



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

Facultad de Estudios Superiores "Cuautitlán"

PROPAGACION IN VITRO DE MANZANO

(Malus pumila Mill.)

T E S I S

Que para obtener el título de:

INGENIERO AGRICOLA

P r e s e n t a :

FRANCISCO CRUZ PIZARRO

Director de la Tesis: M.C. Angel Villegas Monter

Cuautitlán Izcalli, Edo. de México

1983



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

CONTENIDO

	PAG.
LISTA DE CUADROS	v
LISTA DE GRAFICAS	vi
1. RESUMEN	vii
2. INTRODUCCION	1
3. REVISION DE LITERATURA	3
3.1. Propagación <u>in vitro</u>	3
a) Características generales	3
b) Especies de importancia económica que se propagan a través del cultivo de tejidos	3
c) Fases o estados del cultivo de tejidos	4
Estado I. Establecimiento del cultivo aséptico	5
Estado II. Multiplicación del propágulo o proli- feración	5
Estado III. Preparación para el establecimiento de la planta en el suelo	5
d) Usos y ventajas del cultivo de tejidos	6
e) Organos utilizados en el cultivo de tejidos	7
3.2. Factores a considerar en la propagación	7
a) Desinfección	7
b) Medio de cultivo	10
3.3. Proliferación	12
a) Formación de brotes	12

	PAG.
b) Factores que influyen en la respuesta de culti- vares y portainjertos de manzano a la prolifera- ción <u>in vitro</u>	13
3.4. Enraizamiento	17
a) Factores que influyen en la respuesta de culti- vares y portainjertos de manzano al enraizamiento <u>in vitro</u>	17
3.5. Condiciones ambientales	23
a) Luminosidad	23
b) Temperatura	24
3.6. Conclusiones sobre la Revisión de Literatura	24
4. MATERIALES Y METODOS	27
4.1. Material vegetativo	27
4.2. Medio de cultivo	28
a) Establecimiento (Fase I)	28
b) Proliferación (Fase II)	29
c) Enraizamiento (Fase III)	29
c.1) Enraizamiento con exposición permanente a reguladores del crecimiento	29
c.2) Enraizamiento con exposición parcial a re- guladores del crecimiento	30
d) Elaboración del medio de cultivo	31
4.3. Corte del material vegetativo	32
a) Desinfección	32

	PAG.
b) Implantación del material vegetativo en el medio de cultivo	33
4.4. Condiciones de incubación	34
4.5. Materiales y equipo	34
a) Material de laboratorio	34
b) Equipo de laboratorio	35
4.6. Fecha de implantación	35
4.7. Diseño experimental	36
a) Establecimiento	36
b) Proliferación	36
c) Enraizamiento	37
4.8. Toma de datos	37
4.9. Análisis de los datos	38
5. RESULTADOS Y DISCUSION	39
5.1. Establecimiento (Fase I)	39
a) Cultivos asépticos y contaminación	39
b) Desarrollo de brotes	42
5.2. Proliferación (Fase II)	46
a) Brotes por subcultivo	46
b) Brotes por cultivar y portainjerto	47
c) Origen de los brotes	52

	PAG.
5.3. Enraizamiento (Fase III)	52
a) Exposición permanente a reguladores del <u>crecimien</u> to	53
- Auxinas	53
- Auxinas más floroglucinol	54
- Auxinas más carbón activado	55
b) Exposición parcial a reguladores del crecimiento	58
6. CONCLUSIONES	61
APENDICE	63
LITERATURA REVISADA	66

LISTA DE CUADROS

NUM.		PAG.
1	Principales especies frutales de importancia económica que se propagan por medio del cultivo de tejidos	4
2	Tratamientos para el establecimiento de yemas axilares de manzano del cv Elah y del portainjerto MM 106 .	28
3	Tratamientos para enraizamiento bajo exposición permanente a reguladores del crecimiento de brotes del cv Elah y del portainjerto MM 106	30
4	Comparación de medias y porcentajes en la variación cultivos asépticos, para el cv Elah y el portainjerto MM 106	39
5	Comparación de medias para la variable desarrollo de brotes, del cv Elah y del portainjerto MM 106	43
6	Comparación de medias y porcentajes para la variable formación de brotes a partir de yemas del cv Elah y del portainjerto MM 106, con diferentes concentraciones de reguladores del crecimiento	45
7	Comparación de medias para la variable número de brotes por subcultivo por tubo, del cv Elah y del portainjerto MM 106	47
8	Comparación de medias para la variable de brotes por tubo para el cv Elah y el portainjerto MM 106 en 4 subcultivos	48

LISTA DE GRAFICAS

NUM.		PAG.
1	Porcentaje de cultivos asépticos y contaminados para el cv Elah y el portainjerto MM 106 en seis medios de cultivo	41
2	Número de brotes por tubo en cada subcultivar del cv Elah y del portainjerto MM 106	49
3	Efecto del AIB, AIB más floroglucinol y AIB más carbón activado (CA) en el enraizamiento del portainjerto MM 106	56
4	Efecto del AIB, AIB más floroglucinol y AIB más carbón activado (CA) en el enraizamiento del cv Elah	57
5	Efecto del AIB más floroglucinol en el enraizamiento del cv Elah	59

APENDICE

NUM.		PAG.
1	Soluciones concentradas de las sales minerales del medio de Murashige y Skoog (1962)	64
2	Significancia en las pruebas F de los factores de <u>va</u> riación para cada variable de estudio	65

1. RESUMEN

Los objetivos del presente estudio fueron; observar el efecto de dilución del medio de cultivo y concentración de Bencilaminopurina en el establecimiento de ápices vegetativos, efecto de los subcultivos en la proliferación y respuesta de los brotes al enraizamiento in vitro del cv Elah y portainjerto de manzano MM 106, los cuales tienen buena adaptación al área de Chapingo, Méx.

El medio de cultivo empleado fue a partir de las sales minerales de Murashige y Skoog (1962), al 100% (completo) y 50% (diluído) de su concentración, complementado con 1 mg/l de tiamina dicloro, 100 mg/l de mioinositol, 0.5, 1.0 y 1.5 mg/l de Bencilaminopurina y 0.2, 0.5, 1.0 y 2.0 mg/l de AIB, 1 g/l de carbón activado, 30 g/l de sacarosa y 5 g/l de agar, ajustando el pH a 5.5. Empleando ápices vegetativos obtenidos de yemas axilares, del cv Elah y del portainjerto MM 106, el establecimiento de los ápices se realizó el 26 de Junio de 1982, y con el objeto de observar el grado de respuesta de los brotes, fueron subcultivados en forma individual cada 4-5 semanas durante 4 ocasiones, empleando un medio diluído, complementado con 1.5 mg/l de BA y 0.2 mg/l de AIB. En el enraizamiento se realizaron dos experimentos secuenciados, en el primero empleando 0.2 y 0.5 mg/l de AIB, en un medio en el cual los brotes permanecieron bajo exposición permanente, en el segundo empleando 1.0 y 2.0 mg/l de AIB en exposición parcial (7 días).

