letargo de los embriones de capulín y de esta forma poder encontrar el regulador y la concentración idónea para la germinación.

V. 1. RESULTADOS DE CUATRO REGULADORES (NAA, IAA, BA, GA₃)

V.1.1. TABLA NUMERO I

Análisis de diferentes concentraciones de 4 reguladores de crecimiento en combinación de 5 niveles de concentración, para estimular la germinación de embriones de capulín.

NUM. de Reg.	REG.	CONCENT. mg/l	MEDIA no. de emb. germ. x frasco	% DE GERM.	AGRUPAMIENTO DE TUKEY (*)
4	GA ₃	0.5	3.00	75	A
3	BA	0.5	2.50	50	B
3	BA	1.0	2.00	40	C
4	GA ₃	1.0	2.00	40	C
1	NAA	1.0	1.30	25	D
1	NAA	2.0	1.30	25	D
3	BA	1.5	1.30	25	D
3	BA	2.0	1.30	25	D
1	NAA	0.5	1.00	20	F
2	IAA	0.5	1.00	20	E
1	NAA	1.5	0.80	15	F
2	IAA	1.0	0.80	15	F
2	IAA	2.0	0.80	15	F
4	GA ₃	1.5	0.80	15	F

NUM. de Reg.	REG.	CONCENT. mg/l	MEDIA no. de emb. germ. x frasco	% DE GERM.	AGRUPAMIENTO DE TUKEY (*)
2	IAA	1.5	0.50	10	G
1	NAA	0.0	0.00	0	H
2	IAA	0.0	0.00	0	H
3	BA	0.0	0.00	0	H
4	GA3	0.0	0.00	0	H
4	GA3	0.0	0.00	0	H

(*) Letras iguales indican igualdad estadística al 5% de probabilidad de error.

En la tabla no. 1 se observa, que de acuerdo al análisis de varianza de la prueba de DMSH(**) de Tukey, se encontró que el mejor resultado obtenido en la germinación de embriones de capulín, fue con GA3 con una concentración de 0.5 mg/l, teniéndose por tanto una media de 3.8, lográndose con esto una estimulación de los embriones de capulín del 75%. Siendo este el regulador que pudo adquirir el mejor porcentaje de germinación.

Siguiendo en el orden de agrupamiento de Tukey se encontró, que el BA (6-bencilaminopurina) en una concentración de 0.5 mg/l lograba también tener una media de 2.50 con un porcentaje de germinación del 50%. En cuanto a los dos valores que se encuentran con la misma letra, que son estadísticamente iguales (ver letra C), se demostró, que el BA en una concentración de 1.0 mg/l y GA3 con una concentración de 1.0 mg/l solo lograron una media de 2.0 respectivamente, con un porcentaje de germinación del 40%.

Para este experimento resultaba importante obtener un porcentaje mayor de germinación, por lo que los valores obtenidos inferiores al 40% del porcentaje de germinación, no resultaban ser útiles para dicho experimento.

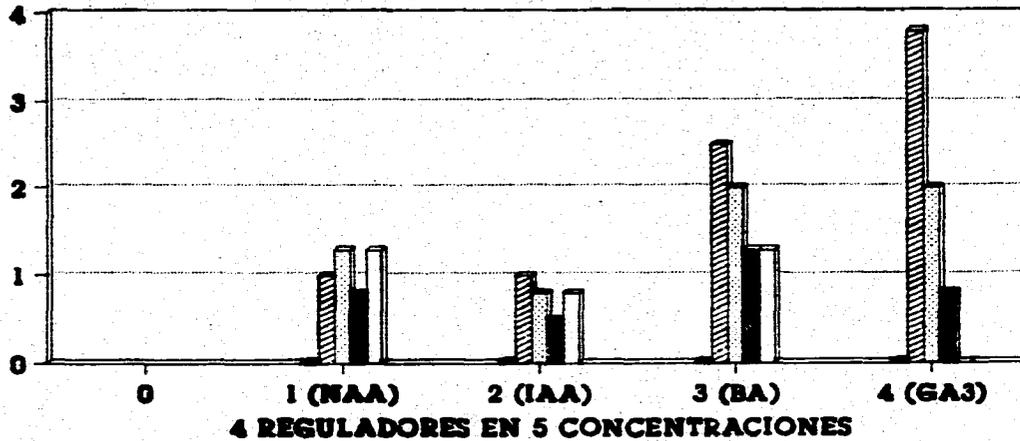
En el caso del control, que fue cuando en el medio de cultivo no se utilizó regulador alguno, la respuesta de los embriones para la germinación, fue negativa.

Todo lo anterior puede constatarse de mejor forma en la gráfica no. 1.

(**) DMSH = Diferencia mínima significativa honesta.

GRAFICA NO. 1
EFFECTOS DE REGULADORES EN DIFERENTES
CONCENTRACIONES SOBRE LA GERMINACION

MEDIAS DE EMBRIONES GERMINADOS X MUESTRA



4 REGULADORES EN 5 CONCENTRACIONES

CONC. EN mg/l

CONTROL **0.5 mg/l** **1.0 mg/l** **1.5 mg/l** **2.0 mg/l**

GERMINACION DE EMBRIONES DE CAPULIN

V. 1.2. TABLA NUMERO 2

Análisis de reguladores de crecimiento para estimular la germinación de embriones de capulín.

REGULADORES	NO. de Reg.	NUMERO DE REPET.	MEDIAS no. de embr. germ. x frasco	AGRUPAMIENTO DE TUKEY (*)
BA	3	50	1.420	A
GA3	4	50	1.320	A
NAA	1	50	0.880	B
IAA	2	50	0.620	B

(*) Letras iguales indican igualdad estadística al 5% de probabilidad de error.

ALPHA = 0.50 df = 171 MSE = 0.599269

VALOR CRITICO DE LA PRUEBA DE TUKEY = 3.669

DIFERENCIA MINIMA DE SIGNIFICANCIA = 0.40169

En la tabla no. 2 se observa que el efecto que provocaron los 4 reguladores por separado según el análisis de varianza de la prueba de DMSH (**) de Tukey sobre la germinación de embriones de capulín fue la siguiente:

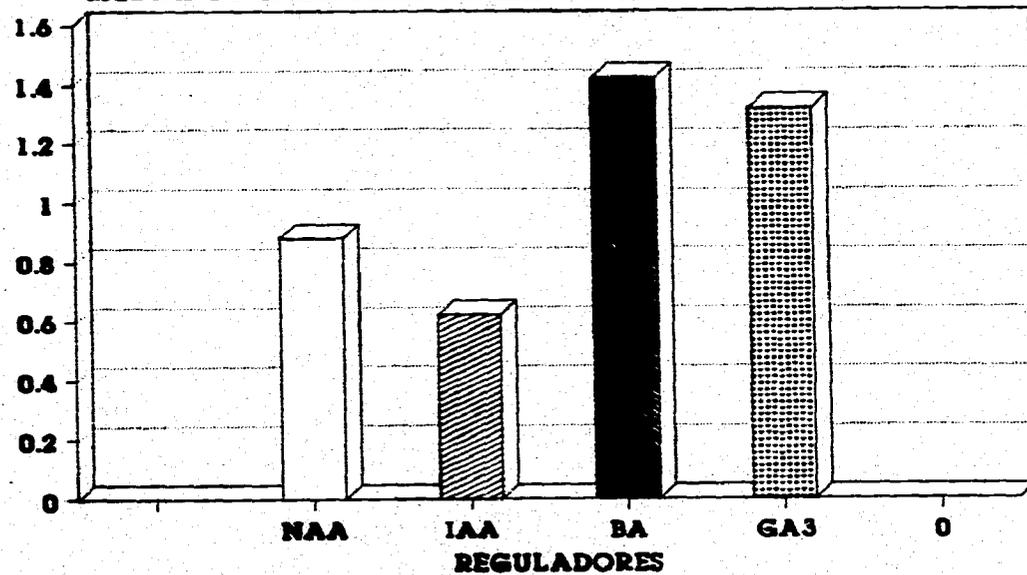
- En el caso del BA con una media de 1,42 embriones germinados por frasco, el efecto que se obtuvo a través de todas sus concentraciones sobre la germinación fue sobresaliente, en comparación con los resultados obtenidos por los otros tres reguladores.
- En lo referente al regulador GA3 con una media de 1,32 embriones germinados por frasco, aunque en la tabla no. 1 se muestra que su efecto sobre la germinación fue el mejor en comparación con los demás, en este caso resultó ser el segundo en eficacia, debido principalmente a que no en todas sus concentraciones presentó un porcentaje de germinación elevado.
- En cuanto al NAA e IAA, se observa, que su respuesta hacia la germinación en todas sus concentraciones, nunca pudieron superar el efecto obtenido por los dos reguladores anteriores.

