



**Escuela Nacional de Estudios Profesionales**

**IZTACALA - U.N.A.M.**

**ENRAIZAMIENTO *in vitro* DE DOS  
PORTAINJERTOS DE MANZANO**

*(Malus pumila Mill)*

30376/86

**T E S I S**

Que para obtener el título de:

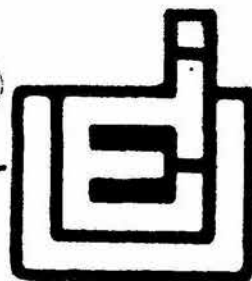
**B I O L O G O**

P r e s e n t a :

**Ana María Castillo González**

Los Reyes Iztacala, Estado de México

1986





Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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

Este trabajo fue desarrollado en el Laboratorio de Cultivo *in vitro* del Centro de Fruticultura del Colegio de Postgraduados, bajo la dirección del M. en C. Angel Villegas Monter.

## AGRADECIMIENTOS

Al M. en C. Angel Villegas Monter, por abrirme las puertas de su laboratorio para terminar mi carrera y realizar mi trabajo de tesis bajo su dirección, así como por la amistad que me brindó incondicionalmente.

Al Dr. Angel Martínez Garza, por sus orientaciones en el aspecto Estadístico.

Al Sr. Guillermo Arellano Hernández, quien además de sus enseñanzas me ha brindado su gran amistad.

A mis profesores: Ana Ma. López, Angel Durán, Enrique Bañuelos y José Monterrubio, quienes en el transcurso de mis estudios no sólo me brindaron sus conocimientos, sino también su amistad y apoyo desinteresados.

Al M. en C. Edilberto Avitia García, por su participación significativa en la elaboración de este trabajo y por el respaldo que siempre me ha brindado.

A la Sra. Lilia O. Díaz de C. por su valiosa participación en la parte mecanográfica.

## DEDICATORIA

### A mis Padres:

Justino y Sofía, quienes me dieron la vida y me han enseñado a andar por ella con honradez y orgullo, quienes han hecho de mi una ciudadana útil, quienes en mis aciertos y tropiezos están y estarán junto a mi, quienes han sido el primer motivo de mi existencia, quienes al final de mi camino y en la eternidad, seguirán siendo "Mis Padres".

### A mis Hermanos:

Víctor M., Ma. del Rosario, Ma. Cristina y Beatriz, por el amor y apoyo que nos ha unido por siempre y para siempre.

## TABLA DE CONTENIDO

	PAG.
LISTA DE CUADROS . . . . .	iv
LISTA DE FIGURAS . . . . .	vi
RESUMEN . . . . .	vii
INTRODUCCION . . . . .	1
ANTECEDENTES Y REVISION DE LITERATURA . . . . .	3
1. Aplicaciones de la propagación <i>in vitro</i> . . . . .	3
2. Aspectos históricos y conceptualización del cultivo <i>in vitro</i> . . . . .	6
3. Técnicas para la propagación <i>in vitro</i> . . . . .	9
3.1 Medios de cultivo . . . . .	12
3.1.1 Sales orgánicas basales . . . . .	12
3.1.2 Suplementos del medio de cultivo . . . . .	13
3.1.3 Características físicas . . . . .	16
3.2 Condiciones ambientales para la propagación <i>in vitro</i> . . . . .	18
3.2.1 Influencia de la luz . . . . .	18
3.2.2 Influencia de la temperatura . . . . .	20
3.2.3 Humedad relativa . . . . .	20
4. Establecimiento y formación de brotes . . . . .	21
5. Enraizamiento . . . . .	27
5.1 Enraizamiento <i>in vitro</i> . . . . .	28
5.1.1 Diversas especies . . . . .	28
5.1.2 Manzano . . . . .	35

6. Establecimiento a suelo . . . . .	54
7. Enraizamiento en suelo . . . . .	64
OBJETIVOS . . . . .	68
MATERIALES Y METODOS . . . . .	69
1. Material vegetativo . . . . .	69
2. Medios de cultivo . . . . .	70
3. Diseño experimental . . . . .	70
4. Desarrollo del trabajo bajo condiciones asépticas . . . . .	73
5. Desarrollo del trabajo en condiciones no asépticas . . . . .	74
6. Toma de datos . . . . .	74
7. Análisis de los datos obtenidos . . . . .	75
RESULTADOS . . . . .	77
1. Portainjerto MM.106 . . . . .	77
1.1 Longitud de brotes . . . . .	77
1.2 Número de hojas . . . . .	77
1.3 Número de raíces . . . . .	79
1.4 Longitud de raíces . . . . .	79
1.5 Porcentajes de enraizamiento y sobrevivencia . . . . .	80
1.6 Correlaciones . . . . .	82
2. Portainjerto M.9 . . . . .	86
2.1 Longitud de brotes . . . . .	86
2.2 Número de hojas . . . . .	88
2.3 Número de raíces . . . . .	89
2.4 Longitud de raíces . . . . .	90
2.5 Porcentaje de enraizamiento y sobrevivencia . . . . .	91
2.6 Correlaciones . . . . .	93

DISCUSION . . . . .	97
1. Portainjerto MM.106 . . . . .	97
2. Portainjerto M.9 . . . . .	103
CONCLUSIONES . . . . .	109
LITERATURA CITADA . . . . .	111
APENDICE A . . . . .	119



LISTA DE CUADROS

NUMERO		PAG.
1	Sales orgánicas de Murashige y Skoog, utilizadas en la propagación <i>in vitro</i> de los portainjertos de manzano MM.106 y M.9 . . . . .	71
2	Medios de cultivo utilizados para la inducción de raíces en brotes de los portainjertos de manzano MM.106 y M.9 . . . . .	72
3	Efecto del Acido Indolbutírico y pH sobre la longitud de brotes y número de hojas del portainjerto MM.106, antes y después del establecimiento en - suelo . . . . .	78
4	Efecto del Acido Indolbutírico y pH sobre el número y longitud de raíces del portainjerto MM.106 . . . . .	80
5	Coeficientes de correlación de Pearson para el portainjerto MM.106 . . . . .	85
6	Efecto del Acido Indolbutírico y pH sobre la longitud de brotes y número de hojas del portainjerto M.9, antes y después del establecimiento en suelo . . . . .	87
7	Efecto de los tratamientos de Acido Indolbutírico y pH sobre la longitud de brotes y número de hojas del portainjerto M.9, antes y después del establecimiento en suelo . . . . .	90
8	Efecto del Acido Indolbutírico y pH sobre el número y longitud de raíces del portainjerto M.9 . . . . .	91

9	Coeficientes de correlación de Pearson para el portainjerto M.9 . . . . .	96
---	--	----

## LISTA DE FIGURAS

NUMERO		PAG.
1	Efecto del Acido Indolbutírico sobre los porcentajes de enraizamiento y sobrevivencia de los brotes del portainjerto MM.106, en condiciones de suelo . .	81
2	Efecto del pH sobre el porcentaje de enraizamiento y sobrevivencia de los brotes del portainjerto MM.106, en condiciones de suelo . . . . .	83
3	Efecto de la interacción del Acido Indolbutírico y pH sobre el porcentaje de enraizamiento y sobrevivencia de los brotes del portainjerto MM.106, en condiciones de suelo . . . . .	84
4	Efecto del Acido Indolbutírico sobre los porcentajes de enraizamiento y sobrevivencia de los brotes del portainjerto M.9, en condiciones de suelo . . .	92
5	Efecto del pH sobre el porcentaje de enraizamiento y sobrevivencia de los brotes del portainjerto M.9, en condiciones de suelo . . . . .	94
6	Efecto de la interacción del Acido Indolbutírico y pH sobre el porcentaje de enraizamiento y sobrevivencia de los brotes del portainjerto M.9, en condiciones de suelo . . . . .	95

## RESUMEN

La propagación *in vitro* es una técnica que permite obtener grandes cantidades de material vegetativo; sin embargo, en especies leñosas como el manzano, la aplicación total de ésta ha sido limitada por la carencia de una metodología adecuada para el enraizamiento de los brotes obtenidos y para su posterior establecimiento en suelo, lo que no permite incrementar el porcentaje de sobrevivencia de las plántulas. En el presente trabajo se tuvieron como objetivos determinar el efecto del Acido Indolbutírico (AIB), pH y etiolación sobre la inducción de raíces *in vitro* de dos portainjertos de manzano (MM.106 y M.9) y determinar si es posible sustituir el medio de cultivo libre de reguladores del crecimiento por una mezcla de suelo para el desarrollo de las raíces *in vivo*, así como determinar la capacidad de sobrevivencia de los brotes bajo condiciones no asépticas. Para esto se probaron tres concentraciones de AIB (0.1, 0.2 y 0.3 mg/l); tres niveles de pH (5.0, 5.5 y 6.0) en un medio de cultivo líquido con sales de Murashige y Skoog al 50% de su concentración suplementado con 1.0 mg/l de Tiamina, 100 mg/l de Mioinositol, 160 mg/l de Floroglucinol y 20 g/l de sacarosa. Además se probaron dos estados de los brotes: verdes y etiolados. Después de 7 días de que los brotes (de ambos estados) permanecieron en este medio, se transfirieron a una mezcla de tierra de monte y arena, en proporción 3:1 v/v, y se colocaron en una cámara de nebulización del invernadero, en donde permanecieron 30 días.

Los resultados obtenidos fueron de brotes verdes, ya que todos los brotes etiolados murieron en el transcurso del experimento.

No se observó respuesta consistente en el tamaño y número de hojas de los brotes de los dos portainjertos por efecto del AIB y pH antes y después del establecimiento en suelo. El mayor número de raíces por brote, para el MM.106, se logró con 0.3 mg/l de AIB (4.391 raíces) y de los niveles de pH el de 5.5 fue el mejor con 4.505 raíces; no se observó interacción entre ambos factores sobre esta variable en este portainjerto. Para el M.9 la mejor concentración de AIB fue 0.2 mg/l con 6.906 raíces y el pH de 5.5 con 7.014 raíces, tampoco se manifestó interacción de los factores. La mejor longitud de raíces se logró con 0.3 mg/l de AIB en los brotes de ambos portainjertos (2.320 cm para MM.106 y 1.926 cm para el M.9) y el mejor pH fue de 5.0 para el MM.106 (2.103 cm) y de 6.0 para el M.9 (1.425 cm). El más alto porcentaje de enraizamiento (70%) y de sobrevivencia (80%) se logró con el tratamiento que contenía 0.1 mg/l de AIB y 5.5 de pH, para el portainjerto MM.106, observándose que para las tres concentraciones de auxina el mejor pH fue de 5.5 y en general los porcentajes disminuyeron conforme aumentó la concentración de AIB. En el caso del M.9 exactamente los brotes que enraizaron sobrevivieron, siendo el máximo valor logrado de 45% con el tratamiento de 0.2 mg/l de AIB y pH de 5.5, sin encontrarse una tendencia clara por las concentraciones de AIB y niveles de pH.

Los resultados obtenidos permiten concluir que es factible el enraizamiento *in vivo* de los brotes de ambos portainjertos, obtenidos *in vitro* y que la etiolación no es un procedimiento favorable según el método empleado en este trabajo.

## INTRODUCCION

El manzano (*Malus pumila* Mill) es una de las especies frutícolas de mayor importancia para México, ya que en 1983 se tenía una superficie cosechada de 45,995 ha con una producción total de 287,766 ton (Anónimo, 1983).

Para el establecimiento de los huertos, generalmente se usan árboles injertados sobre portainjertos clonales, lo que genera una gran demanda de éstos y con mayor razón, si se tiene a un cultivo intensivo o superintensivo de la especie, en donde se deben establecer de 30,000 a 100,000 árboles por ha (Villegas, 1982).

La propagación clonal de los portainjertos a través del enraizamiento de estacas, puede ser una alternativa para la obtención de material vegetativo, debido a la gran cantidad que se puede obtener por este medio; sin embargo, el manzano es una especie difícil de enraizar (Lane, 1978; Werner y Boe, 1980), existiendo así una carencia del mismo, tanto en cantidad como en calidad, que permita abastecer las necesidades del país.

Otro de los métodos para obtener grandes cantidades de material vegetativo es la propagación *in vitro*, la cual con la producción de brotes enraizados pudiera proporcionar resultados satisfactorios. Los estudios realizados a la fecha han manifestado que la proliferación de brotes de diversos cultivares y portainjertos de manzano no ha tenido

mayor problema; sin embargo, el enraizamiento de los mismos y su posterior aclimatización a condiciones de invernadero y de campo, representan una fuerte limitante para la obtención de resultados satisfactorios con esta técnica.

## ANTECEDENTES Y REVISION DE LITERATURA<sup>1</sup>

### 1. Aplicaciones de la propagación *in vitro*

La propagación *in vitro* se ha convertido en una importante herramienta, tanto para el propagador de plantas comerciales, como para el mejorador. Para el primer caso esta técnica ofrece numerosas ventajas, incluyendo la facilidad de producción de muchas plantas difíciles de propagar, el rápido incremento de cultivares recientemente introducidos y la habilidad para propagar continuamente plantas deseadas en cualquier época del año. Cuando los aspectos de cultivo de tejidos se combinan con el "indexaje" apropiado y técnicas de establecimiento del "explante", se proporciona la oportunidad de producir grandes cantidades de plantas vigorosas, uniformes y libres de enfermedades (Smith, 1982; Zimmerman, 1982).

En frutales, el cultivo de ápices meristemáticos se ha convertido en una importante técnica, particularmente en especies propagadas vegetativamente. Se han logrado altas tasas de regeneración en diferentes especies de multiplicación clonal (Jones *et al.*, 1977; Lane, 1978).

En la familia de las Rosáceas, cinco géneros que contienen diez especies comercialmente importantes, han sido utilizadas para el

---

<sup>1</sup> La revisión es muy extensa, pero debido a la importancia de la información que contiene se decidió no reducirla.



cultivo de ápices meristemáticos, cultivo de ápices de brotes y/o micropropagación. De estas, seis especies de frutales pueden ser propagadas comercialmente *in vitro*: almendro, manzano, zarzamora, cerezo, híbrido almendro-durazno y fresa (Donelly *et al.*, 1980).

En los viveros comerciales a través de la micropropagación se logran reducir espacios y se tiene una mayor uniformidad de las plantas, que es lo que interesa al productor. Además en especies difíciles de enraizar por los métodos convencionales, puede ser una herramienta esencial (Smith, 1982; Sriskandarajah y Mullins, 1982).

Se dice que el uso comercial más extensivo de la técnica en cuestión, ha sido la propagación clonal de ornamentales, tales como los helechos y orquídeas y la aplicación de métodos asépticos para especies que son fáciles de propagar (Sriskandarajah y Mullins, 1982).

El avance en las técnicas ofrece la posibilidad de explorar la variabilidad genética y manipularla mediante la preservación del germoplasma (Debergh y Maene, 1983). Recientes estudios sobre la regeneración de plántulas a partir de células y protoplastos han revelado la presencia de gran variación genética, lo cual no se expresa en los métodos convencionales de propagación de plantas. En uvas obtenidas a través de embriogénesis somática se ha manifestado gran variación en el campo, lo que proporciona una amplia posibilidad de selección clonal en frutales (Mullins, 1982).

El uso de protoplastos es una perspectiva para el futuro, pues es una técnica que está en desarrollo y se ha hecho relativamente poco

en el caso de frutales. Hasta la fecha se ha logrado el cultivo de protoplastos de naranjo 'Shamouti', aislados a partir de callos ovulares, así como de frutos de vid y ápices de raíces de durazno (Pyott y Converse, 1981; Zimmerman, 1983).

La obtención de plantas haploides por medio de cultivo de anteras y microsporas facilita la obtención de líneas homocigóticas. En fresa el interés en plantas polihaploides ( $2n = 28$ ) de cultivares octoploides ( $2n = 56$ ) es alto, debido a la heterocigocidad de esta especie y a la imposibilidad de fijación de caracteres útiles por autofecundación, debido a la alta poliploidía y depresión endogámica (Murashige, 1974; Devrenx y Laneri, 1975; Zimmerman, 1983).

La preservación de germoplasma ha tenido éxito particularmente en la fresa. Mullin y Schlegel (1976) lograron almacenar los meristemas de más de 50 cultivares diferentes, por más de 6 años, a una temperatura de  $4^{\circ}\text{C}$  en la obscuridad. Sin embargo, los ápices de manzano 'Golden Delicious' únicamente han sobrevivido por 12 meses en almacenaje a temperaturas de  $1$  a  $4^{\circ}\text{C}$  (Lundergan y Janick, 1979).

Finalmente, el cultivo de tejidos puede ser de utilidad para el rescate de embriones inmaduros, separación de embriones cigóticos de nucelares en especies poliembriónicas y obtención de plantas libres de enfermedades (Skirm, 1942; Zimmerman, 1983; Ramning, 1983).

## 2. Aspectos históricos y conceptualización del cultivo *in vitro*.

Los principios del cultivo de tejidos fueron iniciados con la teoría celular de Schleiden y Schwann en 1838-1839, quienes postularon implícitamente que la célula es capaz de autonomía y totipotencia. Un primer paso fue obtenido por los botánicos, quienes describieron en los 80's los callos que sanaban las heridas en los vegetales. Esta cicatrización fue descrita en detalle en 1833 por Trécul (Gautheret, 1982).

En 1893 Reehinger (citado por Gautheret, 1982) dió un paso más al probar experimentalmente los "límites mínimos" de divisibilidad de partes vegetales, usando yemas aisladas o secciones de raíces y otros materiales. Llevó los "explantes" a una superficie de arena húmeda y concluyó que pedazos mayores de 1.5 mm pueden desarrollar. Cinco años después, Heberlandt inició experimentos para verificar la teoría celular y sus resultados fueron publicados en 1902. Aunque este trabajo pionero fue de poca utilidad, inspiró a otros investigadores para intentar el cultivo de tejidos de otras plantas.

Durante los siguientes treinta años a los trabajos de Heberlandt se hizo realmente poco, sin embargo, en 1934 se reportó el primer cultivo de tejidos vegetales no organizados en zanahoria y tabaco (Conger, 1981).

Experimentos por Skoog y Miller en 1957, mostraron que diferentes proporciones de auxinas y citocininas influencian el tipo de

crecimiento y/o morfogénesis en tabaco. La organización y desarrollo de plantas completas de células de zanahoria cultivadas en masa fue demostrada por Steward *et al.* en 1958. En 1962 Murashige y Skoog publicaron un medio definido para el cultivo de tabaco, el cual posiblemente ha sido el más citado para el cultivo de un amplio número de especies, incluyendo dicotiledóneas y monocotiledóneas. En 1969 Nitsch y Nitsch, publicaron un método para cultivar plantas haploides de granos de polen de tabaco y en 1972, Carlson *et al.* crearon el primer híbrido parasexual por fusión de protoplastos (Conger, 1981).

El término "cultivo de tejidos" fue acuñado en los momentos en que la técnica se abocaba principalmente al cultivo de pedazos de tejido. Sin embargo, a través de los años el término ha resultado algo inapropiado, debido a que ahora no sólo son pedazos de tejido, sino también células libres, protoplastos, órganos y embriones (Bonga, 1982).

Desde el punto de vista experimental, los sistemas *in vitro* tienen muchas ventajas sobre el cultivo *in vivo*; por ejemplo: 1) En la planta viva el comportamiento de cada parte del tejido, es fuertemente influenciada por controles correlativos impuestos por el resto de la planta. Por el aislamiento de una parte de la planta y cultivándola *in vitro*, la naturaleza de dichos controles correlativos puede ser determinada. 2) La parte de la planta aislada puede ser libre para expresar las potencialidades que están normalmente presentes *in vivo*, los ejemplos más obvios son la organogénesis y embriogénesis. 3) Toda la experimentación *in vitro* se lleva a cabo bajo condiciones asépticas y por lo tanto los tejidos y células no

son destruidos por microorganismos. Además muchos productos químicos pueden ser aplicados por largos períodos de tiempo, sin que dichos productos químicos sean metabolizados o degradados por microorganismos. 4) El medio ambiente físico de los cultivos es generalmente fácil de manipular. La mayoría de los cultivos crecen en pequeños recipientes, esto es, en pequeñas incubadoras o cámaras de crecimiento, en donde los regímenes de temperatura y luz son controlados fácilmente y a bajo costo. 5) Los sistemas de cultivo *in vitro* son más fáciles para la manipulación de los mecanismos de la herencia que en la mayoría de los otros sistemas. Por ejemplo, los mutantes son fácilmente inducidos y mantenidos en gran escala, principalmente a nivel celular, pueden ser conducidos muy eficazmente. 6) Los estudios metabólicos pueden ser llevados más bien a nivel celular que a nivel de organización más complejos. 7) Los factores que están controlando la juvenilidad y la madurez son más fácilmente estudiados que por otra técnica (Bonga, 1982).

Por otra parte, la técnica de cultivo *in vitro* también puede tener ciertos problemas vinculados con la utilización comercial, y uno de ellos es que las plántulas obtenidas pueden diferir de la planta madre. Así, tenemos que pueden ocurrir variaciones fenotípicas y genotípicas en brotes conservados por un largo período en la fase de proliferación, con subcultivos repetidos cada 4-6 semanas. Además, este resultado depende de la estabilidad genética de las especies propagadas (cultivares de inestabilidad conocida no deben ser subcultivados por más de 3 ó 4 ocasiones), y la parte cultivada de la planta. Generalmente, las plantas regeneradas de brotes axilares

son consideradas como más probables fenotípicamente idénticas a la planta madre, en tanto que las plantas derivadas de brotes adventicios o embriones somáticos es más probable que difieran de la planta madre, particularmente si surgen de callos (Zimmerman, 1982).

En fresas propagadas en un campo experimental de Beltsville, se cultivaron ápices de meristemas de plantas de las variedades Earliglow, Guardian y Redchief. Después de haberse proliferado y enraizado en un medio de Boxus, las plantas se establecieron en campo a finales de mayo y se evaluaron en el otoño, encontrándose que las plantas cultivadas *in vitro* produjeron más coronas, más estolones y fueron generalmente, más vigorosas que las propagadas a través de estolones. En la primavera siguiente las plantas cultivadas *in vitro* tuvieron más flores, más coronas y cada corona produjo más racimos florales. Sin embargo, el número de flores por racimo no fue incrementado (Zimmerman, 1982).

Otros autores, en relación a lo anterior, opinan que esto depende mucho de las especies y otro conjunto de factores; puesto que en algunas especies se ha observado que las plantas obtenidas a través de ápices de meristemas son más estables genéticamente que las plantas derivadas por otros procedimientos.

### 3. Técnicas para la propagación *in vitro*

Murashige (1974) propone una secuencia de tres estados para la propagación *in vitro*, para explorar en forma sistemática requerimientos específicos en cada paso. Cada uno de los estados tiene diferentes

objetivos y posiblemente necesidades diferentes. El objetivo del Estado I (establecimiento del propágulo), es simplemente la obtención de un cultivo aséptico de la planta en cuestión. Aquí es únicamente necesario que el cultivo esté libre de infección y que haya un rápido crecimiento de los "explantes". El Estado II (multiplicación de brotes) es un rápido incremento de órganos y otras estructuras que pueden dar origen a plantas. El incremento puede ser logrado en mayor instancia por la inducción de órganos adventicios y formación de embriones o por incremento en la iniciación de órganos axilares. El Estado III (enraizamiento y aclimatación) es la preparación para el reestablecimiento de las plantas en suelo e incluye el enraizamiento de brotes, el endurecimiento de las plantas para impartir tolerancia al estrés de humedad y conferir un alto grado de resistencia a ciertos patógenos. Además, de la conversión de las plantas del estado heterotrófico al autotrófico.

La propagación *in vitro* puede hacerse de muy diversas maneras. Más comúnmente el "explante" usado es un ápice de meristemo, un ápice de brote o una yema, la cual es inducida a crecimiento y luego a proliferación de brotes en un medio nutritivo. Una vez que se ha producido un número suficiente de brotes, son llevados a enraizamiento para obtener las plantas deseadas (Sriskandarajah y Mullins, 1981; Zimmerman, 1982 y 1983).

En la práctica se usan ápices de yema de 0.1 a 1.0 mm de longitud. Los tejidos más pequeños fallan para crecer y los más grandes permanecen infestados por microorganismos. El tamaño intermedio (0.3 - 0.7 mm) generalmente produce la más alta proporción de plantas

regeneradas libres de microorganismos. Los ápices de yemas de este tamaño están compuestos de domo meristemático y uno o dos primordios de hojas (Slack, 1980).

Los "explantes" para la micropropagación pueden ser obtenidos de plantas en crecimiento activo o plantas en reposo, dependiendo de la planta, la época del año y las técnicas de cultivo a utilizar. La contaminación de los "explantes" es generalmente menos problema cuando los brotes son colectados de plantas ubicadas en el invernadero, debido a que están menos expuestas al viento que acarrea polvo y microorganismos (Zimmerman, 1983).