El diseño experimental empleado para cada experimento fue completamente al azar, con 20 y 10 repeticiones para proliferación y enraizamiento respectivamente, estando constituida la unidad experimental por

un tubo de ensaye.

Los resultados obtenidos indican que el sistema de desinfección empleado es efectivo, obteniendo porcentajes de cultivos asépticos del 83.5% y 96.5% para el cv Elah y el portainjerto MM 106 respectivamente, teniendo así un promedio de 90% de cultivos asépticos. En el establecimiento se observó que las yemas del portainjerto MM 106 formaron la mayor proporción de brotes en un medio completo, mientras que las provenientes del cv Elah desarrollaron la mayor proporción de brotes al emplear un medio diluido, en ambos casos utilizando 1.5 mg/l de Bencilaminopurina.

Al subcultivar los brotes cada 4-5 semanas durante cuatro ocasiones en forma continua, empleando un medio diluido, complementado con 1.5 mg/l de BA, se observó la tendencia a incrementar el número de brotes por tubo a medida que transcurren los subcultivos, encontrándose que existe diferencia altamente significativa entre el 1, 2, 3 y 4 subcultivo, permitiendo obtener un máximo de 10.0 brotes por tubo con el MM 106 y 22.9 con el cv Elah.

En el enraizamiento el portainjerto MM 106 tuvo una mejor respuesta que el cv Elah. Al emplear AIB sólo en concentraciones de 0.2 y 0.5 mg/l, bajo condiciones de exposición permanente, en el caso del portainjerto MM 106 se logró un 40% de enraizamiento, mientras que el cv Elah solamente logró un 10% de enraizamiento. Al utilizar AIB en concentraciones de 0.2 y 0.5 mg/l más 162 mg/l de floriglucinol el porcentaje de enraizamiento se incrementó aproximadamente un 100% más que al emplear

AIB solo, logrando enraizar 70 y 80% de brotes del portainjerto MM 106 y 20 y 40% del cultivar Elah para ambas concentraciones. Cuando se empleó el método de exposición parcial (7 días) a auxinas con brotes del cv Elah se observó que la inducción de raíces se llevó a cabo de manera irregular y al transferir los brotes a un medio sin reguladores del crecimiento se lograron porcentajes de enraizamiento de 20 y 30% para 1.0 y 2.0 mg/l de AIB respectivamente.

Los resultados obtenidos en el presente estudio permiten concluir que es factible propagar el cv Elah y el portainjerto MM 106 a partir de yemas axilares, mediante su cultivo in vitro.

2. INTRODUCCION

La fruticultura en México ocupa aproximadamente 820,000 has, lo cual constituye sólo el 5% de la superficie total cultivada, sin embargo aportan el 20% del valor de la producción agrícola del país (Obando, 1982), manifestando así su elevada rentabilidad por unidad de superficie.

Dentro de la fruticultura nacional ocupan un lugar importante las especies caducifolias, tanto por la superficie plantada, que es de 170,000 has como por su volumen y valor de la producción, siendo el manzano el principal frutal de clima templado, del cual en México se encuentran plantadas cerca de 58,000 has (Obando, 1982). El manzano (Malus pumila Mill) presenta limitantes, en cuanto a su propagación que permitan la obtención de material vegetativo en forma eficiente, tanto de cultivares como de portainjertos. Entre los portainjertos de mayor importancia se encuentra el MM 106, considerado semi-enano con una amplia adaptabilidad ecológica y resistente a patógenos, asimismo, cultivares con características deseables tanto de sus estructuras reproductivas como vegetativas, como lo es el cultivar Elah de amplio potencial para México. Existiendo así una carencia de material vegetativo tanto en cantidad como en calidad, que permitan la adopción de otros sistemas de manejo de huertos de manzano en comparación con el tradicional, como lo son el intensivo y superintensivo, los cuales se caracterizan por requerimientos elevados de material vegetativo, y por consiguiente se hace necesario generar métodos de propagación que permitan la obtención de grandes cantidades de material vegetativo. Uno de los métodos por medio del cual se pueden obtener éstos, es por medio del

cultivo de tejidos; Jones et al. (1977) reportan la factibilidad de obtener hasta 60,000 plantas del portainjerto M 26 en 8 meses a partir de un solo ápice, sin embargo no todos los resultados son satisfactorios, el enraizamiento constituye en la propagación in vitro de manzano una de las principales limitantes, debido a la baja efectividad para lograr la inducción de raíces adventicias, en este caso la utilización de reguladores del crecimiento y compuestos fenólicos muestran poca consistencia de un experimento a otro.

En el presente trabajo se han fijado como objetivos principales: Observar el efecto de dilución del medio de cultivo y concentración de Bencilaminopurina sobre el establecimiento de ápices vegetativos. El efecto de los subcultivos en la proliferación y respuesta de los brotes al enraizamiento in vitro del cv Elah y del portainjerto MM 106, los cuales tienen buena adaptación en el área de Chapingo, México.

3. REVISION DE LITERATURA

3.1. Propagación in vitro

a) Características generales

La propagación in vitro, micropropagación o cultivo de tejidos es uno de los sistemas de multiplicación de plantas en forma asexual que en la actualidad ofrece una serie de ventajas sobre los sistemas tradicionales de propagación (estacas, estolones, tubérculos, rizomas y bulbos) (Murashige, 1978).

Los beneficios comerciales de la práctica y aplicación de las técnicas del cultivo de tejidos para la propagación de plantas, tienen un gran impacto en las especies herbáceas principalmente (Cheng, 1978); sin embargo en las especies leñosas como lo es el manzano, se considera que presenta dificultades para la propagación in vitro (Werner y Boe, 1980).

El cultivo de tejidos se basa en la totipotencia de las células vegetales, siendo ésta la capacidad de regenerar un nuevo individuo a partir de ellas (Murashige, 1974).

b) Especies de importancia económica propagadas a través del cultivo de tejidos

Murashige (1974), señala una serie de especies vegetales a través de las cuales ha quedado demostrado potencialmente, la multiplicación clonal de las mismas por medio del cultivo de tejidos, Murashige,

(1978), incluye algunas de las principales especies frutales de importancia económica que se propagan comercialmente por medio del cultivo de tejidos (Cuadro 1).

Cuadro 1. Principales especies frutales de importancia económica que se propagan por medio del cultivo de tejidos

Ananas comosus L. Merr.

Carica papaya L.

Citrus sp.

Fragaria sp.

Macadamia sp.

Malus silvestris Mill.

Musa cavendishii Lam.

Persea americana

Phoenix dactylifera L.

Prunus cerasus L.

Rubus sp.

Vitis vinifera L.