Esto es posible apreciarlo de mejor forma en la gráfica no. 2.

(**) DMSH= Diferencia mínima significativa honesta.

**GRAFICA NO. 2
EFECTO DE LOS REGULADORES EN TODAS LAS
CONCENTRACIONES SOBRE LA GERMINACION**

MEDIAS DE EMBRIONES GERMINADOS X MUESTRA



GERMINACION DE EMBRIONES DE CAPULIN

V.1.3. TABLA NUMERO 3

Análisis de diferentes concentraciones de 4 reguladores de crecimiento para estimular la germinación de embriones de capulín.

CONCENTRACION mg/l	CONC. No.	NUMERO DE REPET.	MEDIAS No. de embr. germ. x frasco	AGRUPAMIENTO DE TUKEY (*)
0,5	2	40	2.150	A
1,0	3	40	1.525	B
2,0	5	40	0.850	C
1,5	4	40	0.850	C
0,0	1	40	0.000	D

(*) Letras iguales indican igualdad estadística al 5% de probabilidad de error.

$$\text{ALPHA} = 0.05 \quad \text{df} = 171 \quad \text{MSE} = 0.599269$$

VALOR CRITICO DE LA PRUEBA DE TUKEY = 3.899

DIFERENCIA MINIMA DE SIGNIFICANCIA = 0.47726

De la misma forma que en la tabla anterior, podemos observar (tabla no.3) que de acuerdo al análisis de varianza de la prueba de DMSH (**) de Tukey, la concentración que aportó el mejor resultado con todos los reguladores, fue la de 0.5 mg/l, con una media de 2.50.

El segundo lugar en importancia lo obtuvo la concentración de 1.0 mg/l con una media de 1.525.

Para el caso de las concentraciones de 1.5 y 2.0 mg/l los resultados obtenidos a través de todos los reguladores fue poco significativa, pues solo se logró una media de 0.85.

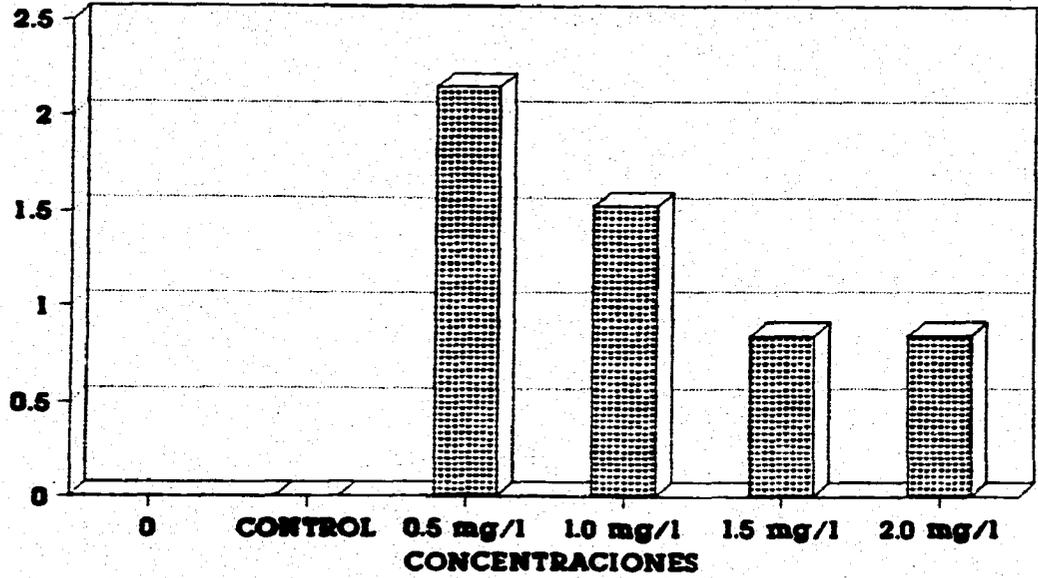
En lo referente al comportamiento que presentaron los embriones de capulín sin la presencia de reguladores ni concentraciones, fue de que no hubo germinación alguna; tal es el caso del control.

Todo lo expuesto se puede apreciar de mejor forma en la gráfica no. 3.

(**) DMSH = Diferencia mínima significativa honesta.

GRAFICA NO. 3
EFFECTO DE LAS CONCENTRACIONES DE TODOS
LOS REGULADORES SOBRE LA GERMINACION

MEDIAS DE EMBRIONES GERMINADOS X MUESTRA



GERMINACION DE EMBRIONES DE CAPULIN

V. 2. RESULTADOS DE 12 REGULADORES

En esta segunda etapa son presentados los resultados de las combinaciones de dos auxinas (NAA e IAA) en combinación con una citocinina (BA) en comparación con el efecto que provocó el GA₃ solo en sus diferentes concentraciones, como se expone a continuación:

V.2.1 TABLA NUMERO 4

Análisis de reguladores de crecimiento en combinación con diferentes niveles de concentraciones, para estimular la germinación de embriones de capulín.

NUM. de Reg.	REGU-LADOR	CONCENT. mg/l	MEDIA no. de emb. germ. x frasco	% DE GERM.	AGRUPAMIENTO DE TUKEY (*)
4	GA ₃	0.5	3.8	75	A
5	NAA+0.5BA	0.5	2.5	50	B
3	BA	0.5	2.5	50	B
6	NAA+1.0BA	1.5	2.0	40	C
7	NAA+1.5BA	1.5	2.0	40	C
8	NAA+2.0BA	2.0	2.0	40	C
9	BA	1.0	2.0	40	C
4	GA ₃	1.0	2.0	40	C
5	NAA+2.0BA	1.5	1.5	30	D
1	NAA	1.0	1.3	25	F
1	NAA	2.0	1.3	25	E
3	BA	1.5	1.3	25	E
3	BA	2.0	1.3	25	E
6	NAA+1.0BA	1.0	1.3	25	F

TABLA NUMERO 4

(continuación)

NUM. de Reg.	REGU-LADOR	CONCENT. mg/l	MEDIA no. de emb. germ. x frasco	% DE GERM.	AGRUPAMIENTO DE TUKEY (*)
7	NAA+1.5BA	2.0	1.3	25	E
9	IAA+0.5BA	0.5	1.3	25	E
1	NAA	0.5	1.0	20	F
2	IAA	0.5	1.0	20	F
10	IAA+1.0BA	1.0	1.0	20	F
1	NAA	1.5	0.8	15	G
2	IAA	1.0	0.8	15	G
2	IAA	2.0	0.8	15	G
4	GA3	1.5	0.8	15	G
5	NAA+0.5BA	1.0	0.8	15	G
5	NAA+0.5BA	1.5	0.8	15	G
6	NAA+1.0BA	0.5	0.8	15	G
6	NAA+1.0BA	2.0	0.8	15	G
7	NAA+1.5BA	0.5	0.8	15	G
7	NAA+1.0BA	0.5	0.8	15	G
11	IAA+1.5BA	1.0	0.8	15	G
12	IAA+2.0BA	1.5	0.8	15	G
12	IAA+2.0BA	2.0	0.8	15	G
2	IAA	1.5	0.5	10	H
8	NAA+2.0BA	1.0	0.5	10	H
9	IAA+0.5BA	1.0	0.5	10	H
9	IAA+0.5BA	1.5	0.5	10	H
10	IAA+1.0BA	0.5	0.5	10	H
10	IAA+1.0BA	2.0	0.5	10	H
11	IAA+1.5BA	0.5	0.5	10	H
11	IAA+2.0BA	1.0	0.3	5	I
12	IAA+2.0BA	1.5	0.3	5	I

TABLA NUMERO 4

(continuación)