Para iniciar el cultivo de los ápices se remueven las hojas de las ramas, seguido por un lavado inicial con detergente diluido en agua, posteriormente se hace una desinfección con hipoclorito de calcio o de sodio diluidos, conteniendo un agente humectante y luego se enjuaga el tejido en agua estéril antes de la siembra. También se ha usado la inmersión en etanol de ápices de brotes en crecimiento activo. Las yemas primero son colocadas en etanol al 95% y después se llevan a hipoclorito de calcio, preparado recientemente (Lane, 1978; Zimmerman, 1983).

Los requerimientos para el cultivo *in vitro* pueden categorizarse como características del medio nutritivo y características del ambiente donde se desarrolla el cultivo. Dentro de los factores que influyen sobre el desarrollo del tejido se deben considerar: a) órgano que va a servir como fuente de tejido; b) edad fisiológica u ontogénica del órgano; c) estación en la cual el tejido está siendo



obtenido; d) tamaño del tejido y e) calidad de la planta de la que los tejidos son obtenidos. El comportamiento inicial de un cultivo de tejidos puede variar también con la totalidad del estado fisiológico de la planta (Murashige, 1974; Slack, 1980).

Conviene recalcar que el cultivo *in vitro* en árboles varía frecuentemente de un año a otro, incluso cuando los tejidos son obtenidos de material colectado de una misma planta y en la misma temporada de cada año. Esto posiblemente se deba en parte a los ciclos climáticos y fluctuaciones en los factores ambientales (Bonga, 1982).

### 3.1 Medios de cultivo

Un medio de cultivo generalmente está compuesto de sales basales (elementos mayores y menores) y suplementos orgánicos. Aunque estos últimos varían considerablemente, todos incluyen una fuente de carbono, vitaminas y reguladores del crecimiento vegetal (Donnelly *et al.*, 1980; Slack, 1980).

#### 3.1.1 Sales orgánicas basales

A la fecha se han usado muchos tipos de sales orgánicas para las especies frutales; uno más comúnmente utilizado ha sido el de Murashige y Skoog, pero se han usado otros como el de Linsmaier y Skoog, Nitsch y Nitsch y Anderson. Varios investigadores han obtenido igualmente buenos resultados con diversas especies y diferentes tipos de sales. Por otro lado, las diferencias en cultivares en algunas especies son lo

suficientemente grandes como para que el medio de cultivo sea maniobrado de una especie a otra para optimizar las necesidades particulares, por lo cual son difíciles de hacer recomendaciones generales para una especie en particular (Zimmerman, 1983).

Dutcher y Powell (1972) al probar las sales de Murashige y Skoog en manzano, encontraron que la omisión del Grupo I, constituido por  $\text{KNO}_3$ ;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ;  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ;  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  y  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , dió como resultado poco o ningún crecimiento de las plántulas. La presencia de los micronutrientes del Grupo II ( $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ;  $\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ;  $\text{H}_3\text{BO}_3$ ;  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  y  $\text{CuSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) usualmente produce mejor crecimiento y desarrolla más clorofila, sin que esto se deba a un elemento en particular. Sin embargo, se observó que el mejor crecimiento se obtuvo cuando estaban presentes el  $\text{Mn}^{++}$  o  $\text{Zn}^{++}$ , siendo innecesarios cualquier otro elemento del grupo. El hierro fue esencial para el buen crecimiento, pero fue tóxico en ausencia del Grupo I. El  $\text{FeSO}_4/\text{Na}_2\text{EDTA}$  a concentraciones de 27.9 mg/l y 37.3 mg/l, respectivamente, dieron el mejor crecimiento en combinación con el Grupo I.

### 3.1.2 Suplementos del medio de cultivo

En la mayoría de los medios nutritivos los requerimientos de carbohidratos han sido satisfechos con la incorporación de sacarosa a una concentración de 2 a 3% (Murashige, 1974; Thorpe, 1982). No obstante, para el caso del manzano Dutcher y Powell (1972) encontraron que el mejor crecimiento de brotes ocurrió al usar una concentración de sacarosa de 3 a 5%, y aunque algunos brotes crecieron a concentraciones hasta

del 18% cuando se adicionó más del 7% se observó una pigmentación rojiza en las plántulas. También se observó que la glucosa al 3% y fructosa al 3% dieron resultados equivalentes a la sacarosa, a la misma concentración.

Las vitaminas más comúnmente incluidas son la Tiamina, Acido Nicotínico y Piridoxina. De éstas, la Tiamina es la más utilizada y usualmente es proporcionada en concentraciones de 0.1 a 0.4 mg/l. La necesidad de otras vitaminas como el Acido Fólico, Acido Pantoténico y Rivo flavina permanece ambiguo, pero han sido utilizadas principalmente por razones de precaución (Murashige, 1974).

El Inositol no ha sido esencial; sin embargo, su adición ha sido claramente benéfica y se ha utilizado una proporción de 100 mg/l (Murashige, 1974).

Los reguladores del crecimiento más comunes para los medios de propagación son las auxinas y citocininas. Las auxinas más utilizadas son el Acido Indolbutírico (AIB), Acido Indolacético (AIA) y Acido Neftalenacético (ANA).

Dentro de las citocininas, la más usada es la Benciladenina (BA); aunque en ocasiones también se usan las Cinetinas y la 2iP y la concentración requerida en el medio de cultivo varía de acuerdo a la especie en estudio (Murashige, 1974).

Los aminoácidos o sus aminas han sido benéficos para algunos cultivos. La Arginina, Acido Aspártico, Acido Glutámico y Tirosina, pueden ser ventajosos en el medio de multiplicación de órganos. Algunas veces

Las amidas pueden ser más efectivas que el respectivo aminoácido (Murashige, 1974).

Los complejos naturales deben ser utilizados sólo cuando todos los intentos para usar un producto químico han fallado, ya que se tiene la desventaja de una alta variabilidad entre ellos. Entre los productos más usados se tienen el endospermo de coco, miel de abeja, jugo de caña y otros (Murashige, 1974).

Otras sustancias que parecen alterar la efectividad de las auxinas y citocininas, son los compuestos fenólicos, tales como el Floroglucinol (FG), Acido Florético, Acido Caféico, Pirogalol y Catecol, de los cuales se hablará más adelante.

El carbón activado es otro compuesto muy utilizado en la propagación *in vitro* y parece ser que sus efectos se deben a la remoción de sustancias fenólicas del medio de cultivo, tales como el Acido Fenilacético y Acido Benzóico, las cuales promueven un crecimiento no organizado, e inhiben la embriogénesis, formación y elongación de raíces. También puede ser que el carbón activado absorba el exceso de auxinas del medio de cultivo (Fridborg *et al.*, 1978).

Cuando los tejidos vegetales son cortados, las superficies del corte con frecuencia se tornan caféas en unos cuantos minutos, lo cual se debe a la oxidación de fenoles y quinonas tóxicas en las células dañadas; de ahí, que se requieran tratamientos adicionales al medio de cultivo agregando productos antioxidantes. Entre las sustancias más utilizadas se tienen el Acido Ascórbico, Acido Cítrico y la Cisteína (Murashige, 1974; Bonga, 1982).

### 3.1.3 Características físicas

En la mayoría de las instancias, la elección entre un medio líquido o uno sólido se hace en forma arbitraria y de acuerdo a la decisión del investigador. En algunas plantas el éxito dependerá de si se emplea un medio nutritivo líquido o sólido, de ahí la necesidad de obtener información al respecto. Así también, las mismas especies pueden requerir una diferente forma física del medio durante cada uno de los tres estados *in vitro*. Por ejemplo, el estado I podría estar mejor en un medio líquido y los estados II y III en agar para algunas plantas; en tanto que para otras podría tenerse mejor desarrollo si se utiliza un medio líquido para los estados I y II, y uno sólido para el estado III (Murashige, 1974).

Al utilizar un medio sólido es importante considerar la concentración y la calidad del agar, ya que la excesiva concentración de agar endurece el medio e inhibe el crecimiento de los tejidos, así la cantidad a utilizar dependerá de la parte de la planta a cultivar, la calidad del agar y el pH del medio, ya que a un pH más ácido el gel será más blando (Murashige, 1974).

Por otra parte, el agar además de proporcionar un soporte sólido para los tejidos, puede ser benéfico; debido a que tiene una capacidad de absorción que asemeja al carbón activado, ya que puede remover productos de desecho celular. Si se considera que el agar es un producto natural, se pueden esperar diferencias en respuesta al crecimiento de los cultivos, dependiendo del grado de purificación. Otro problema es

que este gel constituye una fuente de los principales minerales; en particular sodio, y posiblemente algunas vitaminas y toxinas (Bonga, 1982).

Al usar un medio líquido se pueden tener los cultivos estacionarios, mediante agitación continua (una revolución por minuto) o usar puentes de papel filtro o cualquier otro soporte.

Singha (1982) cultivó brotes de *Malus* sp. 'Almey' y *Pyrus communis* 'Seckel' en medios de cultivo con sales de Murashige y Skoog suplementados con 2 mg/l de BAP y niveles de agar que variaron de 0-1.2%. En Manzano 'Almey' se obtuvo el mayor crecimiento y proliferación de brotes al usar 0.3% de agar, ya que más altas concentraciones disminuyeron la proliferación y crecimiento, en tanto que en peral 'Seckel' el mayor grado de proliferación se obtuvo con 0.6% de agar. Parece ser que la variación en este sentido responde a los cambios en pH, lo que podría influenciar la proliferación. Otra explicación puede ser la presencia de ciertos inhibidores en ciertas marcas de agar, que reducen el crecimiento de la planta. Así también se dice que la influencia del agar puede deberse al efecto sobre la tasa de difusión de las moléculas a través del medio, ya que en bajos niveles, la resistencia a la difusión de hormonas y nutrientes será más baja que a altas concentraciones.

El pH del medio nutritivo es también un factor crítico; no obstante que ha sido muy descuidado en el estudio del cultivo *in vitro*. La práctica usual es poner el pH con algún valor entre 5.0 y 6.0 durante la preparación del medio (Murashige, 1974).

Por otra parte, la esterilización del medio de cultivo puede tener diferentes efectos sobre el pH, dependiendo de si se usa un medio líquido o sólido, pues se ha visto que en un medio líquido hay una reducción de 0.5 unidades en el pH, en tanto que con el medio sólido es menos pronunciada (Singha, 1982).

### 3.2 Condiciones ambientales para la propagación *in vitro*

Las condiciones ambientales para la propagación *in vitro* han sido poco estudiadas, por lo que no se han podido establecer las condiciones óptimas de crecimiento para las diversas especies frutícolas, propagadas bajo este esquema (Zimmerman, 1983). Sin embargo, se ha observado que estas condiciones tienen un efecto muy marcado sobre el comportamiento de las mismas (Lane, 1978).

Los factores ambientales más importantes por su efecto, son luz y temperatura, aunque frecuentemente la literatura también reporta datos sobre la humedad relativa (Murashige, 1974).

#### 3.2.1 Influencia de la luz

La iluminación de los cultivos debe ser considerada en términos de intensidad, período de exposición a la luz y calidad. Se ha observado que los requerimientos de luz de los tejidos no son los mismos que aquellos de plantas completas autotróficas. En el cultivo de tejidos, la fotosíntesis no es una actividad necesaria, excepto quizás, durante el último período del estado III (enraizamiento y aclimatización), ya

que los carbohidratos están adecuadamente proporcionados. No obstante, la luz es necesaria para regular ciertos procesos morfogénéticos. Esto ha sido reportado como importante en la formación de brotes, la iniciación de raíces y embriogénesis asexual (Murashige, 1974). Capite en 1955, manifiesta que el mejor crecimiento de los tejidos cultivados *in vitro* es obtenido bajo luz natural.

Dutcher y Powell (1972) trabajando con dos fotoperíodos: 16 y 24 h/día y tres distancias diferentes (8.20 y 35 cm) entre los tubos y las lámparas fluorescentes con intensidad luminosa de 600 f-c, encontraron que al utilizar 16 horas luz y 20 cm se tuvo un crecimiento apropiado de las plántulas de manzano. Además observaron que brotes sujetos a total obscuridad decarrollaron callo aunque permanecieron vivos por períodos largos (hasta 10 meses), mientras que los que desarrollaron en luz crecieron normalmente. Asimismo, otros autores han señalado un fotoperíodo de 16 horas como el adecuado para obtener una respuesta apropiada de brotes de manzano (Abbott y Whiteley, 1976; Jones *et al.*, 1977), dicha luz fue emitida por lámparas fluorescentes; además, mencionan que la calidad de la luz puede estimular no sólo la formación de brotes, sino también, la de raíces, requiriéndose para el primer caso alrededor de 420 nm, mientras que para el segundo 660 nm.

Por otra parte, se considera una intensidad luminosa de 2,000 a 3,000 lux como apropiada, en el cultivo de tejidos (Murashige, 1974). Harper en 1978, manifiesta que las intensidades de luz usadas para cultivos de *Rubus* varían de 1,500 a 5,000 lux. Snir y Erez (1980), reportan como adecuada para la propagación de portainjertos de manzano, una intensidad de  $14 \text{ } \mu\text{m}^{-2}$ .



### 3.2.2 Influencia de la temperatura

Es evidente que los tejidos cultivados *in vitro*, en vista de sus delicadas estructuras, son extremadamente sensitivos a las variaciones en temperaturas (Capite, 1955).

La práctica general ha sido mantener los cultivos en medio ambiente con temperatura constante, siendo la más usualmente empleada la que oscila alrededor de los 25°C. En esta práctica faltan reconocer las fluctuaciones de temperatura diurna y estacional, bajo las cuales las plantas normalmente desarrollan. Así, las temperaturas constantes pueden ser adecuadas para el cultivo de especies anuales y tropicales, cuyos ciclos de vida son completados bajo condiciones de temperatura uniforme; pero puede no serlo para especies adaptadas a climas templados o desérticos, en donde las plantas están sujetas a fluctuaciones térmicas durante el año (Murashige, 1974). Walkey en 1972, probó diferentes temperaturas sobre el crecimiento de plántulas de manzano, encontrando la mejor respuesta entre los 26 y 30°C

### 3.2.3 Humedad relativa

La información existente al respecto, indica que la humedad relativa del cultivo fácilmente es el factor más significativo o menos problemático, ya que dicho factor del microambiente del cultivo, es usualmente alrededor del 100%. Esto se considera que debe de ser evaluado en los diversos climas, de tal manera que pueda establecerse si es necesario o no regularla en las diversas especies en cuestión, para lograr su óptima respuesta (Murashige, 1974).

#### 4. Establecimiento y formación de brotes

Una vez que el tejido vegetal (explante) se ha establecido y desarrollado en el medio de cultivo, los brotes son divididos y transferidos a un medio fresco (subcultivos o recultivos) a intervalos regulares. El recultivo se hace cada cuatro semanas, aunque en algunos casos se realiza cada seis. Esto frecuentemente es gobernado por la proporción de crecimiento y número de brotes (Zimmerman, 1983).

Los brotes se pueden originar de yemas axilares o adventicias. Los primeros se encuentran en la axilas de las hojas y pueden ser estimulados en su proceso de ramificación al ser colocados en un medio que contenga altas concentraciones de citocininas. La producción de brotes adventicios se puede lograr a través de callos; sin embargo, con más frecuencia se observa la emergencia de brotes directamente del "explante" (Murashige, 1977).

Lane (1978) indica que en un trabajo desarrollado, se establecieron mejor los "explantes" cuando se utilizaron yemas terminales, en relación al uso de yemas basales, lo cual podría deberse a que las basales son de un tamaño más pequeño y ello podría influir en un crecimiento pobre. Asimismo, menciona que los ápices de yemas en reposo que no habían satisfecho sus requerimientos de frío desarrollaron normalmente.

Para el establecimiento de "explantes" de manzano, Lundergan y Janick (1980), utilizaron un medio basal de Murashige y Skoog, suplementado con 0.1 mg/l de Tiamina · HCl, 0.5 mg/l de Piridoxina · HCl, 0.5 mg/l de Benciladenina, 30 g/l de sacarosa y 10 g/l de agar.

En relación a las características físicas del medio de cultivo, en algunas especies se han obtenido mejores resultados al usar un medio líquido para el establecimiento de los "explantes", como es el caso del durazno, zarzamora (Zimmerman, 1983) y manzano, lo que posiblemente se deba a un incremento en la absorción de hormonas y nutrientes del medio, aunque también pudiera ser que el agar contenga algunos compuestos tóxicos (Snir y Erez, 1980).

Dutcher y Powell (1972) al utilizar un medio líquido, también encontraron que los brotes inmersos en una solución de nutrientes en movimiento tienen un incremento en la superficie de absorción, particularmente cuando existen hojas; desarrollándose brotes mucho más largos que los que crecieron bajo condiciones estacionarias, lo que conduce a suponer que es la absorción de nutrientes lo que limita el crecimiento de los brotes.

Por otra parte, se dice que la proporción de reguladores del crecimiento influyen el crecimiento de las plantas, incluyendo la dominancia apical. Así, diferencias en los niveles endógenos de hormonas del crecimiento diferentes de las citocininas, podrían interactuar con la BA suplementada en el medio para influenciar la multiplicación de los brotes (Lane y McDougald, 1982).

Varios estudios han indicado que la proliferación de brotes de manzano *in vitro* y su crecimiento, son afectados por la adición de citocininas, auxinas y giberelinas en el medio de cultivo. Estudios preliminares han indicado un máximo de proliferación de brotes de manzano con un medio basal suplementado con 5.0 mg/l de BA. Sin embargo, los

brotos fueron pequeños con hojas muy chicas y generalmente no produjeron resultados satisfactorios al intentar injertarlos o enraizarlos en condiciones *in vitro* (Lundergan y Janick, 1980).

Jones (1967), reporta que la BA a una concentración de 1.0 mg/l promovió la elongación de brotes y formación de hojas en brotes de manzano; sin embargo, muchas de las hojas fueron pequeñas y pobremente desarrolladas, mientras que una concentración de 10.0 mg/l inhibió el crecimiento de los brotes. Este mismo autor indica que hay evidencias de exportación, de las raíces a los brotes vía xilema, de sustancias con actividad biológica similar a las cinetinas, lo que sugiere que las citocininas de las raíces tienen efectos benéficos sobre las proteínas y clorofila de las hojas.

Jones *et al.*, 1979, encontraron que la savia succionada de ramas o exudados de raíces de árboles de manzano, muestran actividad similar a la de las citocininas y dicha actividad es similar a un butanol componente soluble, el cual tiene las propiedades de la zeatina ribósido, que promueve el crecimiento de brotes aislados de manzano. De esto infieren que las citocininas de las raíces son importantes para el desarrollo de los brotes, lo cual es verificado al suministrar tales sustancias a los medios de cultivo en donde crecen brotes sin raíces.

Investigaciones para determinar los niveles óptimos de reguladores del crecimiento en manzano, indicaron que la proliferación de brotes fue completamente inhibida por niveles de cinetina mayores a 5.0 mg/l o menores de 0.1 mg/l y por la adición de más de 0.2 mg/l de 2,4-D o ANA. Además el 2,4-D promovió fuerte incremento en la formación de

callo (Abbott y Whiteley, 1976).

Dutcher y Powell (1972) encontraron que la adición de ABA a diferentes concentraciones, inhibe el crecimiento de brotes en manzano e induce la formación de callo. En tanto que el AIB reduce el crecimiento de brotes, pero no tan fuertemente como el ABA.

Se conoce que el desarrollo de yemas axilares es una respuesta a la BA y que esta capacidad varía con las especies y concentración del regulador.

Lane (1982) comparó la respuesta de tres tipos de manzano a las concentraciones de BA y encontró que aunque en forma general el nivel óptimo en los tres tipos fue el mismo, los árboles con hábito de crecimiento estándar 'Summerland Red McIntosh' toleran un nivel de BA ligeramente alto, el tipo spur 'Macspur' un nivel intermedio y el tipo enanizante 'McIntosh Wijcik' un nivel muy alto sin mostrar fitotoxicidad o muerte. Otros factores que pudieran estar influenciando la respuesta serían los niveles hormonales endógenos en un momento dado, el estado de crecimiento vegetativo al cual se toma el "explante", la eficiencia de transporte en el cultivo y la rapidez de aprovechamiento metabólico (Lane, 1982; Lane y MacDougald, 1982).

Lane (1978), encontró que la concentración óptima de BA para la proliferación de brotes de manzano fue de  $5 \times 10^{-6}$  M, ya que cuando no se adicionó este regulador al medio de cultivo, los brotes presentaron un crecimiento lento y eventualmente se detuvo, mientras que concentraciones de  $10^{-5}$  M resultaron ser tóxicas. La combinación de  $AG_3$  y ANA con  $5 \times 10^{-6}$  M de BA tuvo efecto inhibitorio sobre la multiplicación

siendo mayor el efecto del ANA, lo que sugiere que el manzano tiene la suficiente concentración endógena de auxina para su crecimiento.

James *et al.*, 1980, tuvieron éxito en la proliferación de brotes de manzano usando un medio básico de Linsmaier y Skoog, suplementado con 1.0 mg/l de BAP, 0.1 mg/l de AIB y 162 mg/l de Floriglucinol (FG), en tanto que Werner y Boe (1980) usaron sales de Murashige y Skoog a la mitad de su concentración, suplementadas con 0.5 mg/l de BA.

El efecto del FG sobre la proliferación fue expuesto por primera vez por Jones (1976) en manzano M.7 y M.29; sin embargo, otros autores no lo han encontrado ventajoso (Snir y Erez, 1980), han encontrado que inhibe el crecimiento (Whiteley y Abbott, 1977; citados por Hutchinson, 1984), o no han encontrado efectos consistentes (Zimmerman y Broome, 1980).

Hutchinson (1984) indica que el mejor establecimiento de brotes de manzano 'Northern Spy', se logró en un medio de Linsmaier y Skoog suplementado con 5  $\mu$ M de BA, 1.0  $\mu$ M de AIB y 1 mM de FG, y menciona que no hubo diferencias en proliferación por influencia del FG, sino que más bien fue el resultado de la concentración de citocinina, nivel de luz y tipo de "explante". Además, estudió el efecto de diversas citocininas (CA, zeatina, cinetina y 2iP) encontrando que la mejor fue la BA, obteniendo mayor proliferación con una concentración de 10  $\mu$ M, en relación a 5  $\mu$ M; aunque a 10  $\mu$ M los brotes fueron muy pequeños,

Lundergan y Janick (1980) estudiaron la combinación de BA y N<sup>6</sup> - (A<sup>6</sup>-isopentenil-) aminopurina (2iP) para determinar si existía alguna

interacción entre ambas citocininas. La BA solo provocó proliferación de hojas y brotes, y al 2iP sólo produjo uno o dos brotes altos con hojas normales. Los brotes que crecieron en ambas citocininas respondieron en forma similar a las que crecieron sólo con BA, lo que sugiere que la 2iP tiene muy poco efecto sobre la proliferación. Estos mismos autores al probar concentraciones de 3, 4, 5, 6 y 7 mg/l de BA, 2iP y cinetina, encontraron una respuesta similar con la 2iP y cinetina, y observaron que la BA a concentraciones por arriba de 5 mg/l bajó su efectividad. También se probó la interacción de BA, AIB y  $AG_3$ , y se encontró que la BA incrementó la proliferación de brotes sólo en ausencia del AIB, mientras que el  $AG_3$  no tuvo efecto con o sin BA o AIB. Los brotes que crecieron con BA y AIB produjeron brotes altos con hojas similares a las producidas con 2iP. El  $AG_3$  solo o en combinación con otros reguladores tuvo poco efecto sobre la altura de las plantas. Todo lo anterior indica que el crecimiento es antagónico a la proliferación y dado que con BA se producen brotes pequeños y con 2iP se obtiene altura en los brotes, pero no ocurre proliferación, lo más adecuado sería utilizar primero BA para obtener gran cantidad de brotes y después transferirlos a 2iP o a bajas concentraciones de BA (1 mg/l) más AIB (1 mg/l) para obtener brotes de mayor tamaño y en mayor cantidad.

James y Thurbon (1981a) para la proliferación de brotes de manzano usaron de 1.0 a 2.0 mg/l de BA y de 0.1 a 0.5 mg/l de AIB (aunque notaron que la auxina podría ser omitida del medio sin ningún problema), mientras que Machinik y Orlikowska (1981) usaron de 0.5 a 1.0 mg/l de BA, 0.05 mg/l de ANA y 80.0 mg/l de sulfato de Adenina para propagar el patrón P22.

Lane y McDougald (1982) establecieron los manzanos M.27, M.9, M.26, MM.111 y 'Macspur' *in vitro* y evaluaron la respuesta a diferentes concentraciones de BA y ANA. Todos los cultivares sobrevivieron a las concentraciones usadas de BA (1.0, 5.0 y 10.0  $\mu\text{M}$ ); sin embargo, se observaron diferencias entre los cultivares, en cuanto al número de brotes producidos; obteniéndose la mayor cantidad con el portainjerto M.27 seguido por 'Macspur', M.9 y M.26. La mejor concentración para todos los cultivares, fue la de 5.0  $\mu\text{M}$ , y la mayor supresión de producción de brotes se obtuvo con M.9 y se indica que tal vez fue debido a la formación de callo.