FUENTE: Murashige, 1978.

c) Fases o estados en el cultivo de tejidos

En el cultivo de tejidos se emplean una secuencia de fases o estados, mismos que tienen requerimientos específicos. Murashige (1974) distingue tres estados:

Estado I. Establecimiento del cultivo aséptico

El objetivo principal de este estado es lo relativo a la asepsia del material vegetativo de la planta en cuestión, teniendo como resultado principalmente, la formación de brotes, o bien la formación de callos, siendo necesario que tanto el medio de cultivo como el material vegetativo se encuentre libre de partículas extrañas, para garantizar el establecimiento y desarrollo del tejido.

Estado II. Multiplicación del propágulo o proliferación

En este estado existe un rápido desarrollo de órganos y otras estructuras; este incremento puede ser debido a la inducción de brotes adventicios o brotes axilares, originándose los primeros del callo de la base del brote y los axilares de la yema contenida en la axila de la hoja del brote. Consistiendo además este estado en subcultivos periódicos que permiten una rápida multiplicación de los propágulos, teniendo en este estado una gran importancia la optimización en la concentración de nutrientes y reguladores del crecimiento, debido a que de ello depende en gran medida la formación de brotes (Murashige, 1977), debiendo de existir además un balance adecuado de los reguladores del crecimiento, en virtud de que una elevada concentración de auxinas en el medio puede llegar a causar en este estado una excesiva formación de callo.

Estado III. Preparación para el establecimiento de la planta en el suelo

Este estado involucra la inducción y diferenciación de raíz, en los brotes obtenidos durante la proliferación, existiendo así una conversión

de un estado heterotrófico a uno autotrófico al desarrollar ellos sus raíces, confiriéndole además una determinada tolerancia a tensión de humedad, es decir una aclimatación del material previa a su transplante a tierra.

d) Usos y ventajas del cultivo de tejidos

Dentro de las principales ventajas se mencionan (Cheng, 1978):

- Obtención de plantas libres de patógenos específicos (virus y viroides)
- Propagación clonal de las especies en forma rápida y masiva
- Manejo de una gran población de individuos de una determinada especie vegetal, en un espacio reducido y regulación de su crecimiento

Murashige (1978), menciona que otra ventaja es:

- Aplicación de los métodos in vitro para la hibridación y desarrollo de nuevas variedades

Thorpe (1982) señala que una ventaja potencial del cultivo de tejidos es utilizarlo como banco de germoplasma, con la acción de crioprotectores y crioconservadores.

d) Organos utilizados en el cultivo de tejidos

Murashige (1978), señala que dentro de los órganos y estructuras utilizadas en el cultivo de tejidos están: embriones sexuales, ovarios, óvulos, protoplastos, hojas, anteras, polen, cotiledones, segmentos de raíz, tallo, flores y yemas axilares principalmente, denominando a esto propágulo.

3.2. Factores a considerar en la propagación in vitro

Dentro de la propagación in vitro existen una serie de factores, mismos que se comprenden dentro de los estados o fases de la propagación in vitro que son necesarios considerar en este estudio.

a) Desinfección

Por la naturaleza del medio de cultivo es inevitable que se llegue a contaminar por un amplio rango de microorganismos, para lo cual se hace necesaria la desinfección del material vegetativo, debido a que la retención de agentes contaminantes por parte del tejido vegetal en contacto con el medio de cultivo influyeron sobre la proliferación de los contaminantes, y afecta de manera significativa la formación y crecimiento de brotes y callos (Hitchinson et al. 1977).

Se considera que los métodos de desinfección varían con la especie e investigador, en el caso del manzano (Malus pumila Mill) el más empleado es el utilizado por Jones en 1965 (Villegas, 1982), el cual consiste en una doble esterilización del material vegetal, colocando primeramente

los ápices en agua destilada, posteriormente son inmersos momentáneamente en agua de MannoXol al 0.01%, inmediatamente se pasan a una solución de hipoclorito de calcio al 0.14% por un minuto seguido de tres enjuagues en agua destilada-esterilizada, y antes de transferir los ápices al medio de cultivo son inmersos nuevamente en agua de MannoXol seguidos de 40 minutos en solución de hipoclorito de sodio (al 0.42%) y posteriormente enjuagados tres veces con agua destilada-esterilizada.

Werner y Boe (1980) señalan un procedimiento de desinfección para la propagación del portainjerto de manzano M 7, en el cual los ápices son desinfectados mediante un lavado previo con un agente humectante e inmediatamente son inmersos en una solución de hipoclorito de sodio al 10% durante 20 minutos, seguido de un enjuague con etanol al 70% y dos enjuagues con agua destilada-esterilizada, reportando con este sistema de desinfección una contaminación del 15% en el establecimiento y 5% para subcultivos.

Jones et al. (1979) establecen un método de desinfección en el cual los ápices de cinco cultivares de manzano son enjuagados durante una hora en agua corriente, después inmersos en hipoclorito de sodio comercial al 10% durante 40 minutos y posteriormente 5 enjuagues con agua destilada-esterilizada, obteniendo así porcentajes de contaminación en el establecimiento del 10 al 30%.

Singha (1982) en la propagación de manzano silvestre (Malus spp.) propone un método de desinfección, en el cual los ápices son colocados en una solución al 0.52% de hipoclorito de sodio más 0.1% de Tween-20

durante 5 minutos con una agitación suave, seguida de tres enjuagues con agua destilada-esterilizada.

Villegas (1982) empleó el método de desinfección descrito por Jones en 1965, con las siguientes modificaciones: las varetas cortadas se lavan con jabón y estropajo, en seguida se cortan segmentos de aproximadamente 1 cm, los cuales contienen una yema; posteriormente se colocan en un vaso de precipitados, enjuagándose de 3-4 veces con agua destilada, después de esto en el vaso de precipitados que contenía las fracciones de vareta se vierte alcohol etílico al 70% durante 3 minutos, posteriormente se retira el alcohol y se agrega una solución de hipoclorito de calcio (30-35% de cloro) al 4% durante 30 minutos; finalmente se enjuagan durante 3 ó 4 veces con agua destilada-esterilizada, reportando porcentajes de contaminación del 2.3 al 31.25% en el establecimiento de cultivos de manzano.

Hammerchlag (1982), empleando diversos métodos de desinfección en durazno; material sin desinfectar, tratado con etanol, cloro y antibióticos, señala que utilizando los tres primeros el porcentaje de contaminación es del 27% aproximadamente; al utilizar un tratamiento complementado a partir de cada uno de los métodos individuales los ápices son inmersos durante 5 minutos en etanol al 70%, posteriormente se vierten en hipoclorito de sodio al 0.5% con Tween-20 al 0.01% durante 15-20 minutos, posteriormente se colocan en una solución de penicilina-estreptomicina a 100 ppm durante 15 minutos, siendo después enjuagados tres veces con agua destilada-esterilizada, obteniendo así porcentajes de contaminación de 1-3%.