NUM. de Reg.	REGU-LADOR	CONCENT. mg/l	MEDIA no. de emb. germ. x frasco	% DE GERM.	AGRUPAMIENTO DE TUKEY (*)
1	NAA	0.0	0.0	0	J
2	IAA	0.0	0.0	0	J
3	BA	0.0	0.0	0	J
4	GA3	0.0	0.0	0	J
4	GA3	2.0	0.0	0	J
5	NAA+0.5BA	0.0	0.0	0	J
5	NAA+0.5BA	2.0	0.0	0	J
6	NAA+1.0BA	0.0	0.0	0	J
7	NAA+0.5BA	0.0	0.0	0	J
8	NAA+2.0BA	0.0	0.0	0	J
8	NAA+2.0BA	0.5	0.0	0	J
9	IAA+0.5BA	0.0	0.0	0	J
9	IAA+0.5BA	2.0	0.0	0	J
10	IAA+1.0BA	0.0	0.0	0	J
10	IAA+1.0BA	1.5	0.0	0	J
11	IAA+1.5BA	0.0	0.0	0	J
11	IAA+1.5BA	2.0	0.0	0	J
12	IAA+2.0BA	0.0	0.0	0	J
12	IAA+2.0BA	0.5	0.0	0	J

ALPHA = 0.05 df=531 MSE = 0.4213779

VALOR CRITICO DE LA PRUEBA DE TUKEY = 4.642

DIFERENCIA MINIMA DE SIGNIFICANCIA = 0.42619

(*) Letras iguales indican igualdad estadística al 5% de probabilidad de error.

(**) DMSH = Diferencia mínima significativa honesta.

En la tabla no 4 se observa que de acuerdo al análisis de varianza de la prueba de DMSH (***) de Tukey, se encontró, que cuando los reguladores fueron combinados entre sí, NAA, IAA (auxinas), con el BA (citocininas), en comparación con el efecto provocado por el GA3 sólo (ácido giberélico) en cinco diferentes concentraciones.

El comportamiento de los reguladores en diferentes combinaciones es descrito a continuación:

El regulador GA3 con una concentración de 0.5mg/l, fue estadísticamente superior a todos los demás reguladores, con una media de 3.8 y un porcentaje de germinación del 75%.

El efecto antes descrito es seguido muy cerca por el efecto alcanzado del regulador (NAA en combinación con BA 0.5 mg/l) en una concentración de 0.5 mg/l y con una media de 2.5, siendo estos reguladores en combinación en esta concentración estadísticamente similar al efecto aportado por el BA sólo, con una concentración de 0.5 mg/l y una media de 2.5, teniendo un porcentaje de germinación para ambos casos del 50 % pero un valor de 1.30 por debajo de la media del efecto logrado por el GA3.

Los reguladores con la letra "C" del agrupamiento de Tukey, como el "NAA+1.0BA", en una concentración de 1.5 mg/l, el "NAA+1.5BA" en una concentración de 1.5 mg/l, el "NAA+2.0BA" en una concentración de 2.0 mg/l, el BA sólo en una concentración de 1.0 mg/l y el GA3, sólo en una concentración de 1.0 mg/l, lograron alcanzar una media de 2.0 obteniendo un porcentaje de germinación del 40%. Siendo este porcentaje todavía aceptable pero no recomendable para la germinación de los embriones de capullín, como los que se encuentran en el agrupamiento de Tukey denotados por la letra "A" y "B".

En cambio, todas los demás reguladores solos o combinados lograron un efecto poco significativo para el presente estudio, pues el valor que se buscaba, era el que aportara mayor porcentaje de germinación de los embriones de capullín, denotándose que desde la letra "D" del

agrupamiento de Tukey en adelante, ninguno de estos reguladores solos ni combinados, lograron alcanzar un valor mayor del 30%.

En el caso del control, que fue cuando en el medio de cultivo no se utilizó regulador alguno, la respuesta de los embriones para la germinación, fue negativa.

Todo lo anterior puede ser observado de mejor forma en la gráfica no. 4, en donde se aprecia el efecto provocado por las 12 combinaciones de los reguladores, así como de todas y cada una de sus concentraciones.

(**) DMSH = Diferencia mínima significativa honesta.

agrupamiento de Tukey en adelante, ninguno de estos reguladores solos ni combinados, lograron alcanzar un valor mayor del 30%.

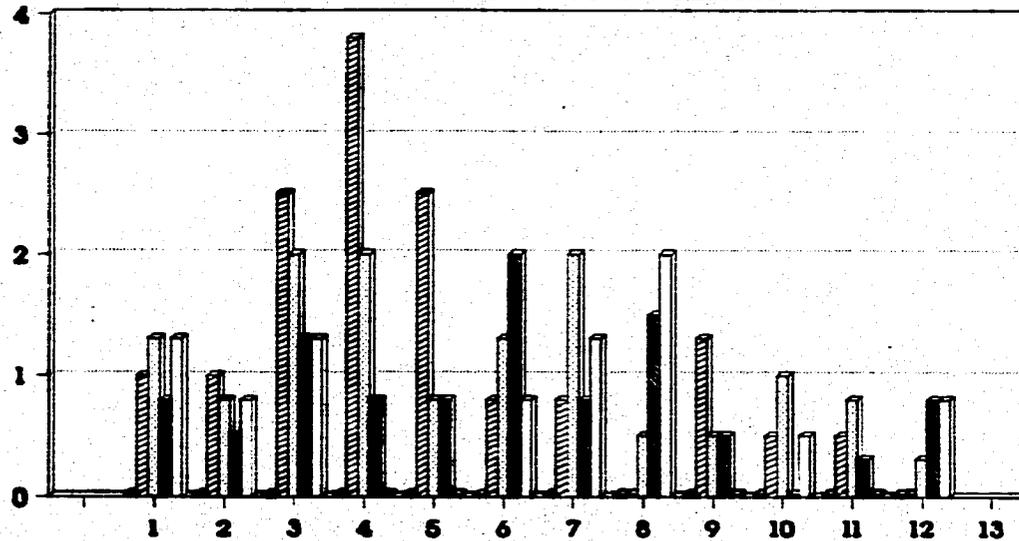
En el caso del control, que fue cuando en el medio de cultivo no se utilizó regulador alguno, la respuesta de los embriones para la germinación, fue negativa.

Todo lo anterior puede ser observado de mejor forma en la gráfica no. 4, en donde se aprecia el efecto provocado por las 12 combinaciones de los reguladores, así como de todas y cada una de sus concentraciones.

(**) DMISH = Diferencia mínima significativa honesta.

GRAFICA NO. 4
EFFECTO DE REGULADORES EN DIFERENTES
CONCENTRACIONES SOBRE LA GERMINACION

MEDIAS DE EMBRIONES GERMINADOS X MUESTRA



12 REGU.1-4 SOLOS;5-12 INTERACT.AUX/CIT.

GERMINACION DE EMBRIONES DE CAPULIN

V.2.2. TABLA NUMERO 5

Análisis de diferentes tratamientos con reguladores de crecimientos para estimular la germinación de embriones de capulín.

REGULADORES	NO. de Reg.	NUMERO DE REPET.	MEDIA no. de embr. germ. x frasco	AGRUPAMIENTO DE TUKEY (*)
BA	3	50	1.420	A
GA3	4	50	1.320	A B
NAA+1.5BA	7	50	0.980	B C
NAA+1.0BA	6	50	0.980	B C
NAA	1	50	0.880	C D
NAA+0.5BA	5	50	0.820	C D E
NAA+2.0BA	8	50	0.800	C D E F
IAA	2	50	0.620	C D E F G
IAA+0.5BA	9	50	0.460	C D E F G
IAA+1.0BA	10	50	0.400	E F G
IAA+2.0BA	12	50	0.380	F G
IAA+1.5BA	11	50	0.320	G

(*) Letras iguales indican igualdad estadística al 50% de probabilidad de error.

ALPHA = 0.05 df=531 MSE=0.4213779

VALOR CRITICO DE LA PRUEBA DE TUKEY = 4.642

DIFERENCIA MINIMA DE SIGNIFICANCIA = 0.40619

En la tabla no.5 se observa que el efecto que provocaron los doce reguladores solos o combinados en sus cinco concentraciones según el análisis de varianza de la prueba DMSH (***) de Tukey sobre la germinación de embriones de capulín, es el siguiente:

Los reguladores BA con una media de 1.42 y GA3 con una media de 1.32, fueron los que a través de todas sus concentraciones lograron un mayor porcentaje sobre la estimulación de la germinación, por lo que se clasificaron dentro del agrupamiento de Tukey con la letra "A", que

representa la categoría de más alta germinación. Pero para el caso del GA3 se puede observar que se encuentra clasificado en el grupo "A" y además en el grupo "B" debido principalmente a que no todas sus concentraciones resultaron tener el efecto tan eficiente, como el que presentó el regulador BA.