## 5. Enraizamiento

El proceso de desarrollo de raíces adventicias en estacas de tallo o brotes, puede dividirse en tres etapas: 1) desdiferenciación celular, seguida por la iniciación de grupos de células meristemáticas (las iniciales de la raíz); 2) la diferenciación de esos grupos de células en primordios de la raíz reconocibles; y 3) el crecimiento y la emergencia de las raíces nuevas, incluyendo la ruptura de otros tejidos de tallo, y la formación de conexiones vasculares con los tejidos conductivos de la estaca (Hartmann y Kester, 1980).

La capacidad de las plantas para formar raíces adventicias varía grandemente entre especies y entre cultivares, lo que está dado por la interacción de factores endógenos y exógenos. Dentro de los primeros, podemos considerar la presencia o ausencia de raíces preformadas, los niveles endógenos de hormonas del crecimiento y



cofactores de enraizamiento, las relaciones antómicas y la condición fisiológica general de la planta. Dentro de los factores exógenos o externos podemos considerar las relaciones hídricas, efecto de la temperatura, la luz y condiciones generales del medio de enraizamiento.

### 5.1 Enraizamiento *in vitro*

Para el enraizamiento *in vitro* el medio de cultivo es modificado de diversas maneras; las concentraciones de sales minerales y azúcar con frecuencia son reducidas a la mitad de su concentración o menos, la citocinina es excluida del medio y la concentración de auxina es incrementada (Zimmerman, 1983; Hutchinson, 1984).

El enraizamiento de los brotes generalmente es desarrollado en un medio con agar, pero una alternativa exitosa ha sido el uso de un medio líquido con vermiculita, perlita, arena o papel filtro usados como soporte.

#### 5.1.1 Diversas especies

El conocer el momento y sitios de iniciación de raíces adventicias es de interés, sobre todo, cuando se desea estudiar la efectividad de ciertos reguladores y cofactores sobre el proceso de formación de raíces, ya que se ha observado que algunas sustancias son indispensables para la iniciación de primordios, en tanto que otras son necesarias para la emergencia y crecimiento de las raíces.

Probablemente, el primer estudio definido del sitio en que se inician las raíces adventicias corresponde al dendrólogo francés Duhamel du Manceau en 1758 (citado por Hartmann y Kester, 1980). Después de haber efectuado numerosas investigaciones en una amplia gama de especies de plantas, se ha observado que en las plantas herbáceas el lugar de origen de las raíces se encuentra justamente afuera y entre los haces vasculares. Estos pequeños grupos de células, las iniciales de raíz, continúan dividiéndose, formando grupos de muchas células pequeñas que se desarrollan en los primordios de la raíz. La división celular continúa y pronto cada grupo de células toma el aspecto de una punta de raíz. En el nuevo primordio radical se forma un sistema vascular que se conecta con el haz vascular adyacente. La punta de la raíz crece hacia afuera, a través de la corteza, emergiendo de la epidermis del tallo (Hartmann y Kester, 1980).

Vieitez *et al.* (1981) en un análisis sistemático de secciones transversales microscópicas de raíces de castaño en desarrollo, entre 0 y 23 días, revelan una secuencia de cuatro estructuras distinguibles: meristemoide, primordio de raíz, primordio de raíz con sistema vascular y raíces adventicias. Estos investigadores encontraron cambios en solo dos días después de haber establecido el cultivo sobre un medio con AIB. En este tiempo se observó un cierto número de células, en el parénquima floemático y rayos vasculares, que dieron origen a células iniciales de tamaño pequeño, con núcleo prominente y citoplasma denso. De los cuatro días de cultivo hacia adelante, se observaron más cambios anatómicos. Así, el número de células en división originaron masas de células meristemáticas formando una región en el floema, cerca del

cambium. Esta proliferación celular se hizo extremadamente pronunciada y fue identificada como "meristemoide". Ello consistió de agregaciones como meristemas de pequeñas células isodiamétricas, no vacuoladas y con núcleo y citoplasma teñidos intensamente. El meristemoide se individualizó al sexto día y la polarización de las divisiones dió origen a la típica apariencia de punta de raíz, generalmente localizada a nivel del anillo de esclerénquima, avanzando fuertemente a través del tejido del brote. Hacia el noveno y décimo días muchos primordios habían cruzado el esclerénquima y sus extremos distales habían penetrado el córtex. El desplazamiento de los grupos de fibras de esclerénquima ocasionalmente se observaron como un resultado de la presión ejercida por el primordio. De los 11 a los 12 días, la mayoría de los primordios desarrollaron su propio sistema vascular y se realizaron las conexiones completas entre las raíces y la planta, antes de la emergencia de la raíz. Las raíces adventicias generalmente emergen el día 14, aunque ocasionalmente fueron visibles al doceavo día. Finalmente, estos autores indican que los cambios anatómicos observados durante el proceso de neoformación de raíces es semejante en brotes cultivados *in vitro* e *in vivo*.

En frambuesa roja, Aytia (1985) observó que a los cuatro días de establecidas las plantas en los medios de cultivo para enraizamiento se manifestaron diferencias anatómicas, observándose una intensa división celular. A los seis días se observó la formación de ápices y a los 15 días emergió la raíz adventicia de la epidermis del tallo.

En el proceso de formación de raíces, están involucrados una serie de factores y entre ellos los reguladores del crecimiento,

principalmente las auxinas, y otras sustancias promotoras denominadas cofactores del enraizamiento, las cuales interactúan con las auxinas para producir ciertos resultados.

Dentro de las auxinas se encuentran el AIA, AIB, ANA, etc.; sin embargo, en la mayoría de los casos se han obtenido mejores resultados con el AIB. Así por ejemplo, Vieitez *et al.* (1981) encontraron que en castaño el AIB fue mejor que el ANA para la inducción de raíces, evaluado como porcentaje de enraizamiento y número de raíces por brote.

En lo que se refiere al efecto de compuestos fenólicos sobre este proceso, primariamente hay que considerar que dos compuestos son llamados sinérgicos cuando el número de raíces producido por los dos juntos es mayor que la suma de los dos números producidos por separado.

Se sabe que varios compuestos dihidroxifenoles, tales como el catecol, ácido caféico, ácido clorogénico, ácido protocatechuico y ácido florético, incrementan la conversión de triptófano a AIA, mientras que el resorsinol, tirosina y 0-nitrocresol, son inactivos. Se ha encontrado que cuando los orto-dihidroxifenos y triptófano son adheridos se producen más raíces y esto se explica por el efecto del AIA producido del triptófano. Sin embargo, se ha visto que los para y meta-dihidroxifenoles son inactivos en este sentido (Gorter, 1969).

Hess en 1962 (citado por Basu *et al.*, 1969), estudió el efecto de algunos compuestos fenólicos sobre el enraizamiento de estacas de *Phaseolus aureus* L, tratadas con AIA y concluyó que la cualificación estructural en un compuesto fenólico para estimular la iniciación de

raíces es la presencia de un mínimo de dos grupos hidróxilos (OH) en una relación "orto" y que la posición "para" debe estar libre. Por el contrario, Basu *et al.* (1969), indican que la posición del grupo hidroxilo, independientemente de que se encuentre en posición "orto" o "para" no causaron ninguna diferencia notable en la reacción, ya que al usar ácidos p-hidroxilo y o-hidroxilo ambos mostraron un sinergismo similar. Con esto se determina que los fenoles actúan en parte a través de una inhibición de la AIA-oxidasa y que esta enzima no es específica para el AIA, sino que también puede atacar al AIB y ANA. Esta ausencia de especificidad del sistema de oxidación AIA también ha sido reportado por otros autores; sin embargo, en este caso los resultados no están de acuerdo con la hipótesis comúnmente aceptada de que los monofenoles estimulan y los polifenoles inhiben la actividad de la AIA-oxidasa. Finalmente, estos autores indican que una explicación alternativa es que los fenoles no actúan específicamente a través del sistema AIA-oxidasa, sino que es posible que más bien se afecte la regeneración de raíces a través de otros caminos metabólicos.

Lo anterior coincide con lo propuesto por Gorter (1969) quien manifiesta que si fuera cierto que los fenoles destruyen el sistema AIA-oxidasa, se esperaría que los orto-dihidroxifenoles, tales como el catecol, ácido caféico y ácido clorogénico, incrementarían la producción de raíces, mientras que los monofenoles serían inefectivos o tendrían un efecto opuesto, como activadores de la AIA-oxidasa.

Basu *et al.* (1969) trataron hojas de *Eranthemum tricolor* con ácido tánico, ácido gálico, ácido p-hidroxibenzoico y ácido salicílico

a concentraciones de 1, 10, 100 y 1000 mg/l durante 24 horas. Posteriormente sumergieron las hojas en forma rápida en una solución de 1000 mg/l de AIA, AIB y ANA durante 10 seg. En los resultados encontraron que ninguno de los fenoles mostró efecto sobre el enraizamiento, cuando se usaron solos. El ácido tánico en combinación con ANA y AIB, promovió enraizamiento; sin embargo, con AIA no se observó efecto. El ácido gálico también incrementó en forma marcada el número de raíces de estacas tratadas con ANA y AIB pero no con el AIA. También se reporta sinergismo del ácido p-hidroxibenzoico con el AIA y ANA pero no con el AIB. El ácido salicílico promovió en forma marcada el enraizamiento con AIA, AIB y ANA.

James (1979) desarrolló un trabajo en enraizamiento de *Rubus* para observar los efectos del FG y AIB, solos o combinados, y encontró que todos los brotes que crecieron en un medio que contenía  $1 \times 10^{-3}$  M de FG y  $5 \times 10^{-6}$  M de AIB enraizaron con mayor facilidad que el resto de los tratamientos, demostrándose de esta manera el efecto promotor del compuesto fenólico, en cuestión.

En frambuesa roja, James *et al.* (1980) suprimieron las citocininas del medio de proliferación (Linsmaier y Skoog) e incrementaron la concentración de AIB de 0.1 a 1.0 mg/l y adicionaron 162 mg/l de FG para el enraizamiento de brotes del cultivar Malling Jewel. Sobre el porcentaje de enraizamiento no hubo efecto promotor del FG en la cantidad de raíces adventicias; sin embargo, en base al número de raíces por cultivo enraizado, la presencia de auxinas y FG estimularon significativamente la iniciación de raíces, comparando con los cultivos que contenían AIB o FG solos.

También en algunas especies, se ha usado el carbón activado para promover el enraizamiento. Anderson (1980) obtuvo éxito en el enraizamiento de frambuesas negras y rojas, usando un medio basal que contenía sales inorgánicas de Anderson, suplementadas con  $5 \mu\text{M}$  de AIB y  $600 \text{ mg/l}$  de carbón activado. Se observó que el AIB no tuvo ventajas sobre el enraizamiento, lo que coincide con Snir (1981). Sin embargo, el crecimiento total de la planta fue mejor cuando se aplicaron de  $1$  a  $8 \mu\text{M}$  de AIB en combinación con el carbón activado. Las frambuesas negras fueron más difíciles de enraizar que las rojas y la adición de carbón activado fue indispensable para el enraizamiento. Cuando no se incluyó esta sustancia en el medio, se obtuvo un reducido porcentaje de enraizamiento, bajo índice de raíces y baja altura de las plantas.

Por otro lado, la luz y temperatura también parecen tener influencia en la formación de raíces de algunas especies. Hammerschlag (1982) obtuvo 100% de enraizamiento de brotes de ciruelo mirabolano cultivados en un medio que contenía de  $2.5$  a  $5.0 \text{ mg/l}$  de AIB, mantenidos en la obscuridad durante dos semanas a  $21\text{-}26^\circ\text{C}$ . Los brotes mantenidos a  $26^\circ\text{C}$ , enraizaron más rápidamente que los que se tenían a  $21^\circ\text{C}$  y la adición de ácido clorogénico incrementó en forma marcada el enraizamiento. El autor indica que el efecto inhibitorio de la luz puede no deberse únicamente a la destrucción del AIA, sino también a la inhibición de síntesis de cofactores y destrucción de los mismos.

Otro factor al parecer importante sobre este proceso, es la concentración de sacarosa del medio de cultivo para enraizamiento.

Contrariamente a lo que se recomienda para la mayoría de las especies, en relación a una disminución de la concentración de sacarosa en un medio de cultivo para enraizamiento, Snir (1981); Zimmerman (1983); Hutchinson (1984); Hartmann y Kester (1980); Pal y Nanda (1981) y otros, enfatizan sobre la importancia de una fuente de carbohidratos para el enraizamiento.

Greenwood y Berlyn (1973) mencionan que el porcentaje de estacas que formaron raíces en *Pinus lambertiana* estuvo determinado por la concentración de sacarosa utilizada, indicando que el papel de la sacarosa puede ser a nivel osmótico o nutricional sobre la regeneración de raíces adventicias.

Pienazek (1968) indica que los ápices aislados de manzano, en contraste a plantas intactas, no pueden utilizar bien los nutrimentos presentes en el medio, en ausencia de sacarosa y enfatiza que la sacarosa es muy importante para la diferenciación de raíces.

Pal y Nanda (1981) encontraron que la sacarosa también incrementó el número de raíces en *Populus robusta*, obteniéndose mayor número de raíces cuando se usó 0.5% de sacarosa en relación a 0.2%. Estos autores indican que la sacarosa disminuye el daño a las plantas por alta temperatura y protege a las plantas de daños contra microorganismos.

#### 5.1.2 Manzano

Uno de los problemas más fuertes en la propagación *in vitro* del manzano, es la formación de raíces. Aún cuando existen trabajos donde



se reportan altos porcentajes de enraizamiento, todavía falta mucho por hacer.

Dentro de los factores más importantes en este proceso se ubican los reguladores del crecimiento, siendo los más importantes las auxinas y en menor grado las citocininas y giberelinas, así como la interacción entre ellos y la presencia de algunas otras sustancias con actividad promotora. Por otra parte, la consistencia del medio, el tiempo de exposición a los reguladores y la temperatura, entre otros, han sido factores que al parecer deberán ser considerados para lograr una respuesta satisfactoria en el enraizamiento.

El enraizamiento de brotes, como ya se mencionó, generalmente se lleva a cabo en un medio con agar, pero se ha visto que el uso de un medio líquido puede ser una alternativa favorable para algunas especies (Hammerschlag, 1982; Zimmerman, 1983; James, 1983a y 1983b). Snir y Erez (1980) señalan que el uso de un medio líquido es importante, porque permite la fácil absorción de reguladores y nutrimentos por la superficie basal de los brotes. Estos autores también han observado que se originan raíces en un mayor número de brotes de manzano 'Granny Smith' al ser éstos colocados en un medio líquido con auxinas, usando puentes de papel filtro y con agitación constante, ya que se obtuvo de un 60 a 80% de enraizamiento.

Machinik y Orlikowska (1981) en un trabajo para enraizamiento del portainjerto P22, usaron medios sólidos y líquidos, utilizando como soporte perlita. El medio utilizado fue de Murashige y Skoog, suplementado con 0.5 mg/l de AIB y 162 mg/l de FG. Los resultados obtenidos

indican que es mejor utilizar un medio líquido que un sólido.

Sriskandarajah y Mullins (1982) en el cultivar Granny Smith, no obtuvieron enraizamiento al utilizar un medio líquido estacionario y al utilizar medio solidificado con agar o líquido con puentes de papel filtro, sólo obtuvieron algo de enraizamiento (más del 4%). Sin embargo, al utilizar un medio líquido con agitación continua, con la mitad de la concentración de sales de Murashige y Skoog, se obtuvo más del 30% de enraizamiento.

Sriskandarajah y Mullins (1982) en otro trabajo enraizaron brotes de los cultivares Granny Smith, Jonathan y Delicious, para lo cual usaron microestacas proliferadas en un medio de Murashige y Skoog. El porcentaje más alto de enraizamiento (80%) correspondió a 'Granny Smith' y fue obtenido al mantener las microestacas en un medio líquido con agitación continua, con sales de Murashige y Skoog y con 10  $\mu\text{M}$  de AIB. En cambio para 'Jonathan' se lograron mejores resultados estableciendo las microestacas sobre un medio líquido con puentes de papel filtro y ya sea utilizando ANA a 10  $\mu\text{M}$  o AIA a 100  $\mu\text{M}$ .

Hutchinson (1984) en el cultivar Northern Spy, logró de 90 a 100% de enraizamiento utilizando sales de Linsmaier y Skoog a la mitad de su concentración y 1.0  $\mu\text{M}$  de AIB, colocó los brotes sobre un medio con agar, arena de cuarzo, perlita o líquido con agitación encontrando que en agar se tuvo pobre desarrollo radical.

Villegas y Castillo (1985) trabajando con MM.106, encontraron que el uso de un medio líquido favorece el número y tamaño de raíces, así como el porcentaje de enraizamiento y además permite obtener plantas enraizadas en un tiempo más corto.

Muchos trabajos se han desarrollado con cultivares y portainjertos de manzano (James, 1979, 1983a; Welander, 1983) probando diferentes tipos y concentraciones de auxinas, encontrándose que si bien existen respuestas diferentes de los portainjertos o cultivares (como se puede notar en algunos trabajos de los antes citados y otros que se citarán posteriormente) a las concentraciones de auxinas, es importante el efecto del portainjerto o cultivar por la información genética que presenta (Nemeth, 1981; Lane y McDougald, 1982).

Abbott y Whiteley (1976) usaron AIB, ANA y AIA a concentraciones que variaron de 0.1 a 10.0 mg/l para enraizar el manzano "Cox's Orange Pippin"; sin embargo, no obtuvieron resultados satisfactorios, ya que sólo algunos de los cultivos formaron raíces en forma aislada.

Nemeth (1981) para el enraizamiento de los portainjertos M.26, M.27, MM.104 y el cultivar Stark Spur probó las auxinas: 2-cloro-3-(3-cloro-2-metilfenil) propionitrilo (CCMPPN), 2, cloro-3-(2,3-diclorofenil) propionitrilo (CDPPN) y 2-cloro-3-(2,3-diclorifenil) butironitrilo (CDPBN) para compararlas con el AIB, encontrando que la auxina CDPPN aplicada a  $5 \times 10^{-6}M$  fue la más efectiva produciendo 90% más raíces que el AIB. Con M.26 y MM.104 el CCMPPN y el CDPBN, fueron similares al AIB. Sin embargo, para el cultivar Stark Spur el CCMPPN y el CDPBN no fueron efectivos y con M.27 estimularon la formación de raíces sólo en un bajo porcentaje de los brotes. Sobre los medios sin reguladores en M.26, MM.104 y M.27 sólo se formaron algunas raíces, en tanto que en el cultivar Stark Spur no se formó ninguna. En relación al AIB, la concentración óptima para formación de raíces fue de  $5 \times 10^{-6}M$ , ya que cuando se usó  $10^{-5}M$  se formó gran cantidad de callo. Para el

resto de las auxinas, concentraciones mayores a  $5 \times 10^{-6}$  M disminuyeron la cantidad de raíces, inhibieron el crecimiento de las que se habían formado y tendieron a producir callo. Este trabajo confirma la interacción entre las auxinas y portainjertos y la diferencia de enraizamiento entre materiales, lo que está determinado por la información genética de la planta.

Sriskandarajah y Mullins (1981) trabajando con el cultivar Granny Smith observaron que la auxina endógena fue esencial para el enraizamiento, el AIB a concentración 10  $\mu$ M y Acido Neftoxiacético (NOA) a 10  $\mu$ M promovieron formación de raíces, mientras que el 2,4-D tuvo efecto inhibitorio. Además encontraron que el origen de las raíces adventicias difirió de acuerdo a la auxina aplicada, pues con NOA el enraizamiento apareció por cualquier parte de la superficie del brote, y con AIB las raíces crecieron a través de la epidermis y cerca o en la base del brote.

Hutchinson (1984) en su trabajo con 'Northern Spy', probó las auxinas AIA, ANA y NOA, y ninguno probó ser tan bueno como el AIB, ya que con ANA se tuvo formación de callo.

Werner y Boe (1980) indujeron enraizamiento en el portainjerto M.7 a través de subcultivos de brotes sobre un medio de Murashige y Skoog, con un tercio de su concentración, suplementado con 0.22% de agar y 1.0, 2.0 y 3.0 mg/l de AIB, observando que los brotes subcultivados en un medio con 2.0 mg/l de AIB enraizaron en 28 días, obteniéndose hasta el 100% de enraizamiento.

Lane y McDougald (1982) en un trabajo de enraizamiento, utilizaron los portainjertos M.27, M.9, M.26 y MM.106, así como el cultivar Macspur. para la promoción de raíces probaron diferentes concentraciones de ANA (0.1, 0.33, 1.0, 3.3, 10.0 y 33.0  $\mu\text{M}$ ) y se observó que la respuesta a las concentraciones fue más amplia para los portainjertos que para el cultivo Macspur, obteniendo un 85% de enraizamiento para los primeros y sólo un 58% para el segundo. El mejor porcentaje de enraizamiento se logró con 1.0 ó 3.3  $\mu\text{M}$  de ANA.

Se ha observado que en el enraizamiento de algunas especies frutícolas es muy importante el tiempo de exposición a un medio con reguladores. Así Abbott y Whiteley (1976) en trabajos con "Cox's Orange Pippin" lograron inducción de raíces, tratando los brotes con AIB (1 mg/l) haciendo una inmersión durante 15 min y después llevando los brotes a un medio líquido con soportes de papel filtro o a un medio con agar. Bajo este método, las raíces aparecieron en un período de 10 a 14 días obteniendo un 30% de enraizamiento de brotes. En posteriores experimentos usaron solamente 0.1 mg/l de AIB y 0.1 mg/l de citocinina e hicieron una inmersión por 8 horas, logrando el 50% de enraizamiento.

James y Thurbon (1979) en el portainjerto M.9, lograron más del 60% de enraizamiento al colocar los brotes, durante 4 horas, en un medio que contenía 2 mg/l de AIB y después haciendo la transferencia a un medio libre de reguladores. Con este procedimiento se evitó la formación de callo, que ocurre cuando se dejan los brotes en forma permanente sobre un medio con hormonas, y se indica que se incrementó hasta tres veces el número de raíces, en relación al contacto continuo.

Snir y Erez (1980) al igual que James y Thurbon (1979) notaron que el contacto continuo de los brotes sobre un medio para enraizamiento, promueve la formación de callo en la base, lo cual se puede evitar si el período de tratamiento de AIB es disminuído. Estos autores (Snir y Erez, 1980), para el enraizamiento de los portainjertos MM.104, MM.106 y MM.109 utilizaron un medio de Murashige y Skoog, suplementado con 2% de sacarosa, 0.8 mg/l de Tiamina · HCl y 1.0 mg/l de AIB, y tratando los brotes con incisiones por un período de 6 a 8 días, lograron hasta el 100% de enraizamiento, obteniendo un promedio de 20 raíces por estaca.

Lane (1982) en un estudio de enraizamiento con diversos cultivos (M.27, M.9, M.26 y Macspur) encontró que la reacción del portainjerto M.9 fue completamente diferente al resto, ya que requirió de una exposición aguda al ANA más que prolongada, ya que con esta última condición formó mucho callo, lo que sugiere que puede deberse a que dicho portainjerto responde a concentraciones más bajas o tiene niveles internos más altos de auxinas e indica que en general se requieren de auxinas para la iniciación de raíces, pero una vez que esto se presenta, se puede prescindir de ellas.

Lane y McDougald (1982) observaron que con M.9 tratados con 0.1, 0.33, 1.0, 3.3, 10.0 y 33.0  $\mu$ M de ANA se tuvo gran formación de callo cuando se mantuvo continuamente con la auxina, lo que evitó la formación de raíces.

Sriskandarajah y Mullins (1982) con el cultivar Delicious, obtuvieron más del 80% de enraizamiento, sumergiendo la base de los brotes

en una solución con 750  $\mu\text{M}$  de AIB y después llevándolos a un medio líquido.

Por otra parte, el uso del FG en el medio de enraizamiento para cultivares y portainjertos de manzano ha sido reportado por diferentes autores, quienes han encontrado aumentos en el porcentaje de enraizamiento al combinarlo con AIB (Jones y Hatfield, 1976; James y Thurbon, 1979; James, 1979; Welander y Huntrieser, 1981; Villegas, 1982; Villegas y Castillo, 1985). Sin embargo, Zimmerman y Broome (1981), reportan efecto inconsistente. Otros autores han probado no sólo el FG, sino también otros compuestos fenólicos.

Jones y Hatfield (1976) para el enraizamiento del portainjerto M.26, utilizaron diferentes compuestos fenólicos (floroglucinol, ácido florético, pirogalol, ácido caféico y catecol) y diferentes auxinas (AIB, AIA y ANA). Se encontró que el FG y ácido florético incrementan marcadamente el número de brotes que enraizan con auxinas; en tanto que el ácido caféico, pirogalol y catecol no fueron efectivos a este respecto. La producción de raíces fue mejor con  $4 \times 10^{-6}\text{M}$  de AIB, y la adición de fenoles incrementó el porcentaje de enraizamiento. Se encontró además que los compuestos fenólicos no afectan el número de raíces por brote, ya que en general, se obtuvo un promedio de 2 a 4 raíces por brote.