Giladi et al. (1979) realizando un trabajo con naranja dulce recomiendan el método de desinfección basado en los siguientes pasos:

1) lavar las varetas con agua corriente, 2) sumergir las varetas en alcohol etílico al 80% durante 5 minutos, 3) inmersión de las varetas en una solución de hipoclorito de calcio filtrado 9% durante 20 ó 40 minutos (debido a que no hay diferencia), y 4) lavado del material (porciones de vareta) por tres ocasiones sucesivas con agua destilada-esterilizada. Reportan que el mayor grado de cultivos asépticos se logran con varetas obtenidas a partir de plántulas de invernadero (97%), mientras que en varetas provenientes de una huerta (de una edad de 20 años) existe mayor porcentaje de contaminación y un menor porcentaje de cultivos asépticos (sólo de 22%).

b) Medio de cultivo

El medio de cultivo es uno de los factores esenciales para el crecimiento y desarrollo de los tejidos vegetales en la propagación in vitro. En establecimiento (Estado I) se busca proporcionar las condiciones necesarias para supervivencia y desarrollo del propágulo, en ocasiones es necesario incluir antioxidantes y antibióticos para evitar el deterioro del material vegetal y el desarrollo de microorganismos. Durante la proliferación (Estado II) se busca la máxima multiplicación del propágulo. En el estado de preparación para el establecimiento de las plántulas en el suelo (Estado III) el medio debe contener sustancias que promuevan la formación de raíces en los brotes formados (Murashige, 1974).

La composición del medio se puede simplificar en 3 categorías según Murashige (1974):

- I. Mezcla de sales inorgánicas (minerales)
- II. Sustancias orgánicas
- III. Complejos naturales

Señalando que en lo que se refiere a la composición del medio, existen toda una serie de modificaciones de acuerdo a los requerimientos específicos de las especies vegetales basados en la variabilidad de los genotipos vegetales.

Uno de los medios de cultivo más utilizados para la propagación in vitro de manzano es el de Murashige y Skoog (MS) (1962), (reportado por Jones et al. (1977), Jones et al. (1979), Werner y Boe (1980), Snir y Erez (1980), Morini (1980) y Villegas (1982), al cual se le han realizado modificaciones en tipo y concentración de reguladores del crecimiento, y concentración de nutrientes en el medio, variando suplementos (sustancias orgánicas principalmente), siendo los reguladores del crecimiento los más comunes: Bencilaminopurina (BA), Cinetina (K), Acido Indolbutírico (AIB), Acido Indolacético (AIA) y Acido Giberélico (AG₃), en concentraciones que oscilan de 0.1 a 3.0 mg/l, siendo normalmente complementado con 100 mg/l de Myoinositol, 1.0 mg/l de Tiamina dicloro, 162 mg/l de Floroglucinol (FG), 0.5 mg/l de Piridoxina y 0.5 mg/l de Acido Nicotínico, 30 gr/l de Sacarosa y de 5 a 7 gr/l de Agar, ajustando el pH a 5.5 (Villegas, 1982).

Werner y Boe (1980) mediante la dilución del medio a un 50% de su

concentración (medio MS) lograron tener una mayor respuesta del porta-injerto M 7 a la proliferación, al igual que cuando emplearon la dilución al 33% para el enraizamiento; asimismo Hyndman et al. (1982) reportan que la dilución del medio tiene un efecto positivo en el enraizamiento.

3.3. Proliferación

a) Formación de brotes

Los brotes se pueden formar a partir de yemas axilares o adventicias; las yemas axilares se localizan en la axila de la hoja y pueden ser estimuladas en un medio que contenga concentraciones relativamente altas de citocininas; a intervalos de 4 a 6 semanas los pequeños brotes formados pueden ser separados y subcultivados individualmente; las plantas obtenidas de esta forma presentan poca variabilidad genética. La producción de brotes adventicios se puede lograr a partir de callos, los cuales se localizan generalmente en la base de los brotes; sin embargo la emergencia de brotes directamente del propágulo (ápice colocado directamente en el medio de cultivo) puede ser observado directamente (Murashige, 1977).

Abbott y Whiteley (1976) en un trabajo realizado con manzano cv 'Cox's Orange Pippin' utilizan yemas obtenidas en la fase juvenil y en la fase adulta, señalan que en las obtenidas en la fase juvenil los brotes son producidos a partir del callo localizado en la base del brote (adventicios) y a partir de yemas axilares, mostrando además que los brotes adventicios se forman a partir de unidades meristemáticas localizadas en

el área basal, y no tiene ninguna conexión vascular con el eje del brote establecido inicialmente, mientras que en las yemas obtenidas a partir de plantas adultas, los brotes obtenidos fueron de yemas axilares.

Snir y Erez (1980) mencionan que en la propagación de portainjertos de la serie Malling Merton, MM 104, MM 106 y MM 109, un gran porcentaje de los brotes formados durante la proliferación se originaron a partir de yemas axilares, en un medio complementado con bencilaminopurina y sin auxinas.

Nasir y Miles (1981) señalan que los brotes establecidos del porta injerto EMLA 26 eran de origen axilar, mientras que los obtenidos en los subcultivos fueron de origen axilar y adventicio (generados estos últimos a partir de callos en la base del brote).

Jones et al. (1979) señalan que los brotes formados en cinco cultivares de manzano se originaron aparentemente de meristemas laterales de los brotes que se subcultivan.

b) Factores que influyen en la respuesta de cultivares y portainjertos de manzano a la proliferación in vitro

Dentro de los factores que se han estudiado están: los tipos y concentraciones de reguladores del crecimiento, edad ontogénica y cronológica de la planta, en menor proporción respuesta a diversas concentraciones del medio, y el efecto de los subcultivos en la proliferación de manzano. Todos estos estudios tendientes a incrementar la tasa de pro-

liferación, para así obtener el mayor número de brotes por tubo.

Abbott y Whiteley (1976), utilizando plantas juveniles (plántulas) y adultas del cv 'Cox's Orange Pippin' mencionan que cuando se utilizan plántulas, la respuesta a la proliferación se tiene en aproximadamente 4 semanas, obteniendo de 3 a 6 brotes por tubo, mientras que cuando se utilizan ápices de árboles adultos, después de 8 semanas se lograron de 1 a 4 brotes por tubo. Además, en la determinación del nivel óptimo de reguladores del crecimiento para proliferación, indican que ésta es completamente inhibida por niveles de cinetina (K) por arriba de 5.0 mg/l y por debajo de 0.1 mg/l y con la adición de más de 0.2 mg/l de 2,4 D o ANA, mientras que niveles de 1.0 mg/l de cinetina favorece la formación de brotes; determinando así que cuando se utilizan ápices de plantas adultas la proliferación y desarrollo de los brotes es reducida; mientras que el utilizar plantas en estado juvenil no presenta grandes limitantes en cuanto a formación y desarrollo de brotes.