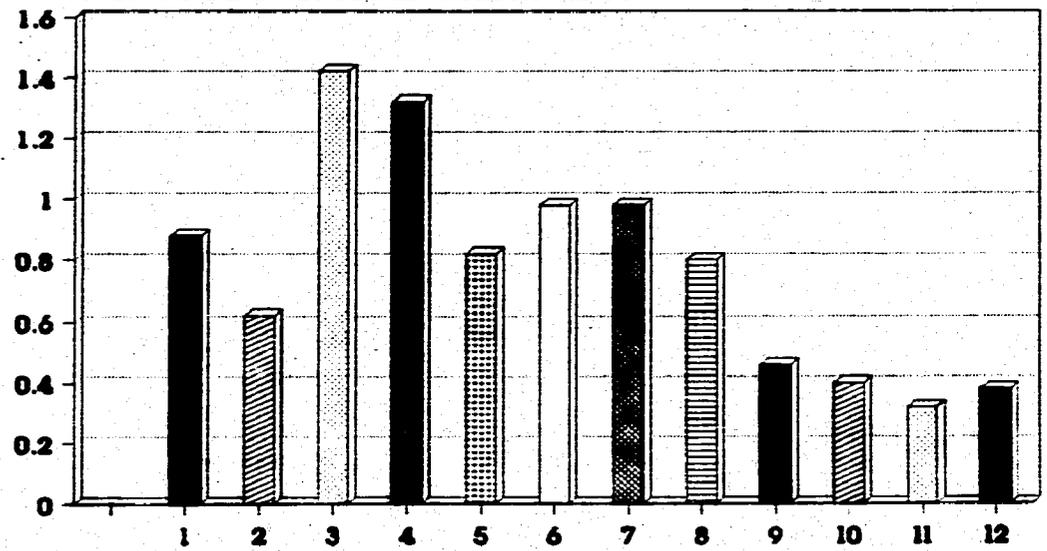
Las combinaciones del regulador "NAA+1.5BA" y "NAA+1.0BA" con una media de 0.980, lograron a través de todas sus concentraciones, aportar una adecuada germinación (letra "B").

Al contrario de los reguladores antes mencionados, los restantes, solos o combinados, a través de todas sus concentraciones, no alcanzaron un porcentaje de germinación alto, careciendo por lo tanto de importancia para el presente estudio (letras "C" hasta "G").

Lo antes expuesto se puede apreciar de mejor forma en la gráfica no.5.

**GRAFICA NO. 5
EFECTO DE REGULADORES EN TODAS LAS
CONCENTRACIONES SOBRE LA GERMINACION**

MEDIAS DE EMBRIONES GERMINADOS X MUESTRA



12 REGU;1-4 SOLOS;5-12 INTERACT.AUX/CIT

GERMINACION DE EMBRIONES DE CAPULIN

V. 2. 3. TABLA NUMERO 6

Análisis de diferentes concentraciones de reguladores de crecimientos para estimular la germinación de embriones de capulín.

CONCENTRACION mg/l	NUMERO NO. DE CONC.	NUMERO DE REPET.	MEDIAS no. de embr. germ. x frasco	AGRUPAMIENTO DE TUKEY (*)
0.5	2	120	1.2250	A
1.0	3	120	1.1083	A
1.5	4	120	0.8417	B
2.0	5	120	0.7333	B
0.0	1	120	0.0000	C

(*) Letras iguales indican igualdad estadística al 5% de probabilidad de error.

ALPHA = 0.05 df = 531 MSE = 0.4213779

VALOR CRITICO DE LA PRUEBA DE TUKEY = 3.871

DIFERENCIA MINIMA DE SIGNIFICANCIA = 0.22939

De la misma forma que en el análisis de los reguladores por separado, podemos observar (tabla no. 6), que de acuerdo al análisis de varianzas de la prueba de DMSH (**) de Tukey, la concentración que aportó el mejor resultado con todos los reguladores, fue la de 0.5 mg/l con una media de 1.225.

(**) DMSH = Diferencia mínima significativa Honesta.

El segundo lugar en importancia lo obtuvo la concentración de 1.0 mg/l con una media de 1.1083.

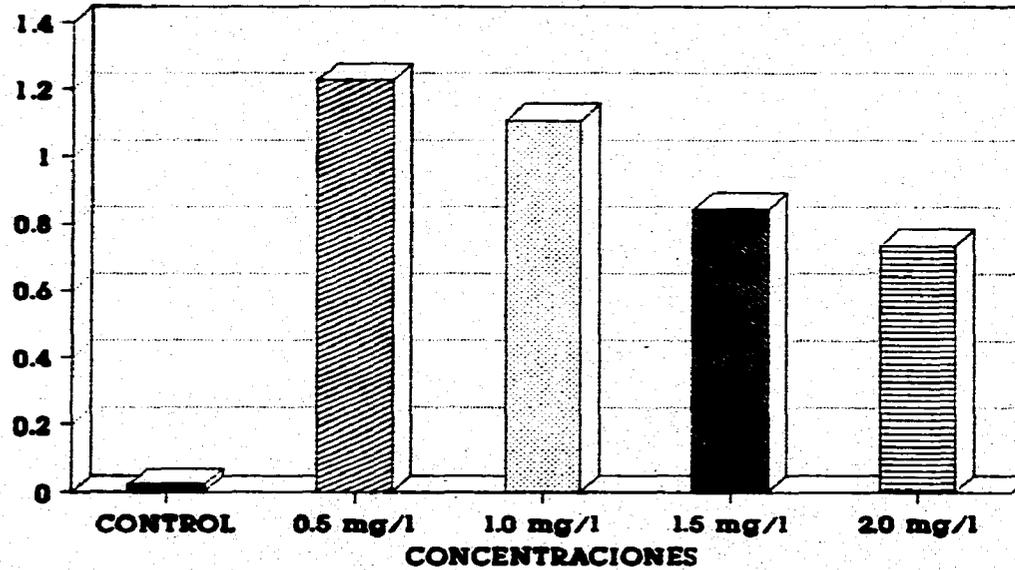
Para el caso de las concentraciones de 1.5 y 2.0 mg/l los resultados obtenidos a través de todos los reguladores, fueron poco significativas, pues sólo se alcanzaron una media de 0.7333 y 0.8417.

Referente al comportamiento de los embriones de capulín, sin la presencia de reguladores ni concentraciones tal es el caso del control, no presentó germinación alguna.

Es posible observar lo antes mencionado de mejor forma en la gráfica no. 6.

GRAFICA NO. 6
EFFECTO DE LAS CONCENTRACIONES DE TODOS
LOS REGULADORES SOBRE LA GERMINACION

MEDIAS DE EMBRIONES GERMINADOS X MUESTRA



GERMINACION DE EMBRIONES DE CAPULIN

V.3. RESULTADOS SOBRE LA MICROINJERTACION DE PLANTULAS DE CAPULIN CON YEMAS APICALES DE CEREZO.

Los resultados que aportó esta fase del estudio, fueron los siguientes:

De todas las plantas que fueron microinjertadas, se logró el 100% de prendimiento, sin presentar problema alguno, demostrándose, que de esta forma en el cultivo aséptico se puede evitar la interferencia de cualquier patógeno o agente extraño, que pudiera influir en la unión de ambas plantas.

VI. DISCUSION

En base a los resultados obtenidos se puede observar lo siguiente:

En la primera fase del experimento, que consistió en el cultivo *In Vitro* de embriones de capulín, se pudo comprobar que:

En la relación a los tratamientos pregerminativos para poder completar los requerimientos de las semillas de postmaduración, fue posible comprobar de manera experimental, que el tratamiento de estratificación que se les aplicó, fue el más idóneo en el que se sometieron a una temperatura de 4° centígrados durante un período de 48 horas, y de la misma forma realizándoles otro tratamiento que fue el de la escarificación (esto es retirar la cubierta dura del endocarpio por medio del prensado). Lo anterior es muy similar a lo expuesto por Varner en 1967, en donde expone, que muchas de las semillas requieren ser expuestas a bajas temperaturas (desde 0° hasta los 10°C), para interrumpir su reposo. Dicho tratamiento se denomina estratificación de la semilla. También lo expuesto por Varner, 1965, en donde expone, para que el agua pueda penetrar fácilmente en las semillas, se tienen que retirar las cubiertas de las semillas por medio de un procedimiento mecánico, denominado escarificación.