James y Thurbon (1981b) al probar diferentes fenoles sobre el enraizamiento de los portainjertos M.9 y M.26 encontraron que de los fenoles simples, sólo el FG y la hidroquinona tuvieron efecto sobre el número de raíces, ya que el ácido salicílico inhibió completamente

el efecto inductivo del AIA y los fenilpropanoides, ácido ferúlico y umbeliferona redujeron significativamente el enraizamiento. Otros productos de degradación como el florentín y ácido florético incrementaron también el número de raíces, comparando con el testigo. Con respecto a los portainjertos en M.26, no se encontraron efectos favorables del FG sobre el enraizamiento y cuando estuvo presente, promovió la formación de callo. Por el contrario, en M.9 el FG promovió la formación de raíces y no se observaron diferencias en la formación de callo, lo que indica que este portainjerto requiere de niveles mayores de auxinas. Haissig en 1974 (citado por James y Thurbon, 1981b), ha discutido el papel del FG e indica que este fenol sólo es necesario en especies de difícil enraizamiento y donde no hay raíces preformadas, ya que con especies fáciles de enraizar con auxina basta.

Zimmerman y Broome (1981) usaron estacas de (*Malus domestica* Borkh) proliferadas en un medio de Murashige y Skoog para evaluarlos en su habilidad para formar raíces en presencia o ausencia de FG y utilizando diversas concentraciones de AIB. El FG no promovió enraizamiento de 'Northern Spy', 'Summer Rambo' o 'Delicious', teniendo efecto inconsistente sobre 'Nugget', 'Ozovk Gold', 'Spurre Rome' y 'Stayman' y estimuló el enraizamiento en 'Spartan'. Sin embargo, en este último cultivar no se obtuvo un mayor enraizamiento al compararlo con experimentos anteriores en donde no se usó el FG. El fenol en cuestión mostró las mismas respuestas cuando se esterilizó en autoclave y cuando se filtró. La inclusión de AIB en los medios mejoró el enraizamiento en todos los cultivares y su efecto fue mayor que el efecto del FG, excepto para 'Spartan'. Sin embargo, el FG redujo la



formación de callo y deformación de las raíces sobre los brotes que recibieron AIB. Así, en este trabajo no hubo evidencia de que el FG fuera esencial para el enraizamiento de los cultivares probados.

Welander y Huntrieser (1981) probaron diferentes concentraciones de AIB y FG para el enraizamiento del portainjerto A2, encontrando que el AIB a una concentración de 15  $\mu\text{M}$  sin FG produjo el más bajo porcentaje de enraizamiento, al compararlo con 5 y 10  $\mu\text{M}$ . El FG combinado con AIB mejoró el enraizamiento, pero sus concentraciones óptimas variaron de acuerdo a las diferentes fases del crecimiento; así para brotes adultos dió mejores resultados  $10^{-4}\text{M}$  ya que  $10^{-3}\text{M}$  inhibió fuertemente el enraizamiento. En las fases juveniles tanto la concentración de  $10^{-4}$  como la de  $10^{-3}\text{M}$  de FG estimularon el enraizamiento. El FG a  $10^{-4}\text{M}$  también incrementó el número de raíces. Las raíces de mayor tamaño se obtuvieron con el  $10^{-3}\text{M}$  de FG y 5  $\mu\text{M}$  de AIB. También se observó que el FG a concentración de  $10^{-3}\text{M}$  redujo la formación de callo a todas las concentraciones utilizadas de AIB.

James (1983b) encontró que el portainjerto M.9 requirió de  $1 \times 10^{-5}\text{M}$  a  $3 \times 10^{-3}\text{M}$  de AIA para lograr el número óptimo de raíces, en tanto que para el M.26 se requirió de solamente  $1 \times 10^{-4}\text{M}$  para obtener una respuesta similar, lo cual refleja la diferencia en el metabolismo endógeno de la AIA. Se observó además que el FG no afectó las tasas de absorción del AIA.

Cruz (1983) al emplear AIB solo en concentraciones de 0.2 y 0.5 mg/l bajo condiciones de exposición permanente, con MM.106 logró un 40% de enraizamiento. En cambio, cuando adicionó 162 mg/l de FG el

porcentaje se incrementó aproximadamente un 100% más que al emplear AIB solo, logrando enraizar del 70 a 80% de los brotes.

Otro factor importante que influye en la respuesta de enraizamiento, es el nivel de sacarosa; Villegas y Castillo (1985), probaron diferentes concentraciones de sacarosa (10, 20 y 30 g/l) y observaron que el porcentaje de enraizamiento, se incrementó al aumentar la concentración de 10 a 20 g/l, pero disminuyó al utilizar 30 g/l, esto posiblemente debido a que el potencial, se reduce a tal grado que existe un desbalance con el potencial osmótico del brote que disminuye su capacidad de absorción de nutrimentos y reguladores del crecimiento, reduciendo en consecuencia, el enraizamiento.

Otros investigadores han observado el efecto del número de recultivos sobre el enraizamiento, por ejemplo: Sriskandarajah y Mullins (1982) trabajando con diversos cultivares de manzano tratados con ANA a 10  $\mu\text{M}$  o AIA a 100  $\mu\text{M}$ , encontraron que se tuvo un mejoramiento progresivo en el enraizamiento con el incremento en el número de subcultivos, ya que en 'Jonathan' después de 9 subcultivos se obtuvo 95% de enraizamiento y en 'Delicious' se incrementó de 21% después de 4 subcultivos a 79% después de 31.

Sriskandarajah *et al.* (1982) para el enraizamiento en manzano 'Jonathan' y 'Delicious' usaron brotes proliferados en un medio que contenía 10  $\mu\text{M}$  de BA. para inducir el desarrollo de raíces cortaron los brotes en microestacas de aproximadamente 50 mm, las cuales fueron tratadas con una solución de AIB a una concentración de 750  $\mu\text{M}$  y después fueron transferidas a un medio con 10  $\mu\text{M}$  de ANA. Algunos brotes

fueron subcultivados cada 5 semanas en un medio con BA y se observó que el incremento de los subcultivos mejoró el porcentaje de enraizamiento.

Takeo *et al.* (1982/83) reportan que la formación de raíces en brotes después de 1, 7 y 31 subcultivos (5, 29 y 109 semanas después del cultivo inicial) fue del orden de 5, 78 y 95%, respectivamente, y al evaluar los niveles de Acido Giberélico encontraron que tenían 40, 19 y 14 eq/g de peso seco, lo que sugiere una relación inversa entre los niveles endógenos de Acido Giberélico y la habilidad de enraizamiento y se ha comprobado que el Giberélico inhibe la formación de raíces, en contraste a las citocininas que incrementan el enraizamiento de 1.5 hasta 2.7 veces. Se sugiere que tal vez durante los subcultivos de los brotes se incrementen algunos factores promotores o disminuyan los inhibidores, dentro de los que se encuentran las giberelinas y citocininas.

Hasta aquí hemos manifestado el efecto de algunas sustancias en el medio de enraizamiento, así como el tiempo de exposición a ellas, que han permitido el alto o bajo índice de enraizamiento. Sin embargo, estos factores no actúan de forma independiente o aislada, ya que también los factores medioambientales tienen participación en la formación de raíces en los brotes. Entre éstos podemos citar principalmente, temperatura y luz, que en combinación con la composición del medio de cultivo, originan un buen o mal porcentaje de enraizamiento.

La temperatura del medio de enraizamiento de estacas de manzano en un rango de 10° a 28°C, tienen un marcado efecto sobre el enraizamiento con el óptimo a 22°C y con concentraciones altas de AIB; altas

temperaturas de alrededor de 27°C favorecen el número de raíces, relativamente. La ocurrencia de enraizamiento basal se da frecuentemente a alta concentración de AIB y a una alta temperatura basal (Howard, 1968).

Lane (1978) en los cultivares McIntosh y Delicious encontró que el mejor enraizamiento se observó al utilizar ANA a una concentración de  $10^{-5}$ M en un medio que contenía la mitad de la concentración de sales orgánicas. Además observó que la temperatura tiene un efecto importante sobre el enraizamiento, encontrando que con 28°C se obtienen los mejores resultados, ya que a temperaturas mayores, hay una acumulación de antocianinas tornándose cloróticas las plantas. La eficiencia del enraizamiento también disminuyó al sustituir el ANA por AIB.

Machinik y Orlikowska (1981) en un trabajo de enraizamiento del portainjerto P22, manifiesta que es mejor el resultado a una temperatura constante, en relación a cuando se usan temperaturas fluctuantes entre 20 y 35°C.

Sriskandarajah y Mullins (1982) con iluminación continua y temperatura constante ( $26^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ) obtuvieron más del 30% de enraizamiento de brotes de 'Granny Smith'.

James (1983a) para el enraizamiento del portainjerto M.9 utilizó AIA a  $2.8 \times 10^{-5}$ M y AIB a  $1.5 \times 10^{-5}$ M; así como la presencia o ausencia de FG a  $10^{-3}$ M, encontrando que el FG y AIB indujeron enraizamiento después de 4 días de exposición, pero al exceder 8 días de contacto, disminuyó el número de raíces y propició formación de callo. También se observó sinergismo entre el FG y AIA induciendo enraizamiento a los 13

días de exposición, pero también se indujo enraizamiento con AIA sólo al colocar irradiación de  $20 \text{ w/m}^2$ . Las temperaturas probadas (22, 25 y  $20^\circ\text{C}$ ) no mostraron diferencias en el enraizamiento. En presencia del FG el uso de cultivo líquido durante la fase sensitiva redujo el número de raíces pero no el porcentaje de enraizamiento. En este trabajo también se encontró que los brotes expuestos a la luz durante un período de 6 días, tuvieron más bajo porcentaje de enraizamiento que brotes mantenidos en la oscuridad, en presencia o ausencia de FG. Se observó que los primordios de raíces en M.9 se inician a las 12 horas de exposición de los brotes a  $1.5 \times 10^{-5}\text{M}$  de AIB y se indica que la longitud de la fase sensitiva a la auxina depende del tipo y concentración de la misma, así como de acuerdo a los cultivares, edad del material y otros. También es probable que el contacto del FG por períodos largos no tenga efectos y de ahí que a veces no se encuentren resultados. La explicación que se da al hecho de que se reduzca el enraizamiento en un medio líquido es la falta de aireación y las bajas tasas de absorción del AIA.

Por otro lado, una práctica que desde hace muchos años se lleva a cabo para aumentar la formación de raíces adventicias en tejidos de tallo es la etiolación. Estudios realizados con estacas etioladas manifiestan que en éstas había disminución en el contenido de almidón, en el reforzamiento mecánico de los tejidos, en el espesor de la pared celular, en los depósitos sobre esa pared y en la cantidad total de tejido vascular, mientras que en el contenido endógeno de auxinas había cantidades ligeramente mayores que en estacas sin etiolar (Hartmann y Kester, 1980).

Doud y Carlson (1977) trabajando con los portainjertos M.9, M.26, M.2 y MM.106, encontraron que los brotes no etiolados no enraizan después de 4 semanas, mientras que los etiolados incrementan la formación de iniciales de raíces en la base del tallo en una semana, y su emergencia es rápida bajo condiciones apropiadas de temperatura y humedad en el medio de enraizamiento. También manifiestan que el porcentaje de esclerificación de brotes etiolados es menor que el de no etiolados y esto favorece la emergencia de las raíces puesto que la obstrucción mecánica que esto crea disminuye.

James y Thurbon (1981b) colocaron brotes de los portainjertos M.9 y M.26 en obscuridad, durante 4 días en un medio que contenía AIB y FG y observaron que la etiolación no tuvo efecto sobre el enraizamiento.

Anderson (1982) indica que la etiolación de brotes de manzano durante una semana es suficiente para cambiar los niveles endógenos de hormonas y favorecer la iniciación de raíces en manzano, ya que con tratamientos mayores, los brotes etiolados son débiles y difíciles de aclimatizar en el invernadero. Además indica que después de la etiolación es conveniente proporcionar a los brotes una etapa de reendurecimiento, porque de lo contrario en los brotes etiolados se forma callo en la base y posteriormente ocurre la muerte. En los cultivares Supreme Red y Wellspur se hicieron tratamientos de etiolación y después se sometieron a diferentes períodos de luz (0, 1, 2, 4, 8 y 16 días) para el reverdecimiento. El promedio de porcentajes de enraizamiento para los brotes etiolados fue de 53% para 'Supreme Red' y 82% para 'Wellspur', en tanto que para los no etiolados fue de 2% y 10%, respectivamente.

Los tratamientos de reverdecimiento de 1 y 2 días, propiciaron la formación de callo sobre la base de los brotes.

Druart *et al.* (1982) estudiaron el efecto de la obscuridad sobre el enraizamiento de brotes de manzano 'Jonagold' encontrando que la obscuridad continua indujo altos porcentajes de enraizamiento como consecuencia de un aumento en la actividad de la peroxidasa y cambios en los niveles de fenoles.

James y Thurbon (1982) expusieron los portainjertos M.9 y M.26 a medios de cultivo con  $15 \mu\text{M}$  de AIB y  $28 \mu\text{M}$  de AIA, durante períodos de 0 a 13 días. En la primer fase del cultivo los brotes fueron colocados en la obscuridad a  $25^\circ\text{C}$  y durante la segunda fase en luz a  $20 \text{ W/m}^2$  y períodos de 16/8 h de luz : obscuridad. Se observó que la longitud óptima de exposición para M.9 fue de 4 días con AIB y 6 días con AIA, ya que mayores tiempos de exposición, disminuyeron el número de raíces y propiciaron la formación de callo. También se encontró sinergismo entre el FG y AIA para el portainjerto M.9 sugiriendo que el fenol en cuestión evita la destrucción del AIA.

Walander (1982) en el portainjerto M.26 realizó tres experimentos con el objeto de promover la iniciación de raíces. El primero consistió en un medio modificado de Murashige y Skoog adicionando diferentes concentraciones de AIB y FG. En el segundo experimento se usó un medio modificado de Murashige y Skoog más  $10 \mu\text{M}$  de AIB y  $10^{-4} \text{ M}$  de FG, manteniendo los brotes en la obscuridad o luz por un período de cinco días y después los brotes fueron transferidos a un medio para enraizamiento sin AIB y FG, y manteniéndolos en condiciones de luz. El tercer experimento

consistió en comparar los medios de Murashige y Skoog y de Lapoivre con la concentración reducida a la mitad, adicionando a ambos medios 10  $\mu\text{M}$  de AIB y ajustando el pH a 5.2 y 6.0. Los brotes en estos medios se mantuvieron en la obscuridad por 5 días y después se transfirieron a un medio sin AIB. En el primer experimento hubo diferencias entre las concentraciones de AIB y al adicionar  $10^{-5}$  y  $10^{-4}\text{M}$  de FG a la concentración de 5  $\mu\text{M}$  de AIB se incrementó el enraizamiento. Además cuando los brotes estuvieron con AIB y sin FG, hubo formación de callo. En el segundo experimento se logró mayor porcentaje de enraizamiento en la obscuridad y en el tercer experimento no se observó diferencia entre los niveles usados de pH y el medio de Lapoivre redujo marcadamente la formación de callo y produjo más alto porcentaje de sobrevivencia.

Welander (1983) obtuvo buen enraizamiento en el portainjerto M.26 al exponer los brotes en AIB por un período de 5 días en la obscuridad, y redujo la formación de callo e incrementó enraizamiento al utilizar un medio de Lapoivre en vez de uno de Murashige y Skoog. Las concentraciones óptimas de AIB para brotes jóvenes, fue de 1.25  $\mu\text{M}$  y para brotes adultos de 0.5  $\mu\text{M}$ . Estudios anatómicos mostraron que las iniciales de raíz se formaron después de 5 días de exposición al AIB y al transferirlos a condiciones no estériles, se logró hasta un 90% de sobrevivencia. No se observaron diferencias en relación al enraizamiento y formación de callo, de acuerdo al pH utilizado.

Zimmerman (1984) en el manzano 'Delicious', un cultivar difícil de enraizar, logró hasta el 100% de enraizamiento al colocar los brotes sobre un medio para enraizamiento, en la obscuridad a 30°C durante



la primer semana y después llevándolos a un régimen de 16 hs de luz y 8 hs de obscuridad a 25°C. El medio de enraizamiento estuvo constituido por la mitad de sales de Murashige y Skoog suplementadas con 1.2  $\mu$ M de Tiamina-HCl, 0.56 mM de  $AG_3$ , 87.6 mM de sacarosa y 7 g/l de Difco Bacto agar. El tratamiento de obscuridad aplicado durante el estado de proliferación (etiolación) fue menos efectivo que el aplicado al comienzo del enraizamiento. El tiempo óptimo de obscuridad durante la formación de raíces fue de 4 a 7 días y el incremento de la temperatura de 25° a 30°C mejoró el enraizamiento de 'Delicious', 'Royal Red Delicious' y 'Vermont Spur Delicious', en ausencia de FG. Posterior incremento en la temperatura a 35°C estimuló el enraizamiento en 'Royal Red Delicious' pero lo redujo en 'Vermont Spur Delicious'. La transferencia de los brotes a un medio libre de auxinas después de una semana, no tuvo efecto sobre el porcentaje de enraizamiento y número de raíces. En general el FG estimuló el enraizamiento en 'Delicious' pero no en 'Golden Delicious'.

Zimmerman y Fordham (1985) para el enraizamiento de diversos cultivares colocaron los brotes en la obscuridad durante 3 a 7 días, en un medio líquido de Murashige y Skoog al 50% de su concentración, suplementado con 43.8 mM de sacarosa y diferentes tipos y concentraciones de auxinas, así como FG. La temperatura durante el tratamiento de obscuridad, se mantuvo de 25 a 35°C. De las auxinas probadas la mejor fue el AIB, seguido por ANA y AIA. Las iniciales de raíz se observaron de los 7 a los 10 días de establecidos los brotes. En relación al FG se observó que en los cultivares 'Delicious', 'Royal Red Delicious', 'Vermont Spur Delicious' y 'Spartan' disminuyó significativamente el

enraizamiento, mientras que para el resto no tuvo efectos significativos, a excepción de 'Mutsu' en donde incrementó ligeramente el enraizamiento. El autor indica que las diferencias entre cultivares puede deberse a las condiciones fisiológicas en que se encontraban los brotes cuando fueron utilizados.

Otro factor de suma importancia, pero en realidad poco estudiado, es el pH del medio de cultivo para enraizamiento. La mayoría de los reportes existentes son de trabajos realizados *in vivo*, ya sea en el campo o bien en invernadero cuando se quieren enraizar estacas.

Es reconocido que niveles excesivos de Al y Mn son de los mayores elementos que contribuyen al pobre crecimiento de la planta sobre suelos ácidos. En cualquier caso, se manifiesta que diferentes niveles de pH afectan la estructura del suelo y la disponibilidad de varios elementos (Jonkers y Hoestra, 1978).

Childers (1973) manifiesta que un pH relativamente alto del suelo (6.0 - 6.5) es preferido para adecuar el crecimiento del manzano, aunque tiene alta tolerancia a otros pH. Sin embargo, Jonkers y Hoestra (1978) manifiestan que la mayoría de los autores aceptan un pH de entre 5.5 y 6.5 como óptimo para este frutal, aún cuando no hay bases experimentales para esta afirmación.

Por otra parte, se ha observado que niveles bajos de pH del suelo parecen estar asociados con reducida acumulación de Ca en la extensión de la hoja y del brote (Neilsen *et al.*, 1982). También bajo pH del suelo, ha estado relacionado con la reducción en el crecimiento de raíz (Batjer y Sudds, 1937, citados por Neilsen *et al.*, 1982).

Al respecto también se ha observado en algunas herbáceas que el pH tiene efecto sobre la emergencia y la elongación de las raíces, ya que todas las especies expuestas a un pH de 3, manifiestan una carencia total del crecimiento de raíces debido a que sufren daños severos y colapsos; mientras que el crecimiento de las raíces se logra a pH de 4. Asimismo se presenta una marcada reducción en el crecimiento de las raíces a un pH de 9 (Moore, 1974).

## 6. Establecimiento a suelo

El establecimiento a suelo, consiste en colocar directamente las plantas obtenidas asépticamente en una mezcla de suelo con textura friable y desinfectado, contenido en recipientes, proporcionando así los elementos nutritivos y soporte en forma natural que les permitirá sobrevivir y desarrollar satisfactoriamente, primero en el invernadero y luego en el campo (Villegas, 1982). El post-transplante de un medio ambiente controlado a uno sin controlar, es posible en un solo paso; sin embargo, la poca experiencia en esto, ha conducido a un retraso en el crecimiento de las plántulas, por lo tanto antes de pasar éstas a una total exposición a las nuevas condiciones, es necesario un proceso lento de aclimatización (proceso de adaptación de un organismo a un cambio del medio ambiente, regulado por el hombre), después del cual se pueden transferir a una exposición total de las nuevas condiciones (Brainerd y Fuchigami, 1981; Dunstan, 1982).

Aunque se ha hecho investigación considerable para optimizar el medio nutritivo y las condiciones de cultivo *in vitro* para numerosas

especies y cultivares de plantas, poco se ha investigado para examinar los problemas asociados con el reestablecimiento de plantas de cultivo de tejidos *in vivo*. Esto, debido a que el éxito final de las plantas propagadas *in vitro* como un medio comercial de propagación de plantas, depende de la habilidad de transferencia de las plantas fuera del cultivo en gran escala, a bajo costo y con amplia proporción de sobrevivencia (Conner y Thomas, 1982).

Se ha observado que hay un importante período de transición por lo cual las plantas de cultivo de tejidos deben pasar entre el medio ambiente protector del laboratorio y el crudo ambiente del invernadero. Sin embargo, las plántulas de algunos cultivares sobreviven a este estado crucial más que otros (Lydiane y Kyte, 1982).

En esta etapa de establecimiento los problemas más frecuentes que deben solventarse son: bajos porcentajes de sobrevivencia y tamaño reducido de las plantas micropropagadas (Arellano y González, 1985). La sobrevivencia es el principal problema con el que se han encontrado los investigadores al tratar de establecer en suelo las plantas micropropagadas, este bajo porcentaje ha limitado consecuentemente, la producción comercial (Fuchigami, *et al.*, 1981). Esto sin duda se presenta cuando el cambio de situación de las plantas les acarrea un agobio por desequilibrio en su contenido hídrico al producirse una transpiración elevada, además de estar expuestas a fluctuaciones térmicas, provocando con ello un desbalance en la planta, el cual se manifiesta como marchitez o muerte (Braitherd y Fuchigami, 1981). Se ha observado que los porcentajes de sobrevivencia varían entre especies y aún entre cultivares (Poole y Conover, 1983).

Además, se ha visto que las plantas propagadas por cultivo de tejidos difieren de las obtenidas por las prácticas convencionales en varios aspectos: a) un desconocimiento de los factores necesarios para maximizar las tasas de sobrevivencia, cuando se reestablecen como plantas *in vivo*; b) las plántulas usadas en cultivo de tejidos son usualmente mucho más pequeñas y tuvieron más ambiente controlado que las plantas de semillas de invernadero o estacas; además de que éstas son cultivadas bajo condiciones asépticas sobre un medio conteniendo nutrientes, azúcares exógenos y reguladores del crecimiento; c) en cultivo de tejidos las plantas están creciendo en muy altas humedades, alrededor del 100% (Conner y Thomas, 1982). De esta manera las plantas obtenidas por este proceso son difíciles para trasplantar por dos principales razones: primera, su modo heterotrófico de nutrición y segunda, su pobre control de la pérdida de agua.

Aunque las plántulas pueden parecer completamente funcionales, fisiológicamente tienen poca capacidad de fotosintetizar activamente, debido a que esto es innecesario, aún si la clorofila está presente en las hojas, ya que se les suministra carbohidratos exógenamente, y es probable que bajo estas condiciones, las enzimas responsables para la fotosíntesis estén inactivas o ausentes, de tal manera, que en los cultivos hay muy bajos niveles de fotosíntesis a pesar de la apariencia verde de las plántulas y el crecimiento activo depende entonces de la fuente de carbono exógena suplementada (Conner y Thomas, 1982). Estos autores indican también que cuando las plantas de cultivo *in vitro* son trasplantadas, hay una inmediata necesidad para la regeneración de plantas que asuman una total nutrición fotoautotrófica. En sus trabajos

con *Brassica oleracea* var. Botrytis, obtenidas por esta técnica, aún después de 7 días del trasplante, no encontraron absorción neta de CO<sub>2</sub> (el CO<sub>2</sub> liberado en respiración fue más grande que el absorbido para fotosíntesis). Una absorción neta de CO<sub>2</sub> no fue lograda por estas plantas hasta 14 días después del trasplante, después de los cuales se hicieron totalmente autotróficas y pudieron sostener el crecimiento normal. Sin embargo, el pobre desarrollo del sistema fotosintético en cultivo de tejidos puede ser un gran factor encontrado en plantas nuevas que se transplantan y que las hace vulnerables a cualquier forma de estrés medioambiental (Conner y Thomas, 1982).