Jones et al. (1977) señalan que en propagación in vitro del porta-injerto M 26 potencialmente se pueden llegar a obtener hasta 60,000 brotes a partir de un sólo ápice en un período de 8 meses. Utilizando el medio de cultivo de MS, complementado con 1.0 mg/l de BA, 0.1 mg/l de AG_3 y la adición de 162 mg/l de Floroglucinol, señalan que este último compuesto estimula la proliferación y crecimiento de los brotes. Ellos mencionan que cultivando inicialmente los ápices en tubos de ensaye con 10 ml del medio de cultivo formaron de dos a cinco brotes en cuatro semanas, transfiriéndolos posteriormente a un matraz con 125 ml de medio de cultivo; para su subcultivo se formaron de 20 a 42 brotes de una lon-

gitud entre 2 y 5 cm después de 8 semanas. Suponiendo que los primeros 20 brotes se forman a los 3 meses y en subcultivos mensuales de éstos se obtienen 5 brotes por tubo, en ocho meses se pueden obtener más de 60,000 brotes a partir de un sólo ápice.

Jones et al. (1979) en un trabajo posterior en la propagación in vitro de cinco cvs de manzano (Malling Kent, Malling Suttan, James Grive, Cox's Orange Pippin y Golden Delicious) todos ellos de 4 años de edad, utilizando el medio de cultivo para el portainjerto M 26 (Jones et al., 1977), con 20 ápices de una longitud de 0.5 a 1.0 mm y 30 de 5 a 8 mm de cada cultivar. Reportan que todos los ápices pequeños y de 12 a 18 de los ápices grandes murieron en el primer mes de cultivo. Cultivando los ápices remanentes produjeron de 4 a 5 brotes en tres semanas, llegando a producir de 1,000 a 3,000 brotes de cada cultivar en 8 meses.

Zimmerman (1980) menciona que en el laboratorio de micropropagación en Beltsville se está investigando para obtener cultivares de manzano que crezcan sobre sus propias raíces en altas densidades de plantación. Basados en el medio utilizado por Jones et al. (1977), eliminando el floro glucinol y complementando con 1.0 mg/l de BA, 0.1 mg/l de AG_3 y de 0.1 a 0.5 mg/l de AIB, al utilizar 1.0 mg/l de AIB ocasiona una excesiva formación de callo en la base de los brotes, obteniendo después de 3 a 4 semanas de 3 a 5 brotes por subcultivo.

Snir y Erez (1980) utilizando ápices de manzano de los portainjertos MM 104, MM 106 y MM 109 en un medio de cultivo de una composición similar al de Jones et al. (1977), eliminando el floro glucinol debido a que

en experimentos preliminares no presentaba ventajas, obtuvieron así por subcultivo al mes 5 brotes por tubo, y señalan que al utilizar un medio líquido en comparación con un medio sólido, se obtiene un mayor crecimiento de los brotes en el líquido (posiblemente por el incremento en la absorción de reguladores del crecimiento y nutrientes del medio no sólo a través de la base de los brotes sino de las yemas y toda su superficie).

Morini (1980) en ensayos preliminares sobre la posibilidad de propagación in vitro de los portainjertos M 26, EMLA 27 y MM 106 y de los cultivares Golden Delicious, Stark Spur, Golden Delicious y Starkrimson, menciona que sólo M 26 y EMLA 27 mostraron una baja tasa de proliferación y los demás ninguna respuesta, en el medio de MS complementado con 1.0 mg/l de BA, observando además que los brotes obtenidos muestran una reducción en la elongación del tallo, y que al agregar floriglucinol no incrementa la proliferación ni crecimiento de los brotes.

Singha (1982) utilizando ápices de los cvs de manzano Calocarpa, Eleyi, Almey y Hoapa, basado en el medio de cultivo de MS, complementado con BA en concentraciones de 1, 2, 4 y 8 mg/l, encontraron que cuando se incrementan los niveles de BA generalmente se forman un número mayor de brotes pero de tamaño pequeño y arrosetado (menores de 0.5 cm).

Werner y Boe (1980) trabajan con ápices del portainjerto M 7 utilizando el medio de MS diluido a un 50% de su concentración, complementado con 0.5 mg/l de BA para proliferación, reportan que llegan a obtener 13 brotes por tubo en subcultivos de 4 a 6 semanas. Después de 4 semanas de subcultivos los brotes mostraron aparentemente datos de toxicidad por BA,

por lo que la sustitución periódica de Zip por BA eliminó la toxicidad en los cultivos, pudiéndose mantener los cultivos del portainjerto M 7 durante un año en proliferación.

Villegas (1982) utilizando ápices provenientes de cinco cvs de manzano (Elah, Michal, Tropical Beauty, Pettingill y Hume) menciona que la concentración del medio afecta la formación de callo, ya que al utilizar un medio de cultivo con las sales minerales de MS al 100% favorece la formación de callo en los cvs, mientras que al emplear un medio de cultivo diluido al 50%, se reduce la formación de callo y se incrementa la formación de brotes. Además, señala que al subcultivar los brotes se observa una tendencia a incrementar el número de brotes por tubo al aumentar los subcultivos, mostrando que existe diferencia altamente significativa entre el subcultivo 1 y 3, además de una diferencia de hasta 15 brotes por tubo entre el cv Elah y el cv Tropical Beauty, debido probablemente a una mayor aclimatación de los brotes a las condiciones ambientales in vitro.

3.4. Enraizamiento

- a) Factores que influyen en la respuesta de cultivares y portainjertos de manzano al enraizamiento in vitro

Dentro de los factores que se consideran en la propagación in vitro de manzano está el bajo porcentaje de enraizamiento de los brotes obtenidos, aún cuando existen trabajos en los que se reportan altos porcentajes de enraizamiento; sin embargo, para favorecer el desarrollo de raíces se sugiere:

- Eliminación de citocininas del medio de cultivo y elevar el nivel de auxinas a una concentración tal que favorezca la aparición y desarrollo de raíces (Feucht y Dausend, 1976).
- Agregar compuestos fenólicos que actúen conjuntamente con los reguladores del crecimiento empleados para enraizamiento (Jones y Hatfield, 1976).
- Reducción de la concentración de sales en le medio de cultivo (Hyndman et al., 1982; Lane, 1978).

Werner y Boe (1980) mencionan que varios investigadores han cultivado ápices de manzano in vitro pero han reportado la dificultad existente para la inducción y diferenciación de raíces.