En lo referente a la esterilización de los embriones la utilización de hipoclorito de calcio al 2% durante 15 minutos, resultó ser el tratamiento más adecuado. Ya que si se incrementaba el tiempo de esterilización, resultaban los embriones seriamente dañados. Con ese tiempo determinado de manera experimental se consiguió en muchos de los casos, hasta un 100% de francos sin contaminar, tomando en cuenta que se trató al máximo de evitar una manipulación excesiva del material durante la implantación.

El medio de cultivo que se utilizó fue el "MS" (Murashige y Skoog), ya que es un medio bastante recomendado por muchos autores, tales como Evans et al (1981) Murashige, y Skoog, (1962), Murashige, (1974), Murashige, (1978) y Murashige et al (1972) para investigaciones de este tipo. Debido a que su contenido en sales es demasiado alto en su concentración original, provocó serios trastornos en el desarrollo de embriones de capulín, causando que se presentaran durante su desarrollo anomalías morfológicas, tales como ápices múltiples, y formación de callo esponjoso. Esto es similar a los resultados que obtuvo Murashige, (1974) en donde sus estudios realizados con fresa pudo determinar que la dilución de sales minerales del medio de cultivo, elevan el porcentaje del enraizamiento. Skirvin et al, (1981) en el cultivo *In Vitro* de zarzamora obtuvo

hasta un 80% de enraizamiento, utilizando bajas concentraciones de sales minerales del medio de cultivo "MS". Debido a estas anomalías, experimentalmente se tomó la decisión de reducir el contenido de sales de medio de cultivo "MS" al 50% de su concentración normalmente empleada, excepto en el caso de los nitratos de amonio y potasio, los cuales se redujeron de forma experimental en el laboratorio hasta un 10% de su concentración original. De esta forma fue como finalmente se logró llevar a cabo la evaluación de los embriones de capulín con los reguladores de crecimiento. Esto es similar al presentado por Hydman. (1982) cuando utilizó las sales minerales al 50% de su concentración normal del medio de cultivo "MS", obteniendo buenos resultados en la iniciación de raíz en brotes de rosal. Werner et al. (1980) describen algo similar: Utilizando el medio de "MS" en una tercera parte de la concentración original lograron de un 80 hasta un 100% de enraizamiento en el portainjerto de manzano, Malling Merton.

En relación a la utilización de los reguladores de crecimiento, debido a que no se conocía cual era la concentración adecuada para romper el letargo de los embriones de capulín, tuvieron que ser analizados los reguladores de crecimiento, tales como auxinas (NAA, IAA) citocininas (BA) y giberelinas (GA3) en diferentes concentraciones. Siendo analizadas de manera individual y en diferentes combinaciones, con lo que se pudo determinar experimentalmente, que el regulador que aportó los mejores resultados a través de todos los experimentos realizados fue la GA3, en la concentración de 0.5 mg/l con un porcentaje de germinación de 75%, seguido muy de cerca por el NAA+0.5BA en una concentración de 0.5mg/l y el BA en una concentración de 0.5mg/l con un porcentaje de germinación de 50% respectivamente.

Otros reguladores tales como el (NAA +1.0BA) en 1.5 mg/l, el (NAA+1.5BA) una concentración de 1.5mg/l, registraron un porcentaje significativo de germinación también el (NAA+2.0BA) en una concentración de 2.0 mg/l, el BA solo en una concentración de 1.0 mg/l y finalmente el GA3 solo con una concentración de 1.0 mg/l, todos estos obteniendo un 40% del porcentaje de germinación. El tratamiento de reguladores de crecimiento utilizado en este experimento es similar a lo expuesto por Pillay, (1966) el cual dice, que las auxinas, giberelinas y citocininas pueden servir de promotores del crecimiento en experimentos realizados con semillas de cerezos silvestre (*Prunus Avium*).

Yeou-Der et al (1968) dice, que la aplicación de promotores tales como los reguladores de crecimiento, suelen poner fin al reposo de las semillas de vid, adicionándoles GA3. Fogle et al,

(1960) aplicó GA3 a semillas de cerezo, interrumpiendo el letargo y propiciando la germinación. Frankland, (1961) aplicó GA₃ a muchas semillas de especies leñosas, obteniendo buenos resultados. La microinjertación:

Mediante la técnica de la microinjertación fue posible demostrar, que si se tiene control absoluto de todo el medio que rodea a dos plantas en unión, perteneciendo estas al mismo género no hay problema de que pueda ocurrir una unión adecuada entre ambas. El éxito alcanzado en este experimento del 100% de prendimiento así lo demuestra.

A través de la microinjertación fue posible observar, que entre el capulín y el cerezo si existe la afinidad y también la compatibilidad y que por lo tanto no existió hasta el momento de su análisis ninguna anomalía que pudiera demostrar lo contrario.

Por otra parte también fue posible demostrar, que si son controladas tanto las temperaturas como la iluminación dentro del cuarto de cultivo, este permite que las plántulas microinjertadas tuvieren un desarrollo de sus tejidos cambiales adecuado propiciándose con esto la cicatrización de una forma bastante acelerada.

Desafortunadamente no se contó con las fuentes bibliográficas adecuadas, ya que solamente se mencionaban los tipos de microinjertación, que se habían realizado, tales como el caso de microinjerto de yema logrado por Duarte, et al (1971), o el otro tipo de microinjerto de ápices de ramas, que fue utilizada para reproducir clones de cítricos libres de virus, ideado por Murashige, et al (1972). En estos tipos de microinjertos en toda la literatura citada, únicamente se mencionan los tipos de microinjerto, pero no los pormenores ni las dificultades por las que los autores pasaron, hasta llegar a la adecuada utilización de esta técnica.

La micropropagación y la microinjertación demuestran ser una apropiada forma de reproducir plantas en un tiempo relativamente corto, ya que si analizamos un poco cada uno de los eventos realizados podemos comprobar, que desde que se inicia el tiempo de germinación de las plántulas de capulín, hasta que se realiza la microinjertación es de apenas cuatro semanas y que el tiempo en que se puede disponer de estas ya como plantas para el cultivo comercial, puede ser de aproximadamente dos meses más.

Es posible concluir que es la técnica más apropiada para reproducir plantas de una variedad deseada en un tiempo "récord", ya que si se realizara la injertación de manera normal a cielo abierto, en primer lugar se tendría problemas con el medio ambiente, pues las plantas expuestas de esa forma tienen que resistir el ataque de plagas y enfermedades, además para realizarse la

injertación es necesario esperar aproximadamente un año después de que hubieran germinado las semillas de las plantas que servirían como patrón.

En cambio con la técnica antes expuesta, el tiempo desde la obtención de las plántulas del cultivo *in vitro* hasta la realización de la microinjertación es de apenas 4 semanas.

Dos meses después de haberse realizado la microinjertación las plantas son aclimatadas para alcanzar las condiciones naturales del medio ambiente (con un desarrollo de aproximadamente 20 cm de tallo) y después de un total de seis meses quedan listas para ser plantadas en el terreno definitivo.