Por otra parte, las condiciones de las plántulas cuando son transplantadas, pueden ser generalmente afectadas por alteraciones en el tipo o concentraciones de reguladores de crecimiento, por la disponibilidad de sales y sacarosa, y por el lapso de tiempo sobre el medio de enraizamiento (Dunstan, 1982). Se ha manifestado también que las plantas que se obtienen por métodos asépticos, difieren en cuanto a su morfología y calidad entre sí, debido a las numerosas respuestas diferenciales que tienen los propágulos a la presencia y/o concentración de reguladores del crecimiento y de sustancias enriquecedoras del medio como sacarosa, floreglucinol, carbón activado y otros (Sriskanderajah y Mullins, 1981; Villegas, 1982).

Villegas (1982) manifiesta que la calidad de las plantas es afectada también por el tiempo que permanecen éstas en el medio de enraizamiento después de iniciada la raíz, dado que la senescencia de las plantas se da a medida que se consumen las diferentes sustancias que integran el medio de cultivo.

Brainerd *et al.* (1981) sugieren que otros procesos fisiológicos también pueden contribuir al estado de agobio o estrés por déficit de agua como la baja respuesta estomática, el transporte del agua y las mayores exposiciones de abertura estomática. Estos autores trabajando con plantas de ciruelo cultivadas asépticamente, encontraron que las hojas no aclimatizadas fueron significativamente más agobiadas y sus estomas permanecieron durante más tiempo abiertos, por lo que perdieron más agua en menos tiempo que aquellas plantas aclimatizadas en invernadero.

Brainerd y Fuchigami (1981) aclimatizando plantas de manzano, a bajas humedades relativas (30 a 40%), durante 4 ó 5 días, encontraron respuestas similares al anterior trabajo, ya que hubo una correlación altamente significativa entre el porcentaje de pérdida de agua y el porcentaje de estomas abiertos, de acuerdo a los dos tipos de plantas evaluadas (obtenidas *in vitro* e invernadero), indicando que la velocidad del cierre de estomas se incrementó con la duración de la exposición a dicha humedad relativa, ya que menos del 20% de estomas cerraron cuando las hojas se expusieron de 0 a 4 días, mientras que las expuestas en un lapso de 5 y 6 días obtuvieron un cierre del 81% después de 15 minutos del corte; manifiestan también que el daño causado por la pérdida de agua en las plantas recientemente transferidas a condiciones de invernadero, provoca la producción de etileno de forma mucho más temprana que en las plantas aclimatizadas en invernadero. La producción de etileno puede indicar la proximidad a la muerte total de las células bajo agobio, ya que a medida que aumenta el daño por deshidratación, la concentración de etileno decrece y la de etano aumenta incrementándose

también la rotura de las membranas celulares, así como su permeabilidad (Kobayashi *et al.*, 1981).

También se ha observado que las plantas micropropagadas difieren anatómicamente de las plantas que han sido propagadas convencionalmente, bajo condiciones de invernadero. Al respecto, se han hecho varias investigaciones examinando la estructura anatómica de las hojas, y se ha observado por ejemplo, que las hojas de *Prunus insitia* obtenidas *in vitro*, tienen células de empalizada más pequeñas, espacios intercelulares más grandes y más bajas frecuencias estomáticas, comparadas con hojas transplantadas. Tal anatomía de las hojas es característica de hojas que crecieron en altas humedades relativas (Brainerd *et al.*, 1981). También se ha visto que se presenta una cantidad de cera epicuticular menor en las hojas e incluso pueden carecer de ella (Fuchigami *et al.*, 1981). El desarrollo de la superficie cerosa en las plantas micropropagadas, ha sido considerado como un factor primordial para que las plantas sobrevivan y logren su aclimatización en un menor tiempo (Brainerd y Fuchigami, 1981; Brainerd *et al.*, 1981). Estudios al microscopio electrónico han revelado una considerable reducción o ausencia de cera epicuticular sobre las hojas de plántulas producidas *in vitro* (Conner y Thomas, 1982). Observaciones con *Brassica oleracea* var. Botrytis, también estuvieron asociados con un incremento en peso de cera epicuticular y el ángulo del agua y un decremento en las tasas de pérdida de agua de los tejidos de las plantas. Debido a que los componentes de la cutícula determinan la velocidad y extensión de la difusión del agua a través de la cutícula. La extrema susceptibilidad de plantas de cultivo *in vitro* para marchitarse en el transplante, fue



inicialmente atribuido a una severa reducción durante el cultivo en la formación de cera epicuticular y posiblemente una deficiencia de cera en la cutícula (Grout y Aston, 1977; citados por Conner y Thomas, 1982). Sin embargo, esto ha sido tema de discusión y Conner y Thomas (1982) manifiestan que la rápida marchitez de hojas del cultivo *in vitro* inmediatamente después del trasplante, puede ser atribuido a la inhabilidad de sus estomas a cerrar antes que a la reducción en componentes de cera de la cutícula de las hojas. Esto es debido a que las cutículas de las hojas son primariamente efectivas para controlar la pérdida de agua solamente después del cierre estomatal; así, probablemente la razón por la cual las plantas tienen estomas inactivos y pobre desarrollo cuticular tenga relación con el medio ambiente y los reguladores del crecimiento del medio de cultivo (Conner y Thomas, 1982).

Para obtener una buena sobrevivencia de plantas que se transfieren a suelo, Anderson (1980) indica que en esta etapa se deben considerar como factores importantes al ambiente, recipiente y mezclas de suelo utilizadas.

Por otro lado, Conner y Thomas (1982) manifiestan que para seguir manteniendo la turgencia de las plántulas y que ésta no se pierda, (para que el crecimiento no disminuya, ni la sobrevivencia) hay que considerar los factores medioambientales más importantes como humedad, temperatura y luz.

De esta manera, al momento del trasplante hay que tener en cuenta la humedad, como uno de los factores a cuidar, para controlar la elevada transpiración que sufren las plántulas que salen de los tubos.

Damiano (1980) menciona que se requiere de una humedad relativa mínima del 90% durante los primeros 15 días, después del trasplante. La alta humedad puede ser mantenida con el uso de la nebulización (Conner y Thomas, 1982), considerando que cuando las plantas se mueven de esta condición, hay que dar atención a la irrigación subsecuente (Dunstan, 1982). El rocío a las plantas con antitranspirantes y/o ceras inmediatamente después del trasplante, puede también ayudar a reducir el marchitamiento y promover sobrevivencia y puede, para algunos casos, superar la necesidad de cámaras con nebulización (Conner y Thomas, 1982). Otra buena opción, en algunos casos, es la cubierta de polietileno transparente. En un trabajo donde se probó el efecto de la nebulización y cubierta de polietileno transparente en la sobrevivencia de plantas de ciruelo y fresa, obtenidas *in vitro*, después de 60 días al trasplante, se observó que el mejor microambiente se logró con la cubierta de polietileno transparente con 74% y 85% de sobrevivencia, para ciruelo y fresa, respectivamente (Arellano y González, 1985). Estos autores también estudiaron el efecto del tipo de recipiente sobre las especies de frutales antes mencionadas, los recipientes estudiados fueron charola, vaso y semillero; los recipientes que mayor porcentaje de sobrevivencia consiguieron, fueron la charola para fresa con 80% y semillero para ciruelo con 83%.

Por otra parte, la naturaleza de la mezcla de suelo usada para el trasplante, puede influenciar las tasas de sobrevivencia y subsecuentemente el crecimiento y esta mezcla parece diferir según las diferentes especies, aunque es razonable esperar que la mezcla de suelo en la cual una especie crece por propagación convencional puede ser

adecuada para usarse en el trasplante de cultivo de tejidos. Para ayudar a las plantas en su aclimatización a las mezclas de suelo, deben ser plantadas asépticamente en los vasos de cultivo conteniendo suelo esterilizado por un corto período (Conner y Thomas, 1982). Se han usado varias de las mezclas más comunes para colocar los brotes enraizados, aunque la principal o más usada es una mezcla de turba, perlita y arena en proporción 3:4:1. Esta mezcla provee el soporte y drenaje necesario para el crecimiento de la planta reduciendo las condiciones para el crecimiento de hongos (Dunstan, 1982). Esto es muy importante, porque quizá uno de los factores más grandes que afectan la sobrevivencia, son las enfermedades, que comúnmente aparecen por la alta humedad, induciendo la infestación por hongos, principalmente. Aunque las plantas pueden tener alguna capacidad genética para resistir enfermedades cuando son removidas del cultivo, su tamaño pequeño, cutículas pobremente desarrolladas y sus tejidos inmaduros; hacen que sean muy susceptibles a ataques de patógenos, por lo que desinfectar las mezclas de suelo y recipientes para la buena sanidad son importantes (Conner y Thomas, 1982). Dunstan en 1982, propone una pasteurización con vapor o fumigación del suelo con Basamid (B.A.S.F., Ontario), seguido por una adecuada higiene al transplantar en el área de crecimiento, lo que podría reducir significativamente el problema. También el uso de sprays diluidos o aplicaciones de fungicidas, pueden controlar problemas de este tipo (Dunstan, 1982; Conner y Thomas, 1982). Hay que tener cuidado también en no dejar el gel, cuando se usa en el medio de cultivo para enraizamiento, alrededor de las raíces, porque aún cuando éste ayuda a reducir el estrés de los brotes cuando se transplantan, sus constituyentes orgánicos inducen una

rápida colonización de microorganismos que pueden acarrear severos problemas asociados con la humedad en los tejidos tiernos de las raíces de las plántulas, por lo que se recomienda que todo el medio se lave de las raíces (Conner y Thomas, 1982).

Las hepáticas y musgos, también han dado problemas en los recipientes y cajas donde crecen las plántulas; al respecto se han usado algunos productos químicos en el vivero, así como también se han probado metales pesados como: Cu, Zn y Fe, y se ha observado que estas medidas de control dañan las plántulas, por lo que se tiene sin solución este problema (Smith, 1982).

Con respecto a la temperatura, Murashige (1974) sugiere que un régimen de temperaturas es necesario en este estado (establecimiento a suelo) para evitar la dormancia después del trasplante. Como la mayoría de las plantas manifiestan óptimo crecimiento a temperaturas moderadas, entre aproximadamente 20 y 27°C, tales condiciones son recomendables cuando se hace el trasplante (Donnan *et al.*, 1978, citado por Conner y Thomas, 1982). Muy altas o muy bajas temperaturas y/o fluctuaciones drásticas pueden causar crecimiento irregular. El desarrollo de las raíces puede ser acelerado por el uso de calor en la base o fondo, especialmente cuando la temperatura ambiental es baja. Cuando se usan cámaras de humedad, la temperatura dentro de ellas puede elevarse, sobre todo cuando hay altas intensidades luminosas y la temperatura medioambiental es alta; y entonces para solventar este problema se recomienda la ventilación de estos lugares (Conner y Thomas, 1982).

Es conocido, que plantas recientemente trasplantadas manifiestan mejor crecimiento y más altas tasas de sobrevivencia, si son inicialmente colocadas bajo poca luz y gradualmente movidas a intensidades más altas (Conner y Thomas, 1982). Arellano y González (1985), estudiaron la intensidad de la luz sobre la sobrevivencia y crecimiento de plantas de fresa y ciruelo mirabolano, obtenidas *in vitro*, probaron tres tipos de fuente luminosas (fuente natural, fuente natural más lámparas incandescentes y lámparas fluorescentes). La fuente natural de luz fue la que consiguió mayor porcentaje de supervivencia aunque fue estadísticamente igual con el tratamiento de luz de lámparas incandescentes en ambas especies, después de 60 días del trasplante.

Por último, hay que considerar que cuando se inducen raíces sobre los brotes cultivados *in vitro*, es recomendable no dejar crecer las raíces muy largas, porque este incremento en su longitud crea la posibilidad de dañarlas durante el trasplante, muriendo frecuentemente en este paso y nuevas raíces deben entonces desarrollarse *in vivo*, si las plántulas sobreviven. Cuando el enraizamiento *in vitro* es necesario, es preferible trasplantar los brotes, justo después de la iniciación de raíces y antes de su elongación (Conner y Thomas, 1982).

## 7. Enraizamiento en suelo

Las dificultades asociadas con la sobrevivencia y crecimiento de plantas cultivadas *in vitro* después del trasplante, debido al pobre control de pérdida de agua de las plantas y su necesidad para

cambio de nutrición heterotrófica a fotoautotrófica, son aspectos que han sido discutidos y crean la posibilidad del trasplante directamente del estado II (proliferación) y enraizamiento *in vivo* (Conner y Thomas, 1982). Así los brotes obtenidos *in vitro* pueden ser tratados como estacas, de tal manera que se sumen las ventajas de la propagación *in vitro* y la convencional. Por ejemplo, Pool y Conover (1983) manifiestan que los tejidos de las raíces de las plantas micropropagadas, pueden estar menos aclimatizadas que las raíces de las plantas propagadas por estacas, aún seis semanas después del trasplante. Algunos otros problemas, ya mencionados, que surgen con el establecimiento a suelo de las plántulas, pueden ser tal vez reducidos por una adecuada metodología de enraizamiento en suelo. Sin embargo, aún cuando es posible trasplantar una especie del estado II, un corto período del estado III (Enraizamiento y establecimiento en suelo), puede no solamente incrementar las tasas de sobrevivencia, sino también mejorar marcadamente el vigor de las plantas y uniformidad de su crecimiento. Además, con otras especies no es posible el trasplante directamente del estado II, y el paso III se hace obligatorio, todo esto dependiendo básicamente de la especie en cuestión (Conner y Thomas, 1982).

El trasplante del estado II, incluye el enraizamiento de brotes individuales después de su remoción del cultivo de tejidos, y esto por tratamiento como microestacas de madera suave considerando como factores importantes la humedad, la mezcla de suelo, temperatura, luz y sanidad. Sucesivo enraizamiento y crecimiento de los brotes (obtenidos *in vitro*) en estas condiciones, ha sido logrado en una amplia

variedad de especies. En varias de ellas el pretratamiento de las bases de los brotes, con auxinas ha promovido el enraizamiento. Sin embargo, tal tratamiento puede ocasionar en algunos casos toxicidad a los delicados tejidos de las plántulas. Por lo que se ha recomendado que brotes con hojas y tallos frágiles, sean pretratados con una solución de auxinas antes de trasplantarlos o bien plantarlos directamente en un sustrato artificial previamente saturado con la solución de auxinas (Conner y Thomas, 1982).

Con base en esto, han empezado a surgir trabajos con diversas especies. Pyott y Converse (1981) llevaron brotes sin enraizar de frambuesa, del estado de proliferación, de 5 mm o más de altura, al invernadero; las bases de los brotes fueron polveadas con un enraizador comercial que contenía 0.1% de AIB y fueron plantados en arena pasteurizada bajo humedad intermitente (30 seg cada 15 min) durante las horas con luz del día. También colocaron brotes en un medio de cultivo para enraizar, en condiciones asépticas que contenía de 1 a 2 mg/l de AIB. Los resultados fueron un mejor enraizamiento (10 de 13 brotes de frambuesa) en el invernadero, con un desarrollo de sistema radical vigoroso, después de cada semana; en cambio, el enraizamiento *in vitro* fue muy limitado, ya que sólo enraizaron 8 de 34 brotes tratados. Lydiane y Kyte (1982) en diversos estudios manifestaron que se ha observado que al parecer una mezcla de suelo compacta en cajas, promueve más raíces en menor tiempo.

Brotes proliferados *in vitro* de zarzamora sin espinas (*Rubus* sp.), fueron tratados con Rootone F y llevados a macetas Jiffy-7, y otros directamente a suelo pasteurizado y cubiertos con polietileno

por varios días para prevenir la desecación; encontrando que solo 1 de los 23 brotes llevados a macetas Jiffy-7 sobrevivieron a la transferencia, en tanto que 15 de los 21 brotes plantados directamente en suelo sobrevivieron (Skirvin *et al.*, 1981).

Brotos de manzano M.26 fueron tratados únicamente 5 días en un medio de cultivo para enraizamiento, conteniendo  $10\ \mu\text{M}$  de AIB más  $10^{-4}\text{M}$  de Floroglucinol, y en obscuridad, después de los cuales fueron establecidos en turba (Jiffy-9) o en una mezcla de perlita y turba en el invernadero. Las plantas del Jiffy-9 crecieron mejor y más uniformemente que las plantas de una mezcla de perlita y turba, obteniéndose un porcentaje de sobrevivencia de alrededor del 90%, con esto la eliminación de un medio de cultivo sin reguladores, en donde desarrollan las raíces inducidas en el medio de enraizamiento, es posible; sustituyéndolo por una mezcla de suelo apropiado en el invernadero (Welander, 1983).



## OBJETIVOS

Considerando los factores que afectan el enraizamiento y sobrevivencia de los brotes obtenidos por la técnica del cultivo *in vitro*, en el presente trabajo se plantearon los siguientes objetivos:

1. Determinar el efecto de diferentes concentraciones de Acido Indolbutírico sobre la inducción de raíces y crecimiento de los brotes de los portainjertos MM.106 y M.9.
2. Observar el efecto del pH del medio de cultivo sobre la emergencia de raíces adventicias de brotes de los dos portainjertos.
3. Determinar el efecto de la etiolación sobre la capacidad de enraizamiento de los brotes.
4. Observar si existen diferencias en la capacidad de enraizamiento entre los patrones utilizados.
5. Determinar si existe la posibilidad de sustituir el medio libre de reguladores del crecimiento, por una mezcla de suelo para el desarrollo de las raíces inducidas anteriormente.
6. Determinar la capacidad de sobrevivencia de los brotes, cuando se transfieren a condiciones no asépticas, bajo una atmósfera con alta humedad relativa.

## MATERIALES Y METODOS

### 1. Material vegetativo

Se utilizaron brotes de los portainjertos de manzano MM.106 y M.9, cuyas características principales son las siguientes:

Malling Merton 106 (MM.106). Fue obtenido a partir de la cruce Northern Spy X M-1, y se trata de un portainjerto semienanizante, pues produce árboles de aproximadamente la mitad del tamaño, en relación a plantas injertadas sobre portainjertos francos; posee un hábito de crecimiento erecto y vigoroso y no produce hijuelos; induce producción precoz y abundante que se mantiene durante muchos años; presenta buen anclaje y tiene una adaptación muy amplia a tipos de suelos, pero prefiere los francos con un pH de 6.5 a 7.5; es resistente al pulgón lanígero (*Eriosoma lanigerum*), pero en algunas ocasiones ha mostrado susceptibilidad al ataque de agalla de la corona (*Agrobacterium tumefaciens*). Es muy utilizado para huertos intensivos y seperiintensivos (Alvarez, 1974; Hartmann y Kester, 1980).

Malling 9 (M.9). Es uno de los portainjertos más enanizantes, pues raramente alcanza una altura mayor de 2.7 m, cuando adultos; generalmente empiezan a producir al primero o segundo año después de plantados; es incompatible con algunos cultivares de manzano; inducen crecimiento y madurez del fruto tempranos; tiene numerosas raíces gruesas y quebradizas;

requiere de suelos fértiles, con pH de 6.5 a 7.5; es moderadamente resistente a las bajas temperaturas y a la pudrición de la corona - - (*Phytophthora* sp.) pero susceptible a la agalla de la corona - - - (*Agrobacterium tumefaciens*). Tiene mucha demanda para huertos con altas densidades (Brooks y Olmo, 1972; Hartmann y Kester, 1980).

## 2. Medios de cultivo

Se utilizaron brotes proliferados *in vitro* en un medio basal de Murashige y Skoog, (1962) el cual se presenta en el Cuadro 1, suplementado con 1 mg/l de Tiamina, 100 mg/l de Mioinositol, 1.5 mg/l de Benciladenina (BA), 0.1 mg/l de Acido Indolbutírico (AIB), 30 g/l de sacarosa y 5.5 g/l de agar, el pH se ajustó a 5.5 antes de la esterilización.

Para la inducción de raíces se utilizaron los medios especificados en el Cuadro 2. en los cuales son de notarse las diferencias en concentración de AIB y niveles de pH.

## 3. Diseño Experimental

Para el desarrollo del trabajo se utilizó un diseño experimental completamente al azar con un arreglo de tratamientos factorial, en donde los factores de estudio fueron concentración de AIB y nivel de pH. Para cada uno de los factores se usaron tres niveles, lo que produjo un total de nueve tratamientos (especificados en el Cuadro 2), los cuales se aplicaron para ambos portainjertos, sobre brotes etiolados y sin etiolar.

Cuadro 1. Sales orgánicas de Murashige y Skoog, utilizadas en la propagación *in vitro* de los portainjertos de manzano MM.106 y M.9

Reactivos	(mg/l)
<b>1. <u>Nitratos:</u></b>	
$\text{NH}_4\text{NO}_3$	1,650
$\text{KNO}_3$	1,900
<b>2. <u>Sulfatos:</u></b>	
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	370
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	22.3
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	8.6
$\text{CuSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.025
<b>3. <u>Halógenos:</u></b>	
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	440
KI	0.83
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.025
<b>4. <u><math>\text{PO}_4 \cdot \text{BO}_3 \cdot \text{MoO}_4</math>:</u></b>	
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	170
$\text{H}_3\text{BO}_3$	6.2
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.25
<b>5. <u>Na Fe EDTA:</u></b>	
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	27.8
$\text{Na}_2 \cdot \text{EDTA}$	37.3

Cuadro 2. Medios de cultivo utilizados para la inducción de raíces en brotes de los portainjertos de manzano MM.106 y M.9

Componente	Cantidad utilizada por litro de medio								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Sales M.S.	50%	50%	50%	50%	50%	50%	50%	50%	50%
Tiamina	1.0 mg	1.0 mg	1.0 mg	1.0 mg	1.0 mg	1.0 mg	1.0 mg	1.0 mg	1.0 mg
Mioinositol	100.0 mg	100.0 mg	100.0 mg	100.0 mg	100.0 mg	100.0 mg	100.0 mg	100.0 mg	100.0 mg
AIB	0.1 mg	0.2 mg	0.3 mg	0.1 mg	0.2 mg	0.3 mg	0.1 mg	0.2 mg	0.3 mg
Floroglucinol	160.0 mg	160.0 mg	160.0 mg	160.0 mg	160.0 mg	160.0 mg	160.0 mg	160.0 mg	160.0 mg
Sacarosa	20.0 g	20.0 g	20.0 g	20.0 g	20.0 g	20.0 g	20.0 g	20.0 g	20.0 g
pH	5.0	5.0	5.0	5.5	5.5	5.5	6.0	6.0	6.0

Se establecieron 20 repeticiones por tratamiento y cada unidad experimental consistió de un tubo con un brote.

#### 4. Desarrollo del trabajo bajo condiciones asépticas

Con la finalidad de observar el efecto de la etiolación sobre el enraizamiento de los brotes, se colocaron 200 brotes del medio de proliferación en obscuridad para la etiolación de los mismos, la cual se logró paulatinamente a partir de las cuatro semanas de permanecer bajo esta condición. Los brotes no etiolados o verdes, permanecieron en el mismo medio en el cuarto de incubación a  $25^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ , con luz fluorescente y con fotoperíodo de 16 horas.

Una vez que los brotes, verdes o etiolados, alcanzaron una altura de 1 a 4 cm, se transfirieron a los medios líquidos para inducción de raíces, los cuales antes de su esterilización se distribuyeron en tubos de ensaye de 1 x 10 ó 1.5 x 15 cm, vertiendo un ml de medio en cada tubo, para después taparlos perfectamente con papel aluminio o tapón con rosca. Antes de que los brotes se transfirieran a este medio, se les hizo una incisión de aproximadamente un mm de largo, que iba en dirección de la base al ápice, con el fin de incrementar el área de absorción y facilitar la emisión de raíces adventicias. De esta manera los brotes permanecieron únicamente 7 días en el cuarto de incubación, bajo las condiciones de luz y temperatura ya mencionadas. Cabe aclarar que todo este procedimiento se hizo por igual para ambos portainjertos.

## 5. Desarrollo del trabajo en condiciones no asépticas

Después de transcurridos siete días, en los cuales los brotes permanecieron en el medio de inducción de raíces, estos fueron transferidos a vasos de unisel, usando como sustrato una mezcla de tierra de monte y arena, en proporción 3:1 v/v, respectivamente, la cual fue previamente pasteurizada. Antes de establecer los brotes en el suelo, se les dió un baño con una solución de Captán, para evitar la infestación por hongos. Inmediatamente después se transfirieron a los vasos, previa anotación de los datos de altura del brote y número de hojas, éstos se colocaron en una cámara de nebulización (5 segundos cada 15 minutos) durante un período de 30 días, después de los cuales los brotes se extrajeron con cuidado de los vasos y se les tomó el número y tamaño de raíces, así como longitud del brote y número de hojas, estableciéndolos finalmente en bolsas negras de polietileno, utilizando el sustrato ya especificado.