Abbott y Whiteley (1976) en enraizamiento del cv 'Cox's Orange Pippin' utilizando un medio de cultivo, conteniendo AIB, ANA o AIA en concentraciones de un rango de 0.1 a 10.0 mg/l, mencionan que con ninguno de estos compuestos y concentraciones, se obtuvieron resultados en la iniciación de raíces, produciendo en algunos cultivos y de forma irregular raíces en el callo formado en la base del brote. Por otra parte, empleando el método de inmersión basal del brote en una solución de AIB a una concentración de 1 mg/l durante 15 minutos e introduciéndolo en un medio de cultivo líquido con niveles reducidos de cinetina (0.1 mg/l), obtienen después de 14 días callosidades y un 30% de enraizamiento en los brotes. En otro experimento, utilizando sólo 0.1 mg/ml de AIB durante 8 horas, se logró más del 50% de enraizamiento pero mostrando éste una variación considerable, encontrándose además una mayor consistencia en cuanto

a formación de raíces, cuando los brotes en el tratamiento con AIB, se colocaron en posición inversa dentro del medio, obteniéndose con esta técnica un 80% de enraizamiento, con raíces más vigorosas en crecimiento, y un mayor número de ellas por brote.

Jones y Hatfield (1976) utilizando diferentes auxinas (AIB, AIA, y ANA) y compuestos fenólicos (floroglucinol, ácido florético, pirogalol, ácido caféico y catecol) en enraizamiento de brotes del portainjerto M 26, mencionan que utilizando un medio de cultivo con AIB al $5 \times 10^{-6}M$ y utilizando floroglucinol y ácido florético, se obtienen porcentajes de enraizamiento del 70 y 60% respectivamente, y la utilización de estos compuestos no afectó el número de raíces por brote (teniendo de 2 a 4 raíces cada uno). El ácido caféico, el catecol y el pirogalol, no incrementaron significativamente el enraizamiento, sugiriendo además que los compuestos fenólicos no actúan únicamente inhibiendo la AIA-oxidasa para prevenir la destrucción de la auxina, sino que pueden ser efectivos aun en dosis elevadas de AIB, mostrando además que los compuestos fenólicos no son efectivos en ausencia de auxinas.

James y Thurbon (1979) colocando brotes del portainjerto de manzano M 9 en un medio complementado con 2.0 mg/l de AIB y 162 mg/l de floroglucinol (FG), manteniendo la mitad de los cultivos en contacto con el medio de enraizamiento durante 38 días, mientras que la otra mitad solamente estuvieron durante 4 días en el medio de enraizamiento y posteriormente fueron transferidos a un medio libre de reguladores del crecimiento; obtuvieron un mayor enraizamiento al utilizar 2.0 mg/l de AIB y floroglucinol, siendo éste de cerca del 70%, además de que se incrementó el

número de raíces por brote, en aquellos que fueron transferidos a los 4 días a un medio libre de reguladores del crecimiento, obteniendo el máximo de brotes enraizados a los 17 días de la transferencia al medio sin reguladores del crecimiento, mientras los que permanecieron en contacto directo con el medio de enraizamiento formaron abundante callo, además de producir un número reducido de raíces.

Jones et al. (1977) mencionan que colocando brotes del portainjerto de manzano M 26 en un medio complementado con 1.0 mg/l de AIB y 162 mg/l de FG, obtuvieron un 97% de enraizamiento, con una longitud de las raíces de 2 a 6 cm después de 6 semanas, confirmando así los resultados obtenidos por Jones y Hatfield (1976).

Jones et al. (1979) en el enraizamiento de 5 cvs de manzano (Malling Kent, Malling Suttan, James Grive, Cox's Orange Pippin y Golden Delicious) reportan un 80% de enraizamiento en el medio utilizado por Jones et al. (1977) después de 4 semanas de cultivo.

Snir y Erez (1980) utilizando brotes de los portainjertos MM 104, MM 106 y MM 109, de una longitud aproximada de 2 cm, en un medio de cultivo con sales minerales de MS diluídas al 50% de su concentración y complementado con 1.0 mg/l de AIB para favorecer la inducción de raíces, después de 6 a 8 días en que se observan las iniciales de raíces son transferidos a un medio similar al utilizado para la inducción sólo que en lugar de AIB contiene carbón activado al 0.25%, obteniéndose un 100% de enraizamiento y cerca de 20 raíces por brote, señalando que el motivo por el cual se realiza la doble transferencia es para prevenir la forma-

ción de callo en la base de los brotes y mencionan que la influencia del carbón activado en el medio de cultivo es especialmente para permitir que las raíces desarrollen una mayor longitud, además que puede llegar a adsorber los excesos de AIB y otros materiales que pueden inhibir el crecimiento y desarrollo de las raíces, y así mismo puede proporcionar obscuridad en la zona radical.

Werner y Boe (1980) mencionan que en el enraizamiento de brotes del portainjerto Malling 7, utilizando un medio con las sales de MS al 33%, 0.27% de agar y 1, 2 y 3 mg/l de AIB, señalando que cuando se utilizan 2.0 mg/l de AIB a los 18 días se tiene un 88% de enraizamiento y a los 28 días se llega al 100%, mientras que al utilizar 1.0 mg/l de AIB sólo se logró un 79% de enraizamiento en el mismo tiempo, atribuyendo el alto porcentaje de enraizamiento probablemente al bajo nivel de agar empleado o también la reducida concentración de sales, lo cual favorece el enraizamiento.

Hyndman et al. (1982) al trabajar con brotes de rosa (Rosa hybrida L.) mencionan que el número y longitud de raíces por brote se pueden ver incrementados, cuando la concentración de sales (MS) en el medio de cultivo se encuentran diluidas al 12.5 a 25% de su concentración, principalmente dentro del grupo de nitratos, promoviendo esto una mayor actividad rizogénica en los brotes.

Singha (1982) utilizando brotes de cultivares de manzano (Calocarpa, Eleyi, Almey y Hopa) en un medio con concentraciones de sales minerales de MS al 50%, complementado con 0.1, 0.2, 0.4 y 0.8 mg/l de ANA,

señalando que con las concentraciones mayores el porcentaje de brotes enraizados se incrementa, pero el desarrollo y longitud de las raíces se ve inhibido, teniendo así que los niveles de 0.1 y 0.2 mg/l de ANA promueven un buen desarrollo y crecimiento de las raíces.

Villegas (1982) menciona que al enraizar brotes de cvs de manzano (Elah, Michal, Tropical Beauty y Pettingill) utilizando 1 mg/l de AIB en el medio de cultivo se observa un desarrollo excesivo de callo en la base de las estacas, así como la defoliación y detención del crecimiento, y al utilizar AIB más floriglucinol reporta porcentajes de enraizamiento de 30% para el cv Michal, 50% para el cv Pettingill, 60% para el cv Elah y 70% para el cv Tropical Beauty; mencionando que cada brote tenía como promedio de 3 a 5 raíces de 32 a 53 mm de longitud.

Zimmerman (1980) reporta que para el enraizamiento de brotes de manzano, el mayor porcentaje se obtiene al utilizar un medio líquido, que cuando se utiliza un medio complementado con agar, señala además que los brotes que no enraizan in vitro al ser tratados con 1 ó 10 mg/l de AIB, lograron enraizar bien cuando fueron colocados bajo nebulización en el invernadero.