VII. CONCLUSIONES

En base a los resultados obtenidos y de acuerdo a los objetivos planteados en el presente estudio, se puede concluir lo siguiente:

- 1 El tratamiento de estratificación de 4°C durante 48 horas, fue un tratamiento apropiado para estimular la germinación de los embriones de capulín.
- 2 El tratamiento de esterilización durante 15 minutos fue el más adecuado, para esterilizar tanto los embriones de capulín como las yemas de cerezo.
- 3 Reducir las sales minerales de Murashige y Skoog en un 50% de su concentración original y en un 10% los nitratos de amonio y potasio, fueron la solución para analizar el efecto de rompimiento del letargo de los embriones de capulín.
- 4 El regulador más sobresaliente en cuanto a obtener el mayor porcentaje de germinación de los embriones de capulín que fue del 75% de germinación, era el GA₃ con una concentración de 0.5 mg/l.
- 5 Los reguladores que también aportaron un adecuado porcentaje de germinación fueron el "NAA en combinación con 0.5mg/l de BA" y el "BA sólo en una concentración de 0.5mg/l" con el 50% de porcentaje de germinación.
- 6 Con toda la metodología descrita en este estudio se puede demostrar, que si es posible producir plántulas de cerezo en un corto tiempo.
- 7 Ejerciendo un adecuado control sobre el medio de cultivo es posible unir plantas del mismo genero sin presentar incompatibilidad, con una perfecta unión entre ambas plantas
- 8 Es posible obtener plántulas de capulín microinjertadas con cerezo en un tiempo muy reducido a diferencia de los métodos tradicionales de injertación

VIII. LITERATURA

Abosalim-A; Manthell-SH. (1992) Micrografting of pistachio (*pistacia vera* L. cv. Mateur) Plant-cell. -Tissue-and-Organ-Culture. 29. 3, 231-234. 14 ref.

Alvarez-JR; (1978) Enciclopedia tomo II. ed. Enciclopedia de México. S.A., México D.F. pp.352-365

Anderson-AJ; Abbot and Wiltshire-S; (1982). Micropropagation of Strawberry Plants *In Vitro* effect of growth regulators on incidence of multiplex anomaly. Horticultural Sci. 16: 331-341.

Anónimo, (1993). Anuario Estadístico de la Producción Agrícola de los Estados Unidos Mexicanos. Dirección General de Información Agropecuaria, Forestal y de la Fauna Silvestre SARH. Subsecretaría de Planeación, México, D.F. pp. 585-587.

Anónimo; (1984). Depto. de Agricultura de Iowa. State University; Traducción: Mariano Ambrosio Antonio. Manual de agricultura. Ed. Continental, S.A., México, D.F. 9a ed. pp. 380-391.

Anónimo; (1968). Dirección General de Sanidad Vegetal. Manual de plaguicidas autorizados para 1986. Ed. Talleres gráficos de la Nación, México, D.F.; pp 135, 190.

Anónimo; (1980). National Academy of Sciences. Tra. Aragonés, A. Manual. Desarrollo y control de las enfermedades de las plantas. Ed. Limusa. pp. 10, 28, 73, 92, 185.

Anónimo, (1971-1976). Plan Nacional de Desarrollo Frutícola. Ed. Conafut, México, D.F., pp. 75-78.

Anónimo. (1985). S A S Institute Inc., Cary, NC 27511, USA. Licenced to Computing Services Center. Texas A&M University, Site 09064001.

Bidwell-RSS, (1978). Fisiología vegetal, Agt. ed. México, 1a. ed. pp 388-420.

Calderón-AE; (1983). *Fruticultura General*. Ed. Limusa, México, D. F. pp 646-649.

Calderón-AE; (1983) *La poda de los Arboles Frutales*, ed Limusa México,D.F., 3a ed. pp.483-491.

Caponetti-JD; Hall, G.C. y Farmer-RE Jr. (1971) *In Vitro* growth of Black cherry callus: Effects of medium environment, and clone, bot. Gaz. 132(4): pp 313-318.

Carvalho-F; (1985). *Manual Práctico de Fruticultura*. Ed. Litográfica Errefe, S.A., México, D.F., pp.121.

Chaleff-RS; (1983). Isolation of agronomically useful mutants from plant cell cultures, *Science* pp. 219; 676-682.

Childers-NF; (1961). *Modern fruit Science*, Horticultural Publications New Brunswik, New Jersey, second ed. Chapter XVI, pp 413-449.

Cronquist-A; (1984). *Introducción a la Botánica*. Ed. Continental, S.A., México, D. F. pp. 449-451.

Cupidi-A; (1992). In-Vitro micrografting of stone fruits. *Petria*, 2: Suplemento 1 , 7-15; 12 ref.

Cupido-A; Barba-M; (1993). Optimization of micrografting in-vitro to obtain grape free from infection. *Vignevisini*.20: 4, 43-46; 10 ref.

Detrez-C; (1994) Shoot production through cutting culture and micrografting from mature tree explants in *Acacia tortilis* (Forsk.) Hayne subsp. *Raddiana* (Savi) Brenan. *Agroforestry-Systems*. 25: 3, 171-179; 22 ref.

Devlin-MR; (1980) Fisiología Vegetal Ed Omega, S.A, Barcelona España, pp. 339-410

Doley-DI, and Leyton (1970). Effects of growth regulating substances and water potential on the development of wound callus in fraxinus, *New phytol*, pp.69.87-102.

Domenech-TJMT; (1983). Atlas de botanica Ed Ingesa, Barcelona, España 28a. ed pp. d1, d2.

Duarte-O y Medina-C; (1971) Propagation of citrus by improved mound layering, *Hortscienc*, 6: 567.

Escalapón-D; Ravel-de-G, Ballot-R; (1976) Nuevo tratado práctico de fruticultura. Ed Blume, Barcelona, España. pp 251-277.

Evans-et-al; (1981) Growth and Behaviour of cell cultures: Embryogenesis and organogenesis in plant tissue culture: Methods and applications in Agriculture (T.A. Thorpe, Ed) Academic Press, New York. pp. 45-113.

Everett-NP; Wang-TL and Street-HE; (1977). Hormone regulation of cell culture. Ed. by H. E. Street. 2nd. ed. Blackwell Scientific Public. pp 307-316.

Fogle-HW y McCrory-CS; (1960). Effects of cracking, after-ripening and gibberellin on germination of Lambert cherry seeds. *Proc. Amer. Soc. Hort. Sci.* 76: 134-138.

Frankland-B; (1961). Effects of gibberellic acid, kinetin and other substances on seed dormancy. *Nature* 192: 678-679.

Gamborg-et-al; (1968). Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp. Cell Res.*, pp. 50, 151-158.

- Hartman-H, Hudson-T, Dale-E, Kester (1981). Propagación de plantas. Ed Continental, S. A., México, D.F. 2a De. pp 401-541; 639-666; 676-678.
- Hernández-M; (1974). Valores Nutritivos de los alimentos Mexicanos. Ed. por la Division de la Nutricion. Instituto Nacional de la Nutrición. México, D.F. pp 8-12.
- Herrero-J y Tabuena-MT; (1969). Incompatibilidad entre patrón e injerto. X. Comportamiento de la combinación melocotonero/miobalán injertado en estado cotiledonario, *An. Estac. exp. Aula Dei*. 10: 937-945.
- Hurtado-DVM; Merino-MEM; (1987). Cultivo de Tejidos Vegetales. Ed. Trillas, S.A. de C.V., México, D.F., pp. 70.
- Hydman-R; (1982) Some aspects of the inorganic nutrition of plant tissue cultures in plant tissue culture berkeley. *C dif.* pp. 18:35.
- Kao-KN; (1977). Chromosomal behaviour in somatic hybrids of soybean-nicotina. *Gluc. Mol. Gen. Genet.* pp. 150, 225-230.
- Ke-S; Cai-Q; Skirvin-RM; (1993-1994). Micrografting speeds growth and fruiting of protoplast-derived clones of kiwifruit (*Delicious Actinidia*). *Journal of horticultural science*, 68: 6, 837-840; 7 PL. ; 6 REF.
- Lane-WD; (1978). Regeneration of apple plants from shoot meristems tips. *Plant Sci. Lett.* 13: 281-285.
- Leo-ECM and Defossard-RA; (1977). Some factors affecting multiple bud formation of strawberry (*fragaria X ananassa ducho ene*). *In Vitro. Acta horticulurae*. 78: 187-195.
- Linsmaier-EM and Skoog-F; (1965). Organic growth factor requirements for tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.*; pp. 18, 100-127.

Loma-de-la-Jl., (1982). Experimentación Agrícola. Ed. Union Tipografica Editorial Hispano-Americana, S.A. De C.V., pp. 220-307

Martin-E; (1979). Los árboles. Ed. Fontaba. Barcelona, España, 1a Ed. pp. 80-83.

Martino-I., (1992) In-Vitro micrografting of grapevine. *Petria*. 2: Suplemento 1. 17-25; 8 ref..