## 6. Toma de datos

La toma de datos se hizo con base a las siguientes variables:

A) Antes del establecimiento a suelo (Después de 7 días en condiciones asépticas)

1. Longitud de brotes
2. Número de hojas por brote

B) Después del establecimiento en suelo (Después de 30 días en condiciones no asépticas)

1. Supervivencia (en porcentaje)
2. Longitud de brotes
3. Número de hojas por brote
4. Número de brotes con raíces (en porcentaje)
5. Número de raíces por brote
6. Longitud de raíces

#### 7. Análisis de los datos obtenidos

Para cada una de las variables se corrió un análisis de varianza y se obtuvieron las correlaciones, medias y porcentajes pertinentes.

Para el análisis de medias se corrió el procedimiento (expresado por Martínez, 1980) de medias mínimo-cuadráticas, utilizado para diseños desbalanceados, ya que aunque al establecer el experimento se tenían 20 repeticiones, la muerte de los brotes en el transcurso del mismo, creó un desbalance en el número de observaciones, lo que impidió obtener otro tipo de medias múltiples.

Cabe aclarar que para el análisis de los datos, primeramente se corrió un trabajo general, sin considerar los portainjertos en forma separada, pero viendo el desbalance que existía entre las observaciones de los mismos, se decidió correr un análisis por separado para cada uno de los portainjertos, ya que de lo contrario no sería real el análisis y la diferencia entre portainjertos ocultaría los



efectos de los tratamientos establecidos.

Además, en lo que se refiere al efecto de la etiolación, no fue posible realizar ningún tipo de análisis, debido a que no se obtuvieron datos, ya que todos los brotes de los tratamientos establecidos se pusieron necróticos y murieron al poco tiempo de establecerlos en el medio de inducción de raíces.

## RESULTADOS

### 1. Portainjerto MM.106

#### 1.1 Longitud de brotes

Al realizar el análisis de varianza, no se encontraron diferencias estadísticas (Apéndice A) en la longitud de los brotes, antes y después de establecer las plantas en condiciones de suelo, por efecto de pH y concentraciones de AIB. Sin embargo, es de notarse que para la concentración de 0.2 mg/l de AIB y pH de 5.0 los brotes mostraron una ligera reducción en su longitud después de haber permanecido en suelo, lo que no sucedió con los brotes de las otras concentraciones de AIB y niveles de pH, los cuales manifestaron un ligero incremento (Cuadro 3).

Por otro lado, el análisis de varianza indica que no hubo interacción entre las concentraciones de AIB y niveles de pH (Apéndice A) sobre la longitud de los brotes antes y después de establecidos en suelo.

#### 1.2 Número de hojas

En análisis de varianza para esta variable indica que no hubo diferencias estadísticas (Apéndice A) dentro de los niveles de pH y concentraciones de AIB, antes y después de establecidos los brotes

en el suelo. No obstante, se observó una tendencia general hacia una disminución de hojas cuando los brotes permanecieron en suelo (Cuadro 3).

Para esta variable, igual que la del caso anterior, tampoco hubo significancia estadística (Apéndice A) en la interacción entre los dos factores de estudio (concentración de AIB y niveles de pH).

Cuadro 3. Efecto del Acido Indolbutírico y pH sobre la longitud de brotes y número de hojas del portainjerto MM.106, antes y después del establecimiento en suelo

Concentración de AIB (mg/l)	Longitud de brotes (cm)		Número de hojas	
	Antes	Después	Antes	Después
0.1	1.738	1.748	7.095	5.507
0.2	1.678	1.598	8.134	5.839
0.3	1.767	1.814	7.129	6.613
pH				
5.0	1.736	1.656	7.119	5.895
5.5	1.827	1.859	7.924	6.525
6.0	1.620	1.645	7.316	5.539

### 1.3 Número de raíces

En el análisis de varianza para esta variable se encontraron diferencias significativas entre las concentraciones de AIB, y altamente significativas entre los niveles de pH (Apéndice A).

La comparación de medias mínimo-cuadráticas, indica que con respecto a las concentraciones de AIB; al usar 0.3 mg/l se obtuvo el mayor número de raíces (4.391) siendo éste estadísticamente diferente de los obtenidos con 0.1 y 0.2 mg/l, los cuales presentaron 2.555 y 2.317 raíces por brote, respectivamente (Cuadro 4).

Para los niveles de pH la misma comparación de medias, manifiesta diferencias altamente significativas, obteniéndose el mayor número de raíces con pH de 5.5 (4.505) el cual fue estadísticamente igual al número obtenido con pH de 5.0 (2.853), el que a su vez es igual al del pH de 6.0 (1.905), siendo este último el que presentó menor número de raíces por brote (Cuadro 4). Por otra parte, el análisis de varianza no manifiesta interacción entre las concentraciones de AIB y los niveles de pH. para la variable en cuestión (Apéndice A).

### 1.4 Longitud de raíces

En este caso el análisis de varianza no mostró diferencias significativas dentro de los niveles de pH y concentraciones de AIB (Apéndice A). Sin embargo, en el Cuadro 4, se puede observar que la mayor longitud de raíces, fue la obtenida con 0.3 mg/l de AIB, con una tendencia a disminuir conforme disminuyó la concentración de la auxina.

Con respecto al pH, el mayor tamaño de raíces se logró con un nivel de 5.0, observándose que a medida que aumentó el pH, la longitud de las raíces sufrió una ligera reducción (Cuadro 4).

De igual manera, que en la variable anterior (No. de raíces) tampoco hubo interacción entre los dos factores de estudio, ya que no se manifestó significancia en el análisis de varianza (Apéndice A).

Cuadro 4. Efecto del Acido Indolbutírico y pH sobre el número y longitud de raíces del portainjerto MM.106

Concentración de AIB (mg/l)	Número de raíces	Longitud de raíces (cm)
0.1	2.555 b	1.616 a
0.2	2.317 b	1.754 a
0.3	4.391 a	2.320 a
pH		
5.0	2.853 ab	2.103 a
5.5	4.505 a	2.070 a
6.0	1.905 b	1.516 a

#### 1.5 Porcentajes de enraizamiento y sobrevivencia

En la Figura 1 se puede observar que los mayores porcentajes de enraizamiento y sobrevivencia se obtuvieron con 0.1 mg/l de AIB, siendo

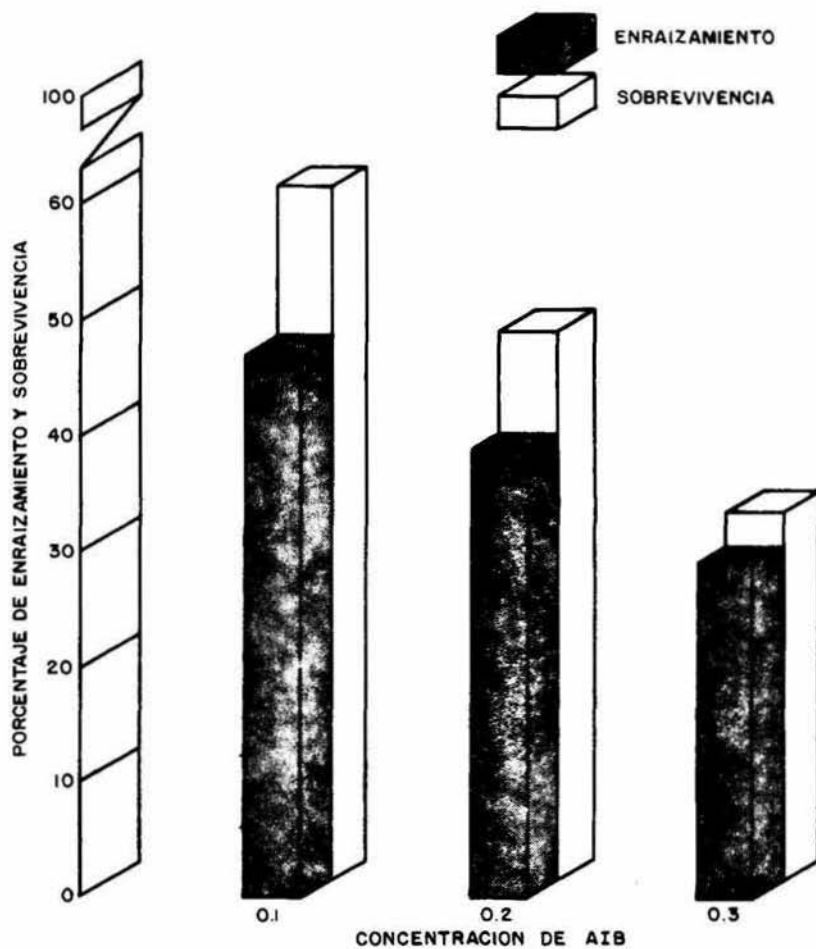


Fig. 1. Efecto del Acido Indolbutírico sobre los porcentajes de enraizamiento y sobrevivencia de los brotes del portainjerto MM.106, en condiciones de suelo.

de 47.46% para el primer caso y 61.02% para el segundo, además se manifestó una tendencia de disminución de ambos porcentajes conforme aumentó la concentración de la auxina.

En lo referente al pH, en la Figura 2 se observa que los mayores porcentajes de enraizamiento (55.93%) y sobrevivencia (62.71%) se obtuvieron con pH de 5.5, siguiéndose en orden decreciente el pH de 6.0 (32.20% de enraizamiento y 42.37% de sobrevivencia), y por último el pH de 5.0 (27.27% y 36.36% de enraizamiento y sobrevivencia, respectivamente).

Por último en la Figura 3, se manifiestan los porcentajes de ambas variables por tratamiento usado, obteniéndose los valores más altos (un 70% de enraizamiento y 80% de sobrevivencia) con el tratamiento que contenía 0.1 mg/l de AIB y 5.5 de pH, pudiéndose percatar de que para las tres concentraciones de auxina, el mejor pH fue de 5.5, aunque en general, los porcentajes disminuyeron conforme aumentó la concentración de AIB.

## 1.6 Correlaciones

Se encontraron altas correlaciones entre las variables longitud de brotes antes y después del establecimiento a suelo, así como entre la longitud de brotes antes del establecimiento en suelo y número de raíces. También se encontró correlación significativa entre el número de hojas antes y después del establecimiento a suelo. Otra correlación significativa fue la del número de raíces con la longitud de brotes y número de hojas después de establecidos los brotes en suelo y

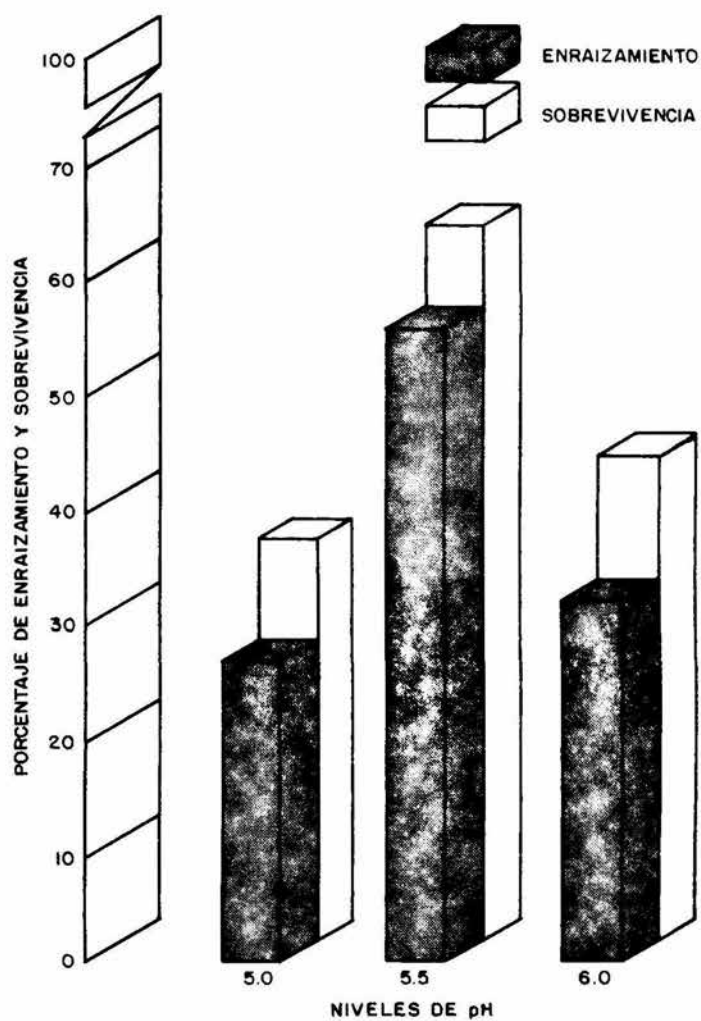


Fig. 2. Efecto del pH sobre el porcentaje de enraizamiento y sobrevivencia de los brotes del portainjerto MM.106, en condiciones de suelo.



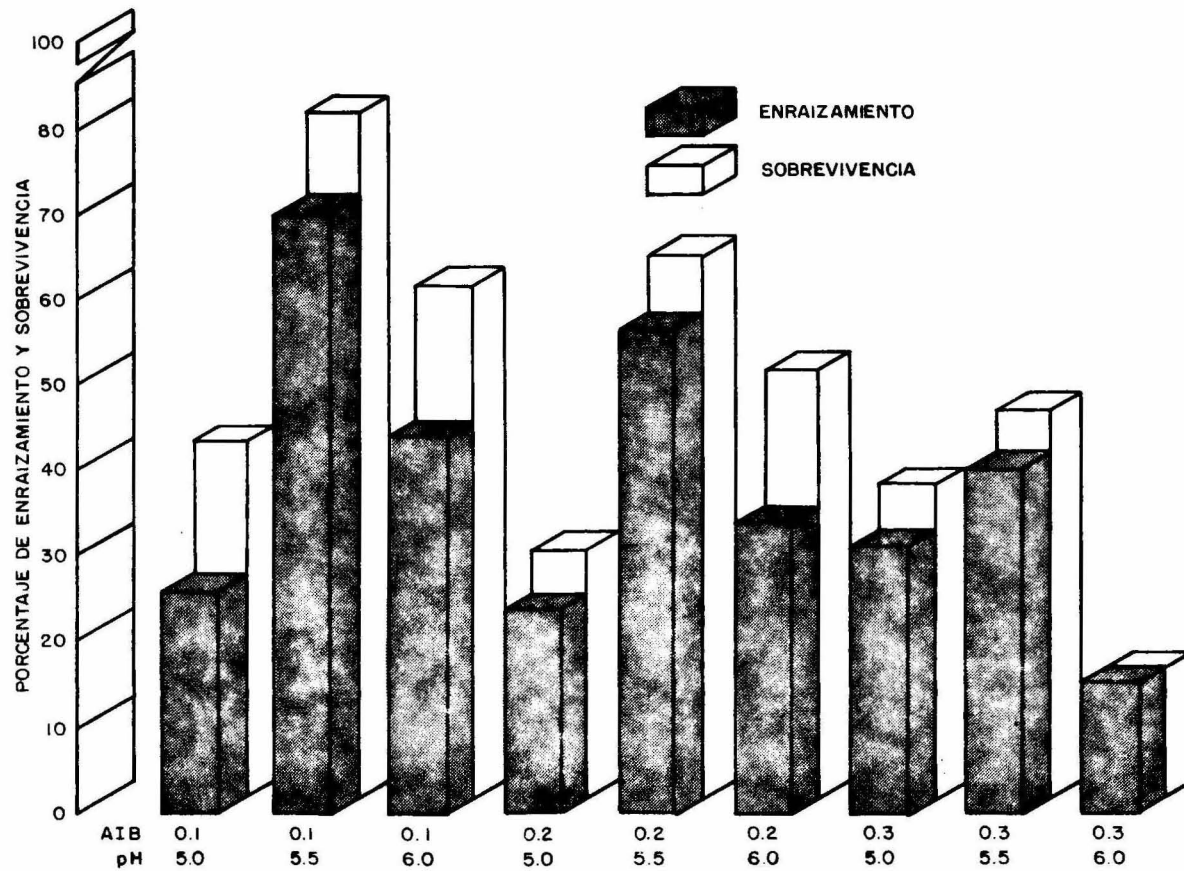


Fig. 3. Efecto de la interacción del Acido Indolbutírico y pH sobre el porcentaje de enraizamiento y sobrevivencia de los brotes del portainjerto MM.106, en condiciones de suelo.

esta última variable a su vez, estuvo correlacionada con la longitud de raíces (Cuadro 5).

Cuadro 5. Coeficientes de correlación de Pearson para el portainjerto MM.106

	LB <sub>1</sub>	NH <sub>1</sub>	LB <sub>2</sub>	NH <sub>2</sub>	NR	LR
LB <sub>1</sub>	1.0000	0.0291	0.8504**	0.2016	0.2307**	0.1399
NH <sub>1</sub>		1.0000	0.0051	0.2721*	0.0670	0.1215
LB <sub>2</sub>			1.0000	0.1289	0.2230*	0.0770
NH <sub>2</sub>				1.0000	0.4719**	0.4152**
NR					1.0000	0.0513
LR						1.0000

**Variables correlacionadas:**

LB<sub>1</sub> : Longitud de brotes antes del establecimiento en suelo

NH<sub>1</sub> : Número de hojas antes del establecimiento en suelo

LB<sub>2</sub> : Longitud de brotes después del establecimiento en suelo

NH<sub>2</sub> : Número de hojas después del establecimiento en suelo

NR : Número de raíces después del establecimiento en suelo

LR : Longitud de raíces después del establecimiento en suelo

\* Significativo con P = 0.05

\*\* Significativo con P = 0.01

## 2. Portainjerto M.9

### 2.1 Longitud de brotes

Al realizar el análisis de varianza, se encontraron diferencias altamente significativas entre las concentraciones de AIB y niveles de pH, en la longitud de los brotes antes de su establecimiento en suelo, lo cual no se manifestó después de su permanencia en éste (Apéndice A).

En la comparación de medias se encontró que el mayor tamaño de brotes (2.145 cm), se alcanzó con 0.3 mg/l de AIB, siendo este valor estadísticamente igual al obtenido con la concentración de 0.1 mg/l (2.012 cm) y diferente al de 0.2 mg/l (1.839 cm), valor mínimo alcanzado entre las tres concentraciones de la auxina. Además, se puede observar que el tamaño de los brotes antes del establecimiento en suelo, fue ligeramente mayor en relación a cuando permanecieron en el mismo (Cuadro 6).

Con respecto al pH, en el Cuadro 6 se observa que el nivel de 5.5 fue el que tuvo mayor efecto sobre esta variable, alcanzándose una longitud de 2.317 cm, valor que resultó ser estadísticamente diferente a los obtenidos con los otros dos niveles (1.905 cm para el de 5.0 y 1.775 cm para el de 6.0), siendo éstos estadísticamente iguales entre sí. Comparando estos valores con los obtenidos después del establecimiento en suelo, también se observó una ligera disminución en el tamaño de brotes en esta condición, para los niveles de pH de 5.0 y 5.5.

En este caso, se encontró significancia estadística en la interacción entre los dos factores de estudio, para los brotes antes de establecerlos en suelo (Apéndice A).

La prueba de comparación de medias, indica que el tratamiento que contenía 0.3 mg/l de AIB y pH de 5.5 fue superior (2.520 cm) en relación al de 0.2 mg/l de AIB y pH de 6.0 (1.381 cm). El resto de los tratamientos presentaron un comportamiento intermedio entre los valores antes mencionados, lo cual se expresa en el Cuadro 7.

Cuadro 6. Efecto del Acido Indolbutírico y pH sobre la longitud de brotes y número de hojas del portainjerto M.9, antes y después del establecimiento en suelo

Concentración de AIB (mg/l)	Longitud de Brotes (cm)		Número de hojas	
	Antes	Después	Antes	Después
0.1	2.012 ab*	1.772 a	7.683 a	3.555 b
0.2	1.839 b	1.700 a	8.237 a	5.301 ab
0.3	2.145 a	2.108 a	8.685 a	7.065 a
pH				
5.0	1.905 b	1.654 a	7.350 b	4.904 a
5.5	2.317 a	2.032 a	8.733 a	6.191 a
6.0	1.775 b	1.894 a	8.522 a	4.824 a

\* Valores con la misma letra son estadísticamente iguales ( $P \leq 0.05$ ) de acuerdo a las medias mínimo-cuadráticas.

## 2.2 Número de hojas

para esta variable el análisis de varianza indica que no hubo efecto de las concentraciones de AIB, antes de establecidos los brotes en suelo; sin embargo, después de establecidos hay una diferencia altamente significativa entre concentraciones; sucediendo lo contrario para los niveles de pH, ya que para los brotes antes de establecidos hubo diferencias significativas entre ellos, lo que no sucedió después de que permanecieron en suelo (Apéndice A).

Después de establecidos los brotes en suelo, se observó que el mayor número de hojas se logró con 0.3 mg/l de AIB (7.065), reduciéndose éste conforme disminuyó la concentración. Además, conviene aclarar que en este caso, el número de hojas por brote, también fue menor después de establecidas las plantas en suelo, en relación a antes de su establecimiento (Cuadro 6).

Para las medias de los niveles de pH antes de establecer los brotes en suelo, el valor más alto obtenido (8.733), fue el de pH de 5.5, el cual resultó ser estadísticamente igual al nivel de 6.0 (8.522), pero diferentes ambos del obtenido con pH de 5.0 (7.350), diferencias que no se manifiestan para los brotes ya establecidos en suelo. Sin embargo, en este caso, se nota que el máximo valor de hojas (6.191), correspondió al mismo nivel de pH anterior. Al igual que para el factor anterior (AIB), aquí también se observó una disminución en el número de hojas de los brotes cuando permanecieron en suelo ( Cuadro 6).

Por otro lado, el análisis de varianza manifestó significancia en la interacción de los factores, para esta variable, antes del establecimiento en suelo (Apéndice A).

Comparando las medias de los tratamientos, se encontraron diferencias estadísticas, presentando el mayor número de hojas (9.950) los brotes del medio que contenía 0.3 mg/l de AIB y pH de 5.5, valor que es diferente del obtenido con 0.1 mg/l de AIB y pH de 5.0, pero igual a los obtenidos con los otros tratamientos. Aunque en el caso de brotes ya establecidos, no se registraron diferencias entre las medias, se puede observar que el mayor número de hojas se tiene también con 0.3 mg/l de AIB y pH de 5.5 (Cuadro 7).

### 2.3 Número de raíces

En el análisis de varianza para esta variable, no se encontraron diferencias significativas en las concentraciones de AIB y niveles de pH (Apéndice A). Sin embargo, en el Cuadro 8, se puede observar que se presentó el mayor número de raíces con 0.2 mg/l de AIB (6.905), siguiéndole en orden decreciente 0.3 mg/l (5.899) y finalmente 0.1 mg/l de la auxina (4.204).

Como ya se indicó, para el pH tampoco hubo diferencias estadísticas entre los niveles; sin embargo, las tendencias manifiestan que con el nivel de 5.5 se lograron 7.014 raíces por brote; siendo el valor más alto, siguiéndole 5.586 raíces con pH de 5.0 y 4.408 raíces por brote con pH de 6.0 (Cuadro 8). Asimismo, no se manifestó interacción entre los factores sobre el número de raíces (Apéndice A).

Cuadro 7. Efecto de los tratamientos de Acido Indolbutírico y pH sobre la longitud de brotes y número de hojas del portainjerto M.9, antes y después del establecimiento en suelo

Concentración de AIB (mg/l)	pH	Longitud de brotes (cm)		Número de hojas	
		antes	después	antes	después
0.1	5.0	1.730 bc*	<u>1/</u>	6.550 b	<u>1/</u>
0.2	5.0	1.990 bc	1.867 a	8.400 ab	4.667 a
0.3	5.0	1.995 abc	1.762 a	7.100 ab	6.750 a
0.1	5.5	2.330 ab	1.817 a	7.850 ab	4.667 a
0.2	5.5	2.100 ab	1.833 a	8.400 ab	6.111 a
0.3	5.5	2.520 a	2.467 a	9.950 a	7.833 a
0.1	6.0	1.975 bc	1.960 a	8.650 ab	2.800 a
0.2	6.0	1.381 c	1.350 a	7.750 ab	5.500 a

\* Valores con la misma letra son estadísticamente iguales ( $P \leq 0.05$ ) de acuerdo a las medias mínimo-cuadráticas.

1/ No hubo datos debido a que murieron los brotes en la etapa de establecimiento a suelo.

#### 2.4 Longitud de raíces

Para esta variable el análisis de varianza indica que no hay diferencias significativas dentro de concentraciones de AIB y niveles de pH (Apéndice A). No obstante, en el Cuadro 8 se puede observar que la longitud de raíces se redujo a medida que disminuyó la concentración de AIB y un efecto similar sucedió para los niveles de pH, ya que se observó una disminución en la longitud de raíces a medida que disminuyeron los niveles.