Zimmerman y Brome (1981) utilizando brotes de 8 cvs de manzano (Ozark Gold, Spartan, Stayman, Summer Rambo, Northern Spy, Delicious, Nugget y Spuree Rome) en el medio de MS, complementado con 0.1 y 1.0 mg/l de AIB, con y sin la adición de 162 mg/l de FG, mencionan en base a los resultados obtenidos que el floriglucinol no muestra una consistencia de finida para la estimulación del enraizamiento de dichos cultivares, en-

contrándose que el FG no promueve el enraizamiento de los cvs Northern Spy, Summer Rambo y Delicious, y con menor efecto en el cv Ozark Gold, Nugget, Spuree Romme y Stayman, estimulando únicamente el enraizamiento de una manera consistente en el cv Spartan, mostrando además variaciones en cuanto a enraizamiento para una misma concentración de AIB entre cultivares del 40 al 100%, señalan también que el mayor número de raíces se forma al utilizar 1.0 mg/l de AIB con o sin floroglucinol, mostrando así que el floroglucinol no es esencial en el enraizamiento de algunos cultivares de manzano.

3.5. Condiciones ambientales

Dentro de los principales factores a considerar dentro de la incubación de los cultivos están luminosidad y temperatura, y en menor proporción la humedad relativa (Murashige, 1974).

a) Luminosidad

La luminosidad en el cultivo de tejidos es considerada a través de la intensidad, horas luz durante el día (fotoperíodo) y calidad de la luz.

Debido al suministro exógeno de nutrientes en los estados I, II y III la fotosíntesis no constituye una actividad necesaria; sin embargo, la luminosidad es uno de los factores que se consideran para la formación de brotes. Se considera una intensidad luminosa de 1000 a 10,000 lux, obteniendo una mejor respuesta de 2,000 a 3,000 lux (Murashige, 1974). Respecto al fotoperíodo dentro de los que más se han reportado

son de 16 horas luz continuas (Abbott y Whiteley, 1976; Jones et al., 1977), emitida dicha luz por lámparas fluorescentes, mencionan que la calidad de la luz puede llegar a estimular la formación de brotes o bien de raíz, requiriéndose para la formación de brotes alrededor de 420 nM, mientras que para el enraizamiento, 660 nM. Se obtuvieron resultados satisfactorios.

b) Temperatura

La temperatura más utilizada para la incubación de brotes de manza no es ligeramente arriba de 25°C con una variación de $\pm 1^\circ\text{C}$ (Abbott y Whiteley, 1976; Jones et al., 1977), debiendo considerar a la temperatura a la cual se desarrolla la especie a propagar en forma natural, siendo para frutales tropicales una mayor temperatura (Murashige, 1978). Zimmerman (1980) menciona que con 24°C se obtiene una buena actividad y desarrollo de los brotes de manzano, no existiendo en la actualidad reportes sobre daños por luminosidad y temperatura en la incubación de cultivos in vitro.

3.6. Conclusiones sobre la Revisión de Literatura

Es factible la obtención de plantas a partir del cultivo de ápices de manzano in vitro, utilizando más comúnmente yemas axilares y apícales. Dentro de los factores que ofrece limitantes se encuentra la edad de la planta, debido a que cuando se trabajó con plantas en estado juvenil bajo condiciones de invernadero se tiene una respuesta más rápida y mayor desarrollo de brotes.

Existe una respuesta diferencial entre cultivares y portainjertos (aun dentro de cada grupo) lo que hace necesario que se adecuen las metodologías para la propagación in vitro de cada uno de ellos.

En lo que se refiere al establecimiento de los ápices existen pocos trabajos donde se reporten la contaminación, formación de brotes, callos y yemas no desarrolladas, mencionando únicamente aquéllos que desarrollaron brotes, de ahí que no se pueda estimar la eficiencia de cada método de desinfección.

Para la proliferación se reporta que una concentración de citocininas mayor que de auxinas promueve el desarrollo de brotes, pudiendo éstos tener dos orígenes principales; axilares y adventicios; la dilución del medio al 50% de su concentración de sales minerales MS tiene un efecto positivo, debido a que llegan a formar hasta 13 brotes por tubo, sin embargo existen pocos trabajos en donde se menciona el efecto de los subcultivos continuos sobre la formación de brotes y la tendencia de la tasa de multiplicación.

En el enraizamiento se requiere de auxinas en una determinada concentración para la formación de raíces al utilizar concentraciones elevadas favorece el desarrollo de callo; al utilizar compuestos fenólicos, como el floriglucinol que actúa en sinergismo con las auxinas en el enraizamiento, los resultados obtenidos son poco consistentes debido a que algunos cultivares y portainjertos en ausencia de éste enraizan, pero al utilizar auxinas exclusivamente ocasiona que el desarrollo de las raíces sea reducido. Otro de los aspectos que puede favorecer el enraiza-

miento de la dilución de las sales minerales de MS al 50% o un poco menos de su concentración, incrementando así el porcentaje de cultivares y portainjertos enraizados.

Respecto a las condiciones de incubación, los factores principales son luminosidad y temperatura, mostrando un buen crecimiento y desarrollo de los brotes de manzano in vitro con 16 horas luz continuas durante el día y una intensidad luminosa de 2,000 a 3,000 lux y con una temperatura de $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$.

4. MATERIALES Y METODOS

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

4.1. Material vegetativo

Para esta investigación se utilizaron yemas axilares de varetas de manzano (Malus pumila Mill) en crecimiento activo, obtenidas del Campo Experimental "San Martín", con una longitud promedio de 20 a 30 cm, utilizándose el cv Elah y el portainjerto MM 106, cuyas características son las siguientes:

Cultivar Elah. Según Garza (1975), citado por Rodríguez (1977), tiene su época de floración en Marzo en el área de Chapingo, se cosecha a fines de Julio; la primera cosecha se espera en el cuarto año. El árbol es grande, muy productivo, los frutos se forman tanto en espolones como en ramas de un año. El fruto es redondo, ligeramente ovalado, color verdoso-amarillento, de 60 a 80 mm de diámetro, sabor parecido al de los Delicious con excelente aroma y textura.

Portainjerto Malling Merton 106 (MM 106). Según Ortega (1976) lo describe como un portainjerto obtenido de la cruce entre Northern Spy y EM I, semienano, ramos algo abiertos, madera cubierta con pubescencia blanca, algo hinchados en los nudos, lenticelas inconspicuas, yemas de color gris cenizo, hojas aplanadas, más bien brillantes. En el área de Chapingo se considera medianamente prolífico en acodo de cepa, con brotes vigorosos. Produce un árbol semienano, pequeño en suelos ligeros, media-

namente bien anclado, no emite chupones, su hábito es moderadamente abierto y erecto para utilizar el líder central. Poco susceptible a las bajas temperaturas en el invierno, se considera resistente al pulgón lanígero.