Miller-CA, Coston-DC, Denny-EG and Romeo-ME; (1982). *In Vitro* propagation of "nemaguard" peach rootstock. *Hort. Sci.* 17:194.

Monteuuis-O; (1994). Effect of technique and darkness on the success of meristem micrografting of *Picea abies*. *Silvae-Genetica*. 1994, 43: 2-3, 91-95; 23 ref..

Moose-B; (1962) Graft - Incompatibility in fruit trees. Tech. Comm. Num. 28, Comm. Bur. Hort. and Plant. Crops, East Malling, England.

Murashige-T and Skoog-F; (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.* pp. 15, 473-497.

Murashige-T; (1974). Plant propagation through tissue culture. *Annu. Rev. Plant Physiol.* pp. 25, 135-166.

Murashige-T; (1978). The impact of plant tissue culture on agriculture. In *frontiers of plant tissue culture* (T.A. Thorpe, ed.) Univ. of Calgary Press, Calgary Canada . pp. 15-26.

Murashige-T y Bitters-WP, T.S. et al (1972). A technique of shoot apex grafting and its utilization towards recovering virus-free citrus clones, *Hort Science*, 7: 118-119.

Nagata-T and Takebe-I. (1971). Planting of isolated Tobacco mesophyll protoplasts on agar medium. *Plant.* pp. 99, 12-20.

Nakamura-C and Keller-WA; (1982). Callus proliferation and plant regeneration from immature embryos of hexaploid triticales. *A. Pflanzenzucht.* pp. 88, 137-160.

Ozzambak-E, Schmidt-H; (1991). In vitro and in vivo micrografting of cherry (*Prunus avium* L.). *Gartenbauwissenschaft.* 56: 5, 221-223; 2 pl., 1 fig; 10 ref.

Perrin-Y; Lardet-L; Enjalric-F; Carron-MP; (1994). Rejuvenation of mature clones of *Hevea brasiliensis* (Mull. Arg.) by in-vitro micrografting. *Canadian-Journal of Plant Science.* 74: 3, 623 - 630; 9 pl., 1 fig.; 24 ref.

Pierik-RLM; (1990). Cultivo In-Vitro de las Plantas Superiores. Dept. of Horticulture, Agricultural University, Wageningen, The Netherlands. Ed. Mundi-Prensa, Madrid, España.

Pilley-DTN; (1966). Growth substances in developing Mazzard Cherry seeds. *Canadian Jour. Bot.* 44: 507-512.

Ponette-AF; (1966). Virus diseases of fruit plants. *Proc. XVII Int. Hort. Cong.*, Vol. 3, pp. 89-93.

Rebour-H; (1971). *Frutales Mediterraneos.* Ed. Mundi-Prensa, Madrid, España. 4ª Ed.; pp 235 - 242.

Sánchez-SO; (1978). *La flora del Valle de México.* Ed. Herrero. México D.F., pp. 191-192.

Schenk-RV and Hildebrandt-AC (1972). Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. *Can. J. Bot.* 50: 199-204.

Schieckler-CI, (1980). Somatic híbrids between a herbaceous and two tree datura species. *Z. Pflanzenphysiol.* pp. 98, 119-127.

Schneider-GW y Scarborough-CC; (1980). Cultivo de árboles frutales. Ed. Continental, S.A., México, D.F. 15a. Ed. pp. 325-349.

Sebrell-H; Willian-JR; Haggerty-JJ; (1980). Alimentos y Nutrición. Ed. Time Life, México, D.F., 2a. Ed. pp. 192-193.

Seymour-J; (1980). El Horticultor Autosuficiente. Ed. Blume, Barcelona, España. pp. 43, 172-173.

Shippy-WB; (1930). Influence of environment on the callusing of apple cuttings and grafts. *American Journal Bot.* 17: 290-327.

Silva Lezama-A; (1968). La granja. Ed. Hobby, Buenos Aires, Argentina. pp. 185-193.

Skirvin-RM, Chu-MC and Gómez-E; (1981). *In-Vitro* propagation of thornless trailing blackberries. *Hort. Sci.* 16: 310-312.

Snir-I and Erez-A; (1981). Micropropagation of red raspberry. *Hort. Sci.* 14: 139-143.

Snir-I and Erez-A. (1982). *In-Vitro* Propagation of sweet cherry cultivars. *Hort. Sci.* 17: 192-193.

Starrantino-A; (1992). In vitro micrografting of citrus. *Petria*, 2: Supplement 1, 27-35; 13 ref.

Tamaro-D; (1979). Tratado de fruticultura. Ed. Blume, Barcelona, España. pp. 251-277.

Teakey-BJE; (1978). Tree fruit production. Aut. Publishing Co. Inc. USA. pp 292-357.

Vasil-IK and Vasil-V; (1980). Clonal propagation. *Int. Rev. Cytol.*, Suppl. 11a, pp. 145-173.

Wayne-WD; (1993). Biostatística. Georgia State University. Ed. Uteha Noriega Editores, México, D.F., pp. 283-349.

Weaver-JR; (1984). Reguladores de crecimiento de las plantas en la agricultura. Ed. Trillas, México, D.F. pp. 176-190; 235.

Werner-EM and Bos (1980). *In-Vitro* propagation of malling 7 apple rootstock. *Sci.* 15: 505-510.

White-PR; (1963). The cultivation of animal and plant cells. 2nd. Ed. Ronald Press, New York.

Yeu-Dar-K; Weaver-RJ y Pool-RM; (1968). Effects of low temperature and growth regulators on germination of seeds of "Tokay" grapes. *Proc. Amer. Soc. Hort. Sci.* 92: 323-330.

Zimmerman-RH and Broome-OC; (1980). Micropropagation of thornless Blackberry. U.S., Dep. Agric. Sci. Educ. Admin. Arr-Ne 11: 23-27.

ANEXO I

PRODUCCION DE CERESO A NIVEL MUNDIAL

(MILES DE TONELADAS)

PRODUCCION POR CERESOS PAISES	1960	1961	1962	1963	1964	%
ALEMANIA	242	220	200	235	207	0.3
ESPAÑA	237	230	215	240	228	0.1
FRANCIA	—	—	50	100	107	—
ITALIA	211	202	216	210	230	7.3
U S A	233	242	200	198	207	0.0
PRODUCCION MUNDIAL	2,804	2,830	2,680	2,170	2,180	100%

FUENTE: FAO/FAO, ESTADÍSTICAS MUNDIALES DE CERESOS 1971, Pág. 228

ANEXO 2

CUADRO DEMONSTRATIVO DE VALORES NUTRICIONALES DE ALGUNOS PRODUCTOS EN COMPARACION CON EL CERESO

NOMBRE	PRINCIPIOS NUTRICIONALES				MINERALES					VITAMINAS					PORCION MEDIA		
	SOLIDOS (%)	AGUA (%)	PROTEINA (g)	GRASA (g)	CARBOHIDRATOS TOTALES (g)	CALCIO (mg)	FOSFORO (mg)	MIERMO (mg)	SODIO (mg)	POTASIO (mg)	(A) RETINOL (UI)	(B ₁) TIAMINA (mg)	(B ₂) RIBOFLAVINA (mg)	NIACINA (mg)	(C) ACIDO ASCORBICO (mg)	MECIDA	PESO EN GRAMOS
CEREZA	16.3	88.2	1.2	0.3	14.3	2.2	19	0.4	2	191	1033	0.05	0.08	0.4	10	1 TAZA	184
DURAZNO	10.9	89.1	0.6	0.1	9.7	19	19	0.3	1	208	1330	0.02	0.08	0.1	0.7	1 TAZA	114
MORZANA	18.6	81.4	0.2	0.6	14.8	7	10	0.3	1	110	80	0.08	0.02	0.1	0.4	1 TAZA	190
PERA	16.8	83.2	0.7	0.6	18.3	8	11	0.3	2	130	20	0.02	0.04	0.1	0.4	1 TAZA	182
FRESA	10.1	89.9	0.7	0.8	9.4	23	21	1	1	104	60	0.03	0.07	0.6	8.9	1 TAZA	148

FUENTE: PUBLICACION DEL INSTITUTO NACIONAL DE LA NUTRICION, MEXICO, 1974

NOTA: (g) SIGNIFICA UNIDADES INTERNACIONALES

Como se veó a continuación cuatro ingredientes principales (grasa, proteína, carbohidratos y agua) se presentan en el centro. El peso de estos elementos se expresa en gramos y el de los minerales y vitaminas en miligramos. La vitamina "A" es una excepción, se mide en unidades internacionales de los especialistas en nutrición, cada una de las cuales es igual a 0.603 miligramos de vitamina "A" contenida en un alimento vegetal.