Al igual que para el número de raíces, el análisis de varianza indica que no hay interacción entre los factores en estudio (Apéndice A).

Cuadro 8. Efecto del Acido Indolbutírico y pH sobre el número y longitud de raíces del portainjerto M.9

Concentración de AIB (mg/l)	Número de raíces	Longitud de raíces (cm)
0.1	4.204	0.772
0.2	6.905	1.351
0.3	5.899	1.926
pH		
5.0	5.586	1.295
5.5	7.014	1.328
6.0	4.408	1.425

## 2.5 Porcentaje de enraizamiento y sobrevivencia

En la Figura 4, se puede observar que los brotes que enraizaron fueron los que sobrevivieron; de tal manera, que los porcentajes de ambas variables son los mismos, así tenemos que el mayor porcentaje (35%) se obtuvo con 0.3 mg/l de AIB, siguiéndole el obtenido con 0.1 mg/l (27.50%) y por último el de 0.2 mg/l (25.0%). Asimismo, con los niveles de pH (Fig. 5) se observa un comportamiento similar, los



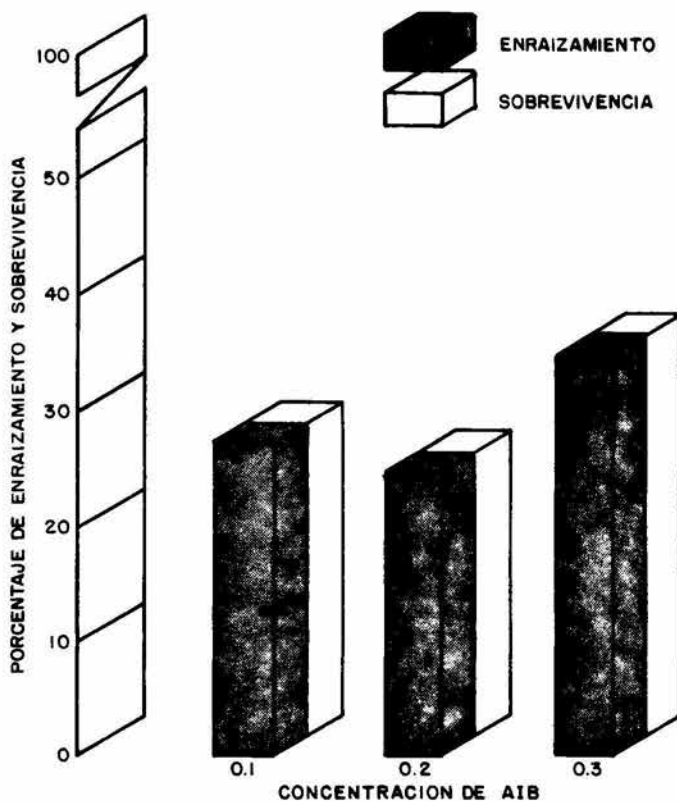


Fig. 4. Efecto del Acido Indolbutírico sobre los porcentajes de enraizamiento y sobrevivencia de los brotes del portainjerto M.9, en condiciones de suelo.

porcentajes de enraizamiento y sobrevivencia tienen el mismo valor. De esta manera se observa que el mayor porcentaje alcanzado (35%), fue con 5.5 de pH, siguiendo el logrado con pH de 5.0 (27.5%) y por último el de 6.0 (10.44%).

Al observar la Figura 6, se tiene el mismo efecto anterior de los tratamientos sobre el porcentaje de enraizamiento y sobrevivencia, siendo el mayor porcentaje (45%) logrado con 0.2 mg/l de AIB y pH de 5.5, siguiéndole un 40% con el tratamiento que contenía 0.3 mg/l de AIB y pH de 5.0, no pudiéndose observar una tendencia clara en el comportamiento de estas variables por concentraciones de AIB y niveles de pH.

## 2.6 Correlaciones

La variable longitud de brotes antes del establecimiento en suelo, presentó correlación significativa con el número de hojas antes del establecimiento y longitud de brotes después del establecimiento en suelo. También se encontró alta correlación del número de hojas antes del establecimiento con la longitud de brotes y número de hojas después de establecidas las plantas en suelo y esta última variable resultó altamente correlacionada con el número y longitud de raíces (Cuadro 9).

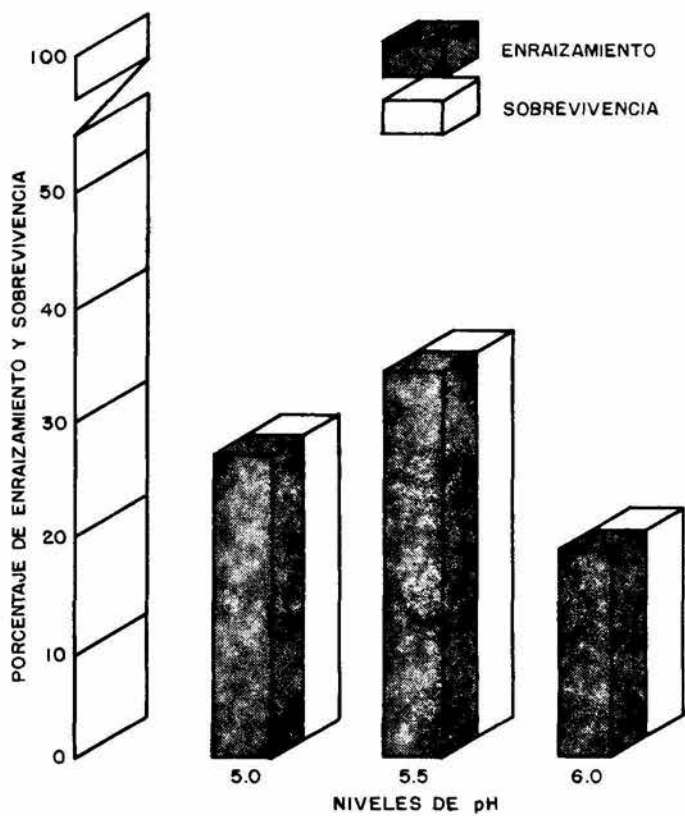


Fig. 5. Efecto del pH sobre el porcentaje de enraizamiento y sobrevivencia de los brotes del portainjerto M.9, en condiciones de suelo.

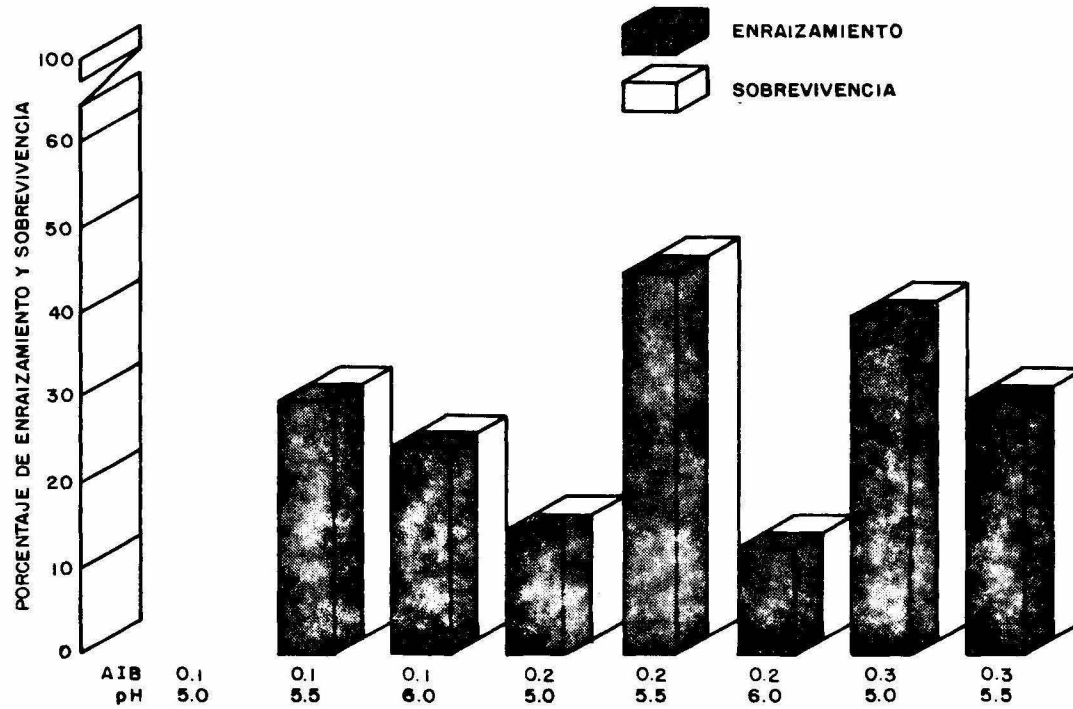


Fig. 6. Efecto de la interacción del Acido Indolbutírico y pH sobre el porcentaje de enraizamiento y sobrevivencia de los brotes del portainjerto M.9, en condiciones de suelo.

Cuadro 9. Coeficientes de correlación de Pearson para el portainjerto M.9

	LB <sub>1</sub>	NH <sub>1</sub>	LB <sub>2</sub>	NH <sub>2</sub>	NR	LR
LB <sub>1</sub>	1.0000	0.1648*	0.8405**	0.0305	0.1234	0.1654
NH <sub>1</sub>		1.0000	0.5175**	0.5424**	0.2577	0.1890
LB <sub>2</sub>			1.0000	0.1885	0.0270	0.1033
NH <sub>2</sub>				1.0000	0.5522**	0.5553**
NR					1.0000	0.0493
LR						1.0000

Variables correlacionadas:

LB<sub>1</sub> : Longitud de brotes antes del establecimiento en suelo

NH<sub>1</sub> : Número de hojas antes del establecimiento en suelo

LB<sub>2</sub> : Longitud de brotes después del establecimiento en suelo

NH<sub>2</sub> : Número de hojas después del establecimiento en suelo

NR : Número de raíces después del establecimiento en suelo

LR : Longitud de raíces después del establecimiento en suelo

\* Significativo con P = 0.05

\*\* Significativo con P = 0.01

## DISCUSION

### 1. Portainjerto MM,106

Con respecto a la longitud de los brotes antes y después de su establecimiento en suelo, los resultados indican que no hubo efecto de la concentración de AIB, de los niveles de pH, ni de los dos factores juntos, sobre este parámetro. Parece ser que este efecto está más relegado a la presencia de BA en el medio, que a la de AIB; Jones (1967) reporta precisamente que la BA a una concentración de 1.0 mg/l promovió la elongación de brotes de manzano. Algo semejante es también manifestado por Jones *et al.* (1979). Todo esto corrobora nuestros resultados, ya que el medio en el que se colocaron los brotes, antes de su transferencia a suelo no contenía BA; además parece ser que la presencia de AIB a ciertas concentraciones puede inhibir el crecimiento de los brotes de este frutal, induciendo en su lugar la formación de callo (Dutcher y Powell, 1972). Ahora bien, se esperaba encontrar un aumento significativo en la longitud de los brotes por efecto del enraizamiento, ya que la presencia de raíces en la base de los brotes, permitiría la absorción de nutrimentos y agua del sustrato, que se canalizarían en el crecimiento de los brotes; esto no se observó claramente, ya que aunque hubo un ligero aumento en la longitud de los brotes después de 30 días de permanecer en el suelo, posiblemente el tiempo fue muy poco, de tal manera que en este período las raíces estaban muy pequeñas todavía, tanto como para no poder manifestar su función de manera más objetiva.

El ligero decremento del tamaño de los brotes establecidos en suelo, que se presentó con 0.2 mg/l y con pH de 5.0 (Cuadro 3), se considera que se debió a que en algunos brotes su base se pudrió y al extraerlos del suelo, se desgarraba y se eliminaba esa pequeña porción del brote.

En cuanto al número de hojas, tampoco hubo diferencias significativas entre las concentraciones de AIB, niveles de pH, y AIB y pH juntos. Esto se explica esencialmente en base a lo anterior, ya que el medio de inducción de raíces no contenía BA, que podría ser el regulador que influyera en el número de hojas (Jones, 1967). Sin embargo, aunque estadísticamente no se manifestaron diferencias (Apéndice A), se pudo observar una tendencia de disminución del número de hojas después de que los brotes permanecieron en suelo (Cuadro 3). Esto podría deberse a dos cuestiones: 1) que el manejo de trasplante de un medio a otro haya propiciado la liberación de etileno, que influyó sobre los tejidos delicados de las plántulas de *in vitro*, y sobre todo, afectando las hojas causando su senescencia y consecuentemente su abscisión (Villegas, 1982) y 2) la anatomía particular de las hojas que crecen bajo condiciones *in vitro*; como son: poca densidad estomatal, poca capacidad de cierre estomatal, poca o ninguna capa cerosa, lo que provocó una incapacidad de las hojas para evitar alta transpiración, acarreándoles agobio por desequilibrio hídrico y con ello su marchitez y muerte posterior (Brainerd *et al.*, 1981; Brainerd y Fuchigami, 1981; Fuchigami *et al.*, 1981). Por otra parte, se considera que al momento que los brotes enraizan, las raíces empezaban a funcionar en la absorción de agua y nutrimentos, además de la exportación hacia el ápice de las citocininas sintetizadas en ellas, lo cual promovería el desarrollo del brote

y con ello las hojas; esto se pudo apreciar en los resultados, ya que se manifestó una correlación significativa del número de raíces con la longitud de los brotes después de establecidos en suelo (Cuadro 5). Sin embargo, el número de hojas antes del establecimiento a suelo no manifestó efecto sobre el enraizamiento, como suele suceder cuando enraizan estacas por los métodos convencionales, esto posiblemente debido a que estas hojas tienen condición heterotrófica, aún cuando son verdes, lo que evita la exportación de ellas hacia los meristemas radicales, de nutrimentos y energía para su desarrollo (Connery Thomas, 1982). Por otra parte, en cuanto al número y longitud de raíces, se encontró que las concentraciones de AIB y niveles de pH tuvieron efectos diferenciales sobre el número de raíces, pero no sobre su longitud (Cuadro 4). El mejor número de raíces se obtuvo con 0.3 mg/l de AIB (4.391 raíces/brote); aunque esta concentración es relativamente alta, en comparación con las otras dos (0.1 y 0.2 mg/l) no hubo formación de callo, como se manifiesta en otros casos; por ejemplo, Németh (1981) observó que a concentraciones de AIB mayores de  $5 \times 10^{-5}M$  (10.162 mg/l) se formó gran cantidad de callo en la base de los brotes de los portainjertos M.26, M.27 y MM.104, lo que disminuyó la cantidad de raíces e inhibió el desarrollo de las ya formadas.

De esta manera el número de raíces logrado en el trabajo, con la mayor concentración de AIB, se debió posiblemente al corto período de exposición de los brotes a la auxina, concordando con lo que manifiestan James y Thurbon (1979) y Snir y Erez (1980), ya que observaron que el contacto continuo de los brotes sobre el medio de enraizamiento, promueve la formación de callo en la base, lo cual se puede evitar si el



período de tratamiento se disminuye hasta 8 días, y posteriormente los brotes se transfieren a un medio sin reguladores, que en nuestro caso consistió de una mezcla de suelo pasteurizado. De esta manera se promovió el desarrollo de los primordios radicales, evitando el efecto inhibitorio de las auxinas; ya que éstas con el tiempo siguen promoviendo divisiones celulares acentuadas que dan origen a callo y que además gastan energía, evitando que ésta se utilice en el desarrollo de las raíces. Otra consideración que hay que hacer es que la inhibición del desarrollo de callo durante los 7 días de contacto con el medio, pudo deberse a la presencia del FG en él, ya que diversos autores manifiestan que éste influye sobre la formación de callo, pero no sobre el número y tamaño de raíces (Jones y Hatfield, 1976; James y Thurbon, 1979; James, 1979; Welander y Huntrieser, 1981; Villegas, 1982; Villegas y Castillo, 1985).

Con respecto al pH sobre el número y longitud de raíces, no hay realmente estudios que nos ayuden a comprender los resultados; sin embargo, la obtención de mayor número de raíces a un pH de 5.5 podría deberse a que en este nivel se propicia la mejor disponibilidad y absorción de nutrimentos y reguladores, en este caso de auxinas, que promovieron la inducción de primordios radicales más fácilmente que en los otros dos niveles (5.0 y 6.0). Se ha observado que a niveles bajos de pH hay una reducción en el crecimiento de raíz (Batjer y Sudds, 1937; citados por Neilsen *et al.*, 1982), lo que nos lleva a pensar que como en los niveles estudiados no hubo diferencias en el crecimiento de raíces, entonces en los tres niveles, hubo absorción adecuada de nutrimentos, principalmente  $\text{Ca}^{++}$  que permitió la formación de paredes y de

la lamela media de las nuevas células que se estaban formando por la división celular inducida por el AIB. En base a esto se hace necesaria la investigación del papel que juega el pH sobre la diferenciación de tejidos u órganos y sobre su crecimiento, ya que este factor es muy importante por su efecto en la disponibilidad de algunos elementos, lo cual no se conoce bajo condiciones *in vitro* y que de alguna manera repercute en el crecimiento y desarrollo de las plántulas.

Por otra parte, como se observa en los resultados, el mejor porcentaje de enraizamiento y sobrevivencia se logró con 0.1 mg/l de AIB (47.46% de enraizamiento y sobrevivencia 61.02%), observándose disminución en ambos al aumentar la concentración de la auxina.

Lane (1978) señala que el enraizamiento es inhibido por concentraciones elevadas de auxinas, porque se tornan tóxicas a los brotes. Aunque en nuestro caso no se manifestó toxicidad a la más alta concentración (0.3 mg/l). Abbott y Whiteley (1976) obtuvieron un 50% de enraizamiento de brotes de "Cox's Orange Pippin" con 0.1 mg/l de AIB y 0.1 mg/l de citocininas.

Snir y Erez (1980) enraizaron hasta el 100% de brotes de MM.106 con un medio de Murashige y Skoog, suplementado con 2.0% de sacarosa, 0.8 mg/l de tiamina y 1.0 mg/l de AIB y tratando los brotes con incisiones, por un tiempo de 6 a 8 días obtuvieron un promedio de 20 raíces por brote.

Cruz (1983) al emplear AIB solo en concentraciones de 0.2 y 0.5 mg/l bajo condiciones de exposición permanente, con brotes de MM.106, logró un 40% de enraizamiento y cuando adicionó 162 mg/l de FG el

porcentaje se incrementó a alrededor de un 80%.

Se puede observar con esto, que los resultados no son consistentes y que sin embargo, el porcentaje de enraizamiento es bajo, aún cuando se usó FG en el medio, el cual se ha indicado aumenta el porcentaje de brotes que enraizan. Se puede pensar que los bajos porcentajes, más que a un efecto de la auxina, se debió al cambio de condición que sufrieron los brotes, ya que como lo manifiestan Conner y Thomas (1982) las plantas que salen de *in vitro* presentan niveles muy bajos de fotosíntesis, de tal manera que son heterótrofas y al colocarlas en condiciones no asépticas, no son capaces de producir su propia energía que las ayudará a mantener el crecimiento de los primordios radicales, y como no se les aplicó alguna fuente de energía exógenamente, las raíces no desarrollaron; porque los brotes se quedaron prácticamente en estado de inanición. Sin embargo, en general, el porcentaje de sobrevivencia fue mayor que el de enraizamiento en las tres concentraciones, debido posiblemente a que la energía acumulada de las plántulas, la canalizaron a sobrevivir y no en desarrollar órganos, de esta manera las raíces desarrollaron cuando los brotes adquirieron su capacidad autotrófica. Por otra parte, también pudo haber influenciado en el poco enraizamiento la temperatura basal, ya que aunque no se midió, al parecer esta fue más baja que la de la atmósfera, lo cual repercute en este proceso como lo manifiesta Howard (1968). El porcentaje de sobrevivencia fue de menor a mayor concentración de AIB, debido quizá a que una alta concentración se acumuló en los brotes y con el manejo de los mismos al trasplante, hubo liberación de etileno que llevó a la muerte de las plántulas, agobiadas por el cambio de condición.

En lo que se refiere al pH, éste se considera que no tuvo efecto directo sobre el enraizamiento y sobrevivencia, ya que estos procesos se llevan a cabo fuera del medio; sin embargo, el pH de 5.5 presentó mejor sobrevivencia y enraizamiento debido posiblemente a que como se observó hubo buena inducción de raíces, las cuales fueron capaces de desarrollar en el suelo y al suceder esto los brotes pueden absorber nutrimentos y agua, lo que ayuda a compensar el agobio de los brotes por pérdida de agua y por falta de nutrimentos, mientras gradualmente se va dando la condición autotrófica.

Aunque no hubo interacción, estadísticamente los resultados indican que el mejor tratamiento fue el que consistió de 0.1 mg/l de AIB y pH de 5.5. Las razones son las anteriormente expuestas.

## 2. Portainjerto M.9

En este caso, aunque estadísticamente se manifiestan diferencias significativas entre las concentraciones de AIB, se sabe que en realidad éste no tiene efecto primordial en el crecimiento de los brotes; de tal manera, que las diferencias que se aprecian se pueden deber a que al establecer los brotes en el medio de cultivo, éstos tuvieron mayor heterogeneidad en su tamaño inicial, ya que el medio careció totalmente de la presencia de BA, que podría ser la que tuviera efecto sobre la longitud de los brotes. Después del establecimiento no hay diferencias entre las concentraciones, pero en este caso los valores disminuyeron debido a la pudrición que se presentó en la base de los brotes. Con respecto al pH, entre los niveles también hubo diferencias

(Cuadro 6), esto influenciado básicamente por el efecto antes mencionado.

En cuanto al número de hojas, no se observó efecto de las concentraciones de AIB antes de establecidos los brotes, debido de igual manera, que la longitud, a la heterogeneidad de los brotes. Ahora bien, después de establecidos disminuyó el número de hojas, aunque la menor diferencia se encontró con 0.3 mg/l de auxina. En general, la disminución de hojas se debe al cambio brusco de situación y debido a las diversas situaciones morfológicas y fisiológicas citadas por Brainerd *et al.* (1981), Brainerd y Fuchigami (1981), Fuchigami *et al.* (1981), Conner y Thomas (1982), que provocaron la abscisión de las hojas también en el MM.106. La baja diferencia que se encontró con 0.3 mg/l de AIB posiblemente se debió a que con esta concentración el número de raíces que se formaron y su longitud fueron las mejores, lo que favoreció la absorción de agua e impidió la marchitez de las hojas por déficit de agua.

El número de hojas antes del establecimiento, manifestó diferencias por efecto de los niveles del pH; pero hay que considerar la posible heterogeneidad del material, de tal manera que a mayor longitud de brotes, mayor es el número de hojas que porta. Igual que en el caso anterior, hubo disminución en el número de hojas después de que los brotes permanecieron en suelo, debido a la situación en que se encuentran cuando salen de los tubos de ensaye. Sin embargo, con pH de 5.5 hubo menos pérdida de hojas, ya que con éste se logró el mayor número de raíces que pudieron subsanar algunos de los efectos deletéreos del cambio, como se acaba de mencionar. Por otro lado, en la respuesta

de estas dos variables a los factores citados, se puede considerar que los brotes obtenidos por métodos asépticos difieren en su calidad entre sí, por las numerosas respuestas diferenciales que tienen los propágulos a la presencia y/o concentración de reguladores del crecimiento y de sustancias enriquecedoras del medio como sacarosa, floroglucinol y otros, que indudablemente crean una situación endógena de los brotes muy variable (Sriskandarajah y Mullins, 1981; Villegas, 1982).

Se encontró correlación entre las concentraciones de AIB y niveles de pH sobre la longitud de brotes y número de hojas antes del establecimiento, siendo al parecer la combinación de 0.3 mg/l de AIB y pH de 5.5 en donde se ubicaron los brotes más vigorosos. Después del establecimiento se observó una ligera disminución en el tamaño y número de hojas, debido a las causas antes citadas. Además, en el primer tratamiento, los brotes transferidos a suelo murieron al poco tiempo, esto debido a que se colocaron precisamente debajo de donde se expulsaba el agua de la cámara de nebulización y ésta se acumuló en los vasos creando una situación de estrés por inundación, lo que condujo a la pudrición de los brotes por un lado, y a la liberación de etileno por otro, lo que produjo la muerte de las plántulas (\*).

Con respecto al número de raíces, se observó (Cuadro 8) que el mayor número (6.905) se obtuvo con 0.2 mg/l de AIB, aunque estadísticamente no hubo diferencias entre las tres concentraciones, esto indica

---

(\*) Esta situación se presentó por error técnico, causas ajenas al experimento.

que el nivel endógeno de auxina en este portainjerto, no es tan bajo, ya que para el MM.106 fue necesaria una mayor concentración. La longitud de las raíces fue similar en las tres concentraciones; sin embargo, con 0.3 mg/l se indujo mayor elongación, por lo que se tuvo mayor tamaño de raíces. No hubo presencia de callo en ningún caso y el desarrollo de raíces se permitió, debido al corto tiempo de exposición de los brotes a la auxina. Esto concuerda con Lane (1982), quien manifiesta que el M.9 necesita una exposición a las auxinas por corto tiempo para inducir la iniciación de raíces, y una vez que esto sucede se puede prescindir de ellas. Además, también hay que considerar que la presencia del FG en el medio, pudo evitar la formación de callo (Jones y Hatfield, 1976; James y Thurbon, 1979; James, 1979).

Con respecto al pH se observó que el mayor número de raíces se obtuvo con 5.5 de pH (Cuadro 8), aunque la longitud mayor fue con pH de 6.0; sin embargo, las diferencias entre niveles fueron mínimas. Esto se puede relacionar con lo manifestado por Jonkers y Hoestra (1978), quienes indican que un pH de entre 5.5 y 6.5 es adecuado para el manzano; y las inferencias acerca de la absorción y disponibilidad de nutrimentos y hormonas hechas con el MM.106 son válidas también en este caso. La correlación existente entre el número de hojas de los brotes en suelo con el número y longitud de raíces, se puede deber a que éstas permitieron la absorción de agua que compensaron la posible transpiración elevada que se pudo presentar en ellos, lo que evitó su pérdida por marchitez. Sin embargo, las hojas no influyeron sobre la formación de raíces por su estado heterotrófico (Conner y Thomas, 1982).

En cuanto al porcentaje de enraizamiento y sobrevivencia por efecto del AIB, nuestros resultados manifiestan que los brotes que fueron capaces de enraizar fueron los que sobrevivieron (Fig. 4) ya que la aparición de raíces compensó el estado heterotrófico de los brotes y su excesiva transpiración. El bajo porcentaje de enraizamiento (45% como máximo obtenido) no concuerda con Lane (1982) quien manifiesta que el M.9 tiene niveles endógenos de auxinas elevados, por lo que responde a bajas concentraciones exógenas; ni con James y Thurbon (1979) hay similitud, ya que ellos lograron más del 60% de enraizamiento de este portainjerto al colocar los brotes durante 4 horas en un medio de 2 mg/l de AIB y después haciendo la transferencia a un medio sin reguladores, que en nuestro caso fue la mezcla de suelo. Sin embargo, esto se puede explicar por las características de los brotes de condiciones *in vitro* manifestadas por Conner y Thomas (1982) y que no cambian fácilmente al trasplantarlas a suelo, como lo han manifestado Brainerd *et al.* (1981) y Brainerd y Fuchigami (1981). Además se ha de considerar que no se tuvo un control sobre la temperatura basal, de tal manera que fuera la adecuada para el enraizamiento y desarrollo de raíces, como lo indica Howard (1968), lo que limitó el proceso.

Con respecto al pH, se encontró que el mejor nivel fue el de 5.5, ya que permitió el mejor porcentaje de enraizamiento y sobrevivencia (35% para ambos), esto debido a su efecto sobre todo en el medio de inducción, en la facilidad que crea en la disposición de minerales y reguladores que posiblemente se acumularon en los brotes, permitiendo su existencia en tanto emergían y crecían las raíces.



En cuanto al efecto por tratamiento, se encontró que con 0.2 mg/l de AIB y pH de 5.5 se dió el mejor porcentaje de enraizamiento y sobrevivencia (45% para ambos), esto porque bajo estas condiciones hubo buena capacidad de absorción de auxinas y nutrimentos que permitieron la inducción de raíces y su crecimiento, lo que no concuerda con Lane (1982) en el sentido de que los niveles endógenos auxínicos son elevados en este patrón.

Por último, en cuanto al efecto negativo de la etiolación sobre los brotes de ambos portainjertos, posiblemente se debió a que se dejaron por varias semanas en la obscuridad, lo que cambió totalmente las condiciones internas de los brotes como lo manifiesta Anderson (1982) indicando que una semana de etiolación de brotes de manzano es suficiente para cambiar los niveles endógenos de reguladores y favorecer la iniciación de raíces, ya que con tratamientos mayores los brotes etiolados son débiles y difíciles de aclimatizar en invernadero, lo que precisamente sucedió en nuestro caso, el cambio total de su estado endógeno hizo que la aplicación exógena de AIB y FG fueran tóxicas, ya que los tejidos etiolados presentan mayor sensibilidad a las auxinas promoviendo la liberación de etileno (Anderson, 1982; Villegas, 1986<sup>2</sup>), esto causado por el movimiento acrópeto de las auxinas y considerando además, que el ápice es la parte del brote más sensible, por lo que se provocó la muerte del mismo y posteriormente la de todo el brote, aún antes de los 7 días en el medio de cultivo, y los pocos brotes que pasaron a invernadero no se aclimatizaron resintiéndose fuertemente el cambio de ambiente y muriendo rápidamente.

---

<sup>2</sup> Comunicación personal. M. en C. Angel Villegas M. Centro de Fruticultura del Colegio de Postgraduados, Chapingo, Méx.

## CONCLUSIONES

Con base a los resultados obtenidos, se concluye lo siguiente:

1. La concentración de auxina que promueve el enraizamiento y sobrevivencia de mayor número de brotes del portainjerto MM.106 es de 0.1 mg/l, en tanto que para M.9 es de 0.3 mg/l.
2. El mejor pH del medio de cultivo para la inducción de raíces en ambos portainjertos es 5.5
3. La etiolación no es un procedimiento favorable para el enraizamiento de los portainjertos estudiados, bajo el método empleado.
4. Existen diferencias en la capacidad de enraizamiento y sobrevivencia entre los portainjertos estudiados.
5. Aún con ciertas diferencias, es posible el enraizamiento *in vivo* de los brotes de ambos portainjertos.
6. Es posible la aclimatización en los brotes, siempre y cuando se consideren todos los factores que la afectan.
7. En el presente trabajo no se obtuvieron altos porcentajes de enraizamiento y sobrevivencia, pero abre la posibilidad de una transferencia a invernadero desde el estado de proliferación de los brotes.

8. Es necesario el estudio anatómico y fisiológico de los brotes de estos portainjertos, lo que permitirá afinar su manejo al trasplante.

## LITERATURA CITADA

- Abbott, A.J. y E. Whiteley. 1976. Culture of *Malus* tissues *in vitro*. I. Multiplication of apple plants from isolated shoot apices. *Scientia Hort.* 4:183-189.
- Alvarez, R.S. 1974. El manzano. 3a. Edición. Publicaciones de Extensión Agraria. Madrid, España. p.141.
- Anderson, W.C. 1980. Tissue culture propagation of red and black raspberries, *Rubus idaeus* and *R. occidentalis*. *Acta Hort.* 112:13-20.
- Anderson, W.C. 1982. Etiolation as an aid to rooting. *Comb. Proc. Intern. Plant Prop. Soc.* 31:138-141.
- Anónimo, 1983. Información Agropecuaria y Forestal. Dirección General de Economía Agrícola. Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos. México.
- Arellano, O. G. y González, R.S. 1985. Efecto del recipiente, intensidad de luz y microambiente en el establecimiento a suelo de *Fragaria x ananassa* Duch. y *Prunus cerasifera* obtenidas *in vitro*. Tesis Ing. Agrícola. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. Cuautitlán Izcalli, Edo. de México. 122 p.
- Avitia, G.E. 1985. Propagación *in vitro* de selecciones de frambuesa roja (*Rubus idaeus* L.). Tesis M.C. Colegio de Postgraduados. Chapingo, Méx. 110 p.
- Basu, R.N., T.K. Bose, B.N. Roy, y A. Mukhopadhyay. 1969. Auxin synergists in rooting of cuttings. *Physiol. Plant.* 22:649-652.
- Bonga, J.M. 1982. Tissue culture techniques. p. 4-35. In J.M. Bonga and D.J. Durzan (eds.). *Tissue culture in forestry*. Martinus Nijhoff/Dr W. Junk Publishers. Printed in Netherlands.
- Brainerd, K.E., y L.H. Fuchigami. 1981. Acclimatization of aseptically cultures apple plants to low relative humidity. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 106(4):515-518.
- Brainerd, K.E., L.H. Fichigami, S. Kwiatkowski, y C.S. Clark. 1981. Leaf anatomy and water stress of aseptically cultures 'Pixy' plum grown under different environments. *HortScience.* 16:73-75.
- Brooks, R.M. y H.P. Olmo. 1972. Register of new fruit and nut varieties. 2a. Edición. University of California Press. pp. 59-69.

- Capite, de Luigi. 1955. Action of light and temperature on growth of plant tissue cultures *in vitro*. Amer. J. Bot. 42(10):869-873.
- Conger, B.V. 1981. Cloning Agricultural Plants Via *In vitro* Techniques. CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida. U.S.A. pp. 1-4.
- Conner, A.J., y M.B. Thomas. 1982. Re-establishing plantlets from tissue culture: A review. Comb. Proc. Intern. Plant Prop. Soc. 31:342-355.
- Cruz, P.F. 1983. Propagación *in vitro* de manzano (*Malus pumila* Mill). Tesis Ing. Agrícola. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. U.N.A.M. Cuautitlán Izcalli, Edo. de México. 68 p.
- Childers, N.F. 1973. Modern fruit science. 5th edn. Hort. Publ., Rutgers Univ., New Brounswick, U.S.A. 960 p.
- Damiano, C. 1980. Strawberry micropropagation. Proc. Conference nursery production of fruit plant through tissue culture application and feasibility. U.S.D.A. Agricultural Research Results. pp. 11-22.
- Debergh, P.C., y L.J. Maene. 1983. Contribution of tissue culture techniques to horticultura research and production. Acta Hort. 131:23-38.
- Devrenx, P.R.M., y L. Laneri. 1975. Anther culture of strawberry. HortScience. 10(2):119-120.
- Donnelly, S.J., R. Stace-Smith, y F.C. Mellor. 1980. *In vitro* culture of three *Rubus* species. Acta Hort. 112:69-76.
- Doud, S.L., y R.F. Carlson. 1977. Effects of etiolation, stem anatomy, and starch reserves on root initiation of layered *Malus* clones. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 102(4):487-491.
- Druart, P.H., C.L. Kevers, P.H. Boxus, y T.H. Gaspar. 1982. *In vitro* promotion of root formation by apple shoots through darkness effect on endogenous phenols and peroxidases. Z. Pflanzenphysiol. Bd. 108:429-436.
- Dunstan, D.I. 1982. Transplantation and post-transplantation of micro-propagated tree-fruit rootstocks. Comb. Proc. Intern. Plant Prop. Soc. 31:39-44.
- Dutcher, R.D., y L.E. Powell. 1972. Culture of apple shoots from buds *in vitro*. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 97(4):511-514.
- Fridborg, G., M. Pedersen, L. Landström, y T. Eriksson. 1978. The effect of activated charcoal on tissue cultures: Adsorption of metabolites inhibiting morphogenesis. Physiol. Plant 43:104-106.

- Fuchigami, I.H., T.Y. Cheng, y A. Soeldner. 1981. Abaxial transpiration and water loss in aseptically cultured plum. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 106:519-522.
- Gautheret, R.J. 1982. Plant tissue culture: The history. p. 7-12. In A. Fujiwara (ed.). 5th. International Congress of Plant Tissue and Cell Culture. Lake Yamanaka, Japan, July 11-16, - Published by The Japanese Association for Plant Tissue Culture.
- Gorter, C.J. 1969. Auxin-Synergists in the rooting of cuttings. *Physiol. Plant.* 22:497-502.
- Greenwood, M.S., y G.P. Berlyn. 1973. Sucrose-Indole-3-Acetic Acid interactions on root regeneration by *Pinus Lambertiana* embryo cuttings. *Amer. J. Bot.* 60(1):42-47.
- Hammerschlag, F. 1982. Factors influencing *in vitro* multiplication and rooting of the plum rootstock myrobalan (*Prunus cerasifera* Ehrh.). *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 107(1):44-47.
- Harper, P.C. 1978. Tissue culture propagation of blackberry and tayberry. *Hort. Res.* 18:141-143.
- Hartmann, H.T. y D.E. Kester. 1980. Propagación de plantas, Principios y prácticas. Trad. Marino, A.A. 2a. Edición C.E.C.S.A. México. pp. 814.
- Howard, B.H. 1968. The influence of 4(Indol-3) Butyric Acid and basal temperature on the rooting of apple rootstock hardwood cuttings. *J. Hort. Sci.* 43:23-31.
- Hutchinson, J.F. 1984. Factors affecting shoot proliferation and root initiation in organ cultures of the apple 'Northern Spy'. *Scientia Hort.* 22:347-358.
- James, D.J. 1979. The role of auxins and phloroglucinol in adventitious root formation in *Rubus* and *Fragaria* grown *in vitro*. *J. Hort. Sci.* 54(4):273-277.
- James, D.J. 1983a. Adventitious root formation '*in vitro*' in apple rootstocks (*Malus pumila*) I. Factors affecting the length of the auxin-sensitive phase in M.9. *Physiol. Plant.* 57:149-153.
- James, D.J. 1983b. Adventitious root formation '*in vitro*' in apple rootstocks (*Malus pumila*) II. Uptake and distribution of indol-3yl-acetic during the auxin-sensitive phase in M.9 and M.26. *Physiol. Plant.* 57:154-158.
- James, D.J., V.H. Knight, e I.J. Thurbon. 1980. Micropropagation of red raspberry and the influence of phloroglucinol. *Scientia Hort.* 12:313-319.

- James, D.J., e I.J. Thurbon. 1979. Rapid *in vitro* rooting of the apple rootstock M.9. J. Hort. Sci. 54(4):309-311.
- James, D.J., e I.J. Thurbon. 1981a. Shoot and root initiation *in vitro* in the apple rootstock M.9 and the promotive effects of phloroglucinol. J. Hort. Sci. 56(1):15-20.
- James, D.J., e I.J. Thurbon. 1981b. Phenolic compounds and other factors controlling rhizogenesis *in vitro* in the apple rootstocks M.9 and M.26. Z. Pflanzenphysiol. Bd. 105:11-20.
- James, D.J. e I.J. Thurbon. 1982. The control of rhizogenesis *in vitro* in difficult-to-root apple rootstocks. Proc. 5th Intl. Cong. Plant Tissue & Cell Culture. pp. 187-188.
- Jones, P.O. 1967. Effect of Benzyl Adenine on isolated apple shoots. Nature. 215:1514-1515.
- Jones, O.P. 1976. Effect of phloridzin and phloroglucinol on apple shoots. Nature. 262:392-393.
- Jones, O.P., y S.G.S. Hatfield. 1976. Root initiation in apple shoots cultured *in vitro* with auxins and phenolic compounds. J. Hort. Sci. 51:495-499.
- Jones, O.P., M.E. Hopgood, y D.O'Farrell. 1977. Propagation *in vitro* of M.26 apple rootstocks. J. Hort. Sci. 52:235-238.
- Jones, O.P., P.A. Pontikis, y M.E. Hopgood. 1979. Propagation *in vitro* of five apple scion cultivars. J. Hort. Sci. 54(2):155-158.
- Jonkers, H., y H. Hoestra. 1978. Soil pH in fluit trees in relation to specific replant disorder of apple. I. Introduction and review of literature. Scientia Hortic. 8:113-118.
- Kobayashi, K., L.M. Fuchigami, y K.E. Brainerd. 1981. Ethylene and ethane production and electrolyte leakage of water-stressed 'Pixy' plum leaves. HortScience 16:57-59.
- Lane, W.D. 1978. Regeneration of apple from shoot meristem-tips. Plant Sci. Lett. 13:281-285.
- Lane, W.D. 1982. Plant manipulation *in vitro* with hormones. Comb. Proc. Intern. Plant Prop. Soc. 31:101-108.
- Lane, W.D., y J.M. McDougald. 1982. Shoot tissue culture of apple: comparative response of five cultivars to cytokinin and auxin. Can. J. Plant Sci. 62:689-694.
- Lundergan, C.A., y J. Janick. 1979. Regulation of apple shoot proliferation and growth *in vitro*. Hort. Res. 20:19-24.

- Lundergan, C.A. y J. Janick. 1980. Regulation of apple shoot proliferation and growth *in vitro*. Hort. Res. 20:19-24.
- Lydiane, (?). y M.R. Kyte. 1982. Small fruit culture after the test tube. Comb. Proc. Intern. Plant Prop. Soc. 31:45-47.
- Machinik, B. y T. Orlikowska. 1981. *In vitro* propagation of P22 *Malus* clonal rootstock. Fruit Sci. Rep. 4(8):173-177.
- Martínez, G.A. 1980. Introducción al SAS. Sistema para Análisis Estadístico. Centro de Estadística y Cálculo. Colegio de Postgraduados. Chapingo, México. p. 49
- Moore, D.P. 1974. Physiological effects of pH on roots. p. 135-151. In Carson, E.W. (ed.). The plant root and its environment. The Univ. Press of Virginia. U.S.A.
- Mullins, M.G. 1982. Tissue culture and plant propagation: Coming down to earth. Comb. Proc. Intern. Plant Prop. Soc. 31:162-165.
- Mullins, R.H., y D.E. Schlegel. 1976. Cold storage maintenance of strawberry meristem plantlets. HortScience. 11(2):100-101.
- Murashige, T. 1974. Plant propagation through tissue cultures. Ann. Rev. Plant Physiol. 25:135-166.
- Murashige, T., y P. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant 15: 473-497.
- Murashige, T. 1977. Plant cell and organ cultures as horticultural practices. Acta Horticulturae 78:17-30.
- Neilson, G.H., P.B. Hoyt, y O.L. Lau. 1982. Effects of surface soil pH on soil cation content, leaf nutrient levels and quality of apples in British Columbia. Can. J. Plant Sci. 62:695-702.
- Németh, G. 1981. Adventitious root induction by substituted 2-chloro-3-propionitriles in apple rootstocks cultured *in vitro*. Scientia Hort. 14:253-259.
- Pal, M., y K.K. Nanda. 1981. Rooting of etiolated stem segments of *Populus robusta* interaction of temperature, catechol and sucrose in the presence of IAA. Physiol. Plant. 53:540-542.
- Pjenažek, J. 1968. The growth *in vitro* of isolated apple shoot tips from young seedlings on media containing growth regulators. Bulletin de L'academic Polonaise des Sciences. 16(3):179-183.
- Poole, R., y C.H. Conover. 1983. Establishment and growth of *in vitro* cultured *Dieffenbachia*. HortScience. 18:185-187.



- Pyott, J.L., y R.H. Converse. 1981. *In vitro* propagation of heat-treated red raspberry clones. HortScience. 16(3):308-309.
- Ramming, D. 1983. Embryo culture. p. 135-145. In J.N. Moore and J. Janick (eds.). Methods in fruit breeding. W. Lafayette, Ind.: Purdue Univ. Press.
- Singha, S. 1982. Influence of agar concentration on *in vitro* shoot proliferation of *Malus* sp. 'Almey' and *Pyrus communis* 'Seckel'. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 107(4):657-660.
- Skirm, G.W. 1942. Embryo culturing as an aid to plant breeding. J. Heredity. 33:211-215.
- Skirvin, R.M., M.C. Chu, y E. Gómez. 1981. *In vitro* propagation of thornless trailing blackberries. HortScience. 16(3):310-312.
- Slack, S.A. 1980. Pathogen-free plants meristem-tip culture. Plant Dis. pp. 15-17.
- Smith, W.A. 1982. The aftermath of the test tube in tissue culture. Comb. Proc. Intern. Plant Prop. Sec. 31:47-53.
- Snir, I. 1981. Micropropagation of red raspberry. Scientia Hort. 14:139-143.
- Snir, I., y A. Erez. 1980. *In vitro* propagation of Malling Merton apple rootstocks. HortScience. 15(5):597-598.
- Sriskandarajah, S., y M.G. Mullins. 1981. Micropropagation of Granny Smith apple: factors affecting root formation *in vitro*. J. Hort. Sci. 56(1):71-76.
- Sriskandarajah, S., y M.G. Mullins. 1982. Micropropagation of apple scion cultivars. Comb. Proc. Intern. Plant Prop. Soc. 31:209-213.
- Sriskandarajah, S., M.S. Mullins, e Y. Nair. 1982. Induction of adventitious rooting *in vitro* in difficult to propagate cultivars of apple. Plant Sci. Lett. 24:1-9.
- Takeno, K., J.S. Taylor, S. Sriskandarajah, R.P. Pharis, y M.G. Mullins. 1982/83. Endogenous gibberellin and cytokinin like substances in cultured shoot tissues of apple, *Malus pumila* cv. Jonathan, in relation to adventitious root formation. Plant Growth Regulation. 1:261-268.
- Thorpe, T.A. 1982. Carbohydrate utilization and metabolism. p. 325-368. In J.M. Bonga and D.J. Durzan (eds.). Tissue culture in forestry. Martinus Nijhoff/Dr W. Junk Publishers. Printed in Netherlands.

- Vieitez, A.M., M.L. Vieitez, y A. Ballester. 1981. *In vitro* chestnut regeneration anatomical and chemical changes during the rooting process. College International Sur La Culture "*In vitro*" Des. Association Foret-cellulose. Fointainebleau, France. pp. 329-352.
- Villegas, M.A. 1982. Propagación de cultivares de manzano (*Malus pumila* Mill) *in vitro*. Tesis M.C. Colegio de Postgraduados. Chapingo, México. 88 p.
- Villegas, M.A. y Castillo, G.A.M. 1985. Factores que influncian el enraizamiento *in vitro* del portainjerto de manzano MM.106. Memorias del I Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Ciencias Hortícolas, celebrado en Hermosillo, Son. del 21 al 26 de abril. (en prensa).
- Walkey, D.G. 1972. Production of apple plantlets from auxillary-bud meristems. Can. J. Plant Sci. 52:1085-1087.
- Welander, M. 1982. *In vitro* rooting of apple shoots and acclimatization of the plantlets. Proc. 5th. Intl. Cong. Plant Tissue & Cell Culture. Plant Tissue Culture. pp. 731-732.
- Welander, M. 1983. *In vitro* rooting of the apple rootstock M.26 in adult and juvenile growth phases and acclimatization of the plantlets. Physiol. Plant 58:231-238.
- Welander, M. e I. Huntrieser. 1981. The rooting ability of shoots raised '*in vitro*' from the apple rootstock A2 in juvenile and in adult growth phase. Physiol. Plant. 53:301-306
- Werner, E.M., y A.A. Boe. 1980. *In vitro* propagation of Malling 7 apple rootstock. HortScience 15(4):509-510.
- Zimmerman, R.H. 1982. Tissue culture for the practical plant propagator-state of the art. Comb. Proc. Intern. Plant Prop. Soc. 31:559-562.
- Zimmerman, R.H. 1983. Tissue culture. p. 124-135. In J. N. Moore and J. Janick (eds.). Methods in fruit breeding. W. Lafayette, Ind.: Purdue Univ. Press.
- Zimmerman, R.H. 1984. Rooting cultivars *in vitro*: Interactions among light, temperature, phloroglucinol and auxin. Plant Cell Tissue Organ Culture. 3:301-311.
- Zimmerman, R.H., y O.C. Broome. 1980. Apple cultivar micropropagation. Proc. Conference nursery production of fruit plant through tissue culture application and feasibility. U.S.D.A. Agricultural research results. pp. 54-59

- Zimmerman, R.H., y O.C. Broome. 1981. Phloroglucinol and *in vitro* rooting of apple cultivar cuttings. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 106(5):648-652.
- Zimmerman, R.H., e I. Fordham. 1985. Simplified method for rooting apple cultivars *in vitro*. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 110(1):34-38.

APENDICE A

Significancia de las pruebas de F para los factores de variación de cada una de las variables estudiadas

Variable	Factores de variación				C.V.
	TRAT	AIB	pH	AIB*pH	
<u>Portainjerto MM.106</u>					
Longitud de brotes (LB <sub>1</sub> ) <sup>1/</sup>	NS	NS	NS	NS	32.32
Número de hojas (NH <sub>1</sub> )	NS	NS	NS	NS	36.29
Longitud de brotes (LB <sub>2</sub> ) <sup>2/</sup>	NS	NS	NS	NS	32.96
Número de hojas (NH <sub>2</sub> )	NS	NS	NS	NS	46.72
Número de raíces (NR)	**	*	**	NS	91.86
Longitud de raíces (LR)	NS	NS	NS	NS	89.52
<u>Portainjerto M.9</u>					
Longitud de brotes (LB <sub>1</sub> )	**	**	**	**	27.75
Número de hojas (NH <sub>1</sub> )	*	NS	*	*	33.05
Longitud de brotes (LB <sub>2</sub> )	NS	NS	NS	NS	25.38
Número de hojas (NH <sub>2</sub> )	**	**	NS	NS	37.76
Número de raíces (NR)	NS	NS	NS	NS	55.41
Longitud de raíces (LR)	NS	NS	NS	NS	91.02

<sup>1/</sup> Indica antes del establecimiento en suelo

<sup>2/</sup> Indica después del establecimiento en suelo

NS = No significativo

\* Significativo con P = 0.05

\*\* Significativo con P = 0.01