Para fines comparativos, el cuadro de los contenidos de una porción de 100 gramos, salvo en las tres últimas columnas cuyas cifras se refieren a porciones medidas.

ANEXO 1

MATERIALES, EQUIPO E INSTALACIONES

I - MATERIALES

- Vasos de precipitados de 250, 500 y 1000 ml.
- Matraces Erlenmeyer de 250, 500 y 1000 ml.
- Probetas de 50, 100 y 250 ml.
- Pipetas graduadas de 1 y 10 ml.
- Cajas de petri.
- Tubos de ensayo.
- Frascos (Garber) chicos y grandes.
- Pizamo de disección.
- Mango de bisturi del número 4.
- Navaja para bisturi del número 23.
- Bernier
- Papel aluminio grueso (Reynolds Wrap).
- Lijas de hule.
- Pelicula adherente (Parafilm).
- Etiquetas autoadheribles (3M).
- Tijeras de podar (Felco).
- Cámara fotográfica (Minolta).
- Rollos de impresiones y transparencias (Kodak).
- Reactivos (Todos los empleados para preparar los medios.)

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

2 - EQUIPO:

- Potenciómetro (Coleman mxdl. 100)
- Balanza granataria.
- Balanza con capacidad para 15 Kg
- Autoclave horizontal y vertical
- Destilador de agua
- Campana de flujo laminar
- Refrigerador.
- Mechero de Bunsen.
- Microscopio de disección.
- Parrilla eléctrica.

3.- INSTALACIONES

- Cuarto hermético para sembrado
- Cuarto de cultivo con controles ajustables de temperatura e iluminación.
- Cámara frigorífica.
- Invernadero con controles ajustables de temperatura, iluminación, humedad y ventilación.

ANEXO 4**COMPOSICION DEL MEDIO MS**

COMPUESTO	NOMBRE COMUN	CANTIDAD EN mg/l
<u>MACRONUTRIENTES</u>		
NH ₄ NO ₃	NITRATO DE AMONIO	1650
KNO ₃	NITRATO DE POTASIO	1900
CaCl ₂ ·2H ₂ O	CLORURO DE CALCIO	440
KH ₂ PO ₄	FOSFATO DE POTASIO	170
MgSO ₄ ·7 H ₂ O	SULFATO DE MAGNESIO	370
<u>MICRONUTRIENTES</u>		
MnSO ₄ ·4H ₂ O	SULFATO DE MANGANESO	22.3
H ₃ BO ₃	ACIDO BORICO	6.3
ZnSO ₄ ·7 H ₂ O	SULFATO DE ZINC	8.6
Na ₂ MoO ₄ ·2 H ₂ O	MOLIBDATO DE SODIO	0.25
KI	YODURO DE POTASIO	0.83
CoCl ₂ ·6 H ₂ O	CLORURO DE COBALTO	0.025
CuSO ₄ ·5 H ₂ O	SULFATO DE COBRE	0.025
E.D.T.A. Na ₄	ETILEN DINITRIL TETRACETATO	37.3
FeSO ₄ ·7H ₂ O	SULFATO FERROSO	27.8
Sacarosa	HIDRATOS DE CARBONO	30,000
<u>VITAMINAS</u>		
Olicina		2.0
Meen-inositol		100
Tiamina	VITAMINA B1	0.1
Pinidoxina	VITAMINA B6	0.5
Ac. Nicotínico	VITAMINA	0.5
pH	POTENCIAL HIDROGENO	5.8

FUENTE: Yeoman-MM, MacLeod-AJ, Plant Tissue and Cell Culture. Chapter 3, pp. 39; 43

1984.

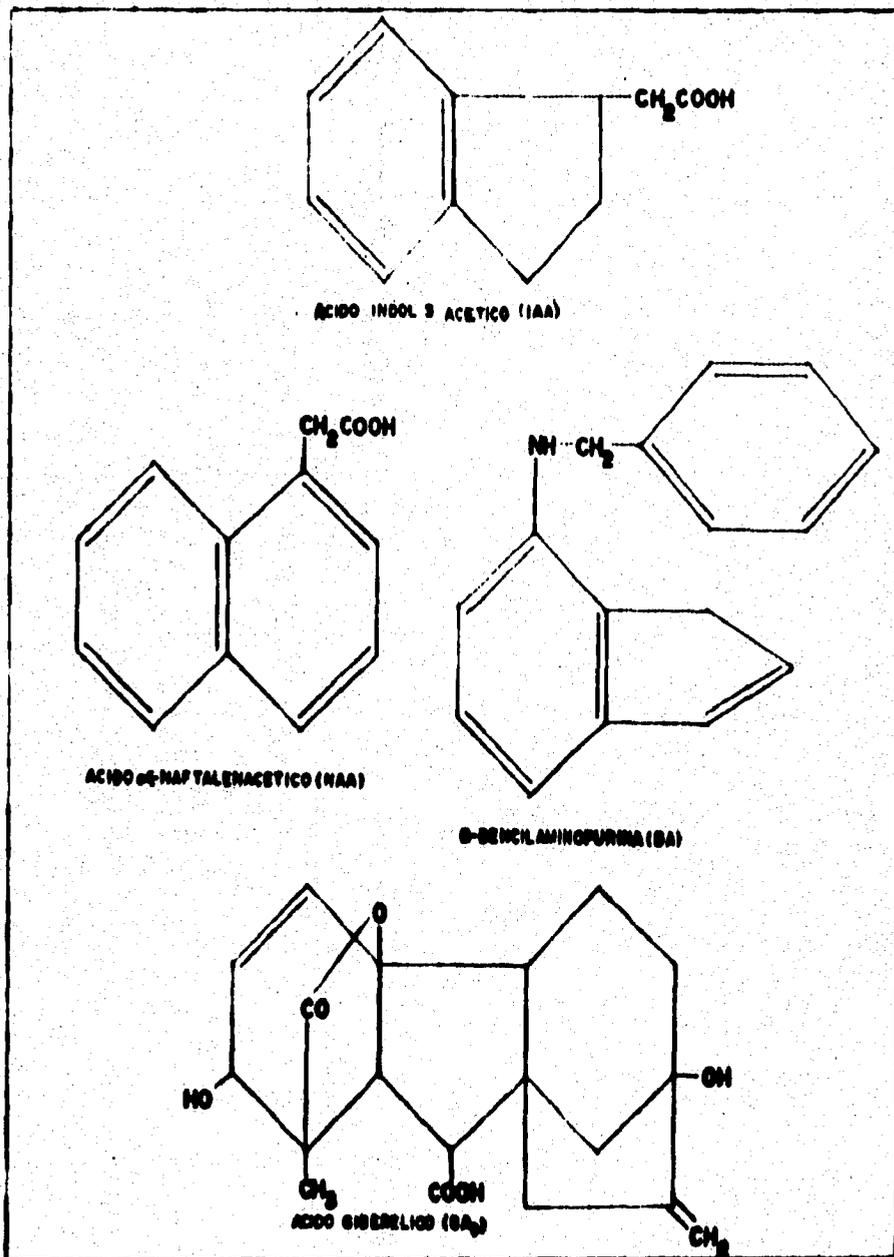
ANEXOS

LOS REGULADORES DE CRECIMIENTO EMPLEADOS EN EL PRESENTE ESTUDIO FUERON:

NAA - ACIDO NAFTALEN ACETICO	} -- AUXINAS
IAA - ACIDO INDOL 3 ACETICO	
BA - 6 BENCILAMINO PURINA	-- CITOCININA
GA₃ - ACIDO GIBERELICO	-- GIBERELINA

Sus fórmulas se encuentran representadas en el esquema no. 1.

ESQUEMA 1
FORMULAS ESTRUCTURALES Y NOMBRES DE LOS REGULADORES DE CRECIMIENTO
EMPLEADOS EN EL PRESENTE ESTUDIO



FUENTE: DEVLIN, M. ROBERT. ED. OMEGA. BARCELONA, ESPAÑA, 1980, pp. 339-411