4.2. Medio de cultivo

El medio básico empleado fue el de Murashige y Skoog (MS) (1962), con algunas modificaciones, el cual ha sido utilizado comúnmente para la propagación in vitro de portainjertos y cultivares de manzano y de una gran diversidad de especies (Apéndice 1).

a) Establecimiento de las yemas (Fase 1)

Se utilizaron las sales minerales del medio MS al 100 y 50% de su concentración, complementando con 1.0 mg/l de tiamina dicloro, 100 mg/l de mioinositol, 0.5, 1.0 y 1.5 mg/l de bencilaminopurina (BA) y 0.2 mg/l de ácido indolbutírico (AIB), 30 gr/l de sacarosa y 5 gr/l de agar, ajustando el pH a 5.5. con NaOH (1 N) (Cuadro 2).

Cuadro 2. Tratamientos para el establecimiento de yemas axilares de manzano cv Elah y del portainjerto MM 106

Tratamiento	Concentración del medio MS (%)	BA (mg/l)	AIB (mg/l)
I	50	0.5	0.2
II	50	1.0	0.2
III	50	1.5	0.2
IV	100	0.5	0.2
V	100	1.0	0.2
VI	100	1.5	0.2

b) Subcultivos (Fase II)

Para el primer subcultivo se emplearon los tratamientos que durante el establecimiento las yemas contenidas en ellos mostraron una mayor respuesta respecto a la formación y desarrollo de brotes, a fin de observar la respuesta y grado de proliferación de los brotes formados. Dichos tratamientos son el número III y VI del Cuadro 2, transfiriendo aquéllos que habían desarrollado mejor en el medio al 50% al tratamiento III y los que desarrollaron mejor en concentraciones al 100% al tratamiento VI, independientemente de la concentración de reguladores del crecimiento en el cual se habían desarrollado.

Para los subcultivos 2, 3 y 4 se utilizó únicamente el medio III del Cuadro 1, debido a la respuesta del material vegetativo a este medio.

c) Enraizamiento (Fase III)

Se realizaron diversos experimentos tendientes a observar la respuesta de los brotes del cultivar Elah y de los del portainjerto MM 106 al enraizamiento.

c.1) Enraizamiento con exposición permanente a reguladores del crecimiento

Se utilizaron las sales del medio de cultivo de MS al 50%, complementado con 1 mg/l de tiamina dicloro, 100 mg/l de mioinositol, utilizando concentraciones de 0.2 y 0.5 mg/l de AIB, 162 mg/l de floriglucinol (FG), 1 gr/l de carbón activado (CA), 30 gr/l de sacarosa, 5 gr/l de

agar, ajustando el pH a 5.5 (Cuadro 3).

Cuadro 3. Tratamientos para enraizamiento bajo exposición permanente a reguladores del crecimiento de brotes del cv Elah y del portainjerto MM 106

Tratamiento	AIB (mg/l)	Floroglucinol (mg/l)	Carbón activado (gr/l)
I	0.2	162	-
II	0.2	-	1.0
III	0.2	-	-
IV	0.5	162	-
V	0.5	-	1.0
VI	0.5	-	-

c.2) Enraizamiento con exposición parcial a reguladores del crecimiento

En este tipo de tratamientos se utilizó un medio para promover la inducción y otro para la diferenciación de raíces.

- Inducción

Se emplearon las sales del medio de cultivo MS al 50% de su concentración, complementando con 1 mg/l de tiamina dicloro, 100 mg/l de mioinositol, 1.0 y 2.0 mg/l de AIB, 162 mg/l de floroglucinol, 0.1 mg/l de BA, 30 gr/l de sacarosa y 5 gr/l de agar, ajustando el pH a 5.5.

- Diferenciación

Se utilizó un medio con las sales de MS al 50%, con 1 mg/l de tia-

mina dicloro, 100 mg/l de myoinositol, 30 gr/l de sacarosa y 5 gr/l de agar, ajustando el pH a 5.5.

Los brotes permanecieron en el medio para la inducción de raíces durante 7 días y posteriormente se transfirieron al medio para diferenciación.

d) Elaboración del medio de cultivo

Para la elaboración del medio de cultivo se siguió el siguiente procedimiento:

- Elaboración de las soluciones madre (I, II, III, IV y V) (Apéndice 1), de las cuales se toman 10 ml de cada una; se vertieron de acuerdo a ese orden en un matraz aforado de 1 litro, conteniendo de 500 a 700 ml de agua destilada.
- Los demás componentes fueron agregados de acuerdo al orden y cantidad antes citados.
- El pH fue medido antes de agregar el agar con un potenciómetro, ajustándolo a 5.5.
- Para disolver el agar se colocó en baño maría dentro de la autoclave durante 20 minutos.
- Una vez disuelto se distribuyó en tubos de ensaye de fondo plano de 2.5 x 10 cm ó 2.5 x 16 cm, utilizando una jeringa graduada de flujo continuo, agregando de 10 a 12 ml por tubo.

- Tapado y sellado perfectamente de los tubos con papel aluminio.
- Esterilización de los tubos tapados y sellados en autoclave a 121°C (20 lbs/pulg²) durante 15 minutos, en el enfriamiento, donde el medio adquiere una consistencia semi-sólida se colocaron és tos en posición inclinada para obtener así una mayor superficie de contacto.

4.3. Corte del material vegetativo

En el mes de Junio de 1982, se cortaron varetas de 20 a 30 cm de longitud, en el campo se eliminaron las hojas para evitar la deshidratación del material, colocándolas en una bolsa de polietileno que contenía agua destilada y se transportaron así al laboratorio, cortando las varetas al momento de utilizarlas.

a) Desinfección

Se empleó el método de desinfección reportado por Villegas (1982), el cual consiste en el siguiente procedimiento: Se lavan las varetas en el laboratorio con jabón y estropajo, en seguida se cortan en segmentos de 1.0 - 1.5 cm que contienen una yema, colocando éstas en un vaso de precipitados de 150 ml, que contiene agua destilada, enjuagándose por 3 ó 4 ocasiones. En la campana de flujo laminar, en el vaso de precipitados que contenía las fracciones o segmentos de varetas se vertió alcohol etílico al 70% durante 3 minutos, retirando posteriormente el alcohol y agregando una solución de Hipoclorito de Calcio al 4%, el cual es consi-

derado un esterilizante de contacto, durante 30 minutos; finalmente se enjuagaron de 3 a 4 veces con agua destilada-esterilizada, manteniendo durante todo el proceso las fracciones de vareta dentro del vaso de precipitados. El procedimiento anterior se realizó con la ayuda de 3 mecheros de alcohol y tapando el vaso de precipitados con papel aluminio para garantizar las máximas condiciones de asepsia.

b) Implantación del material vegetativo en el medio de cultivo

La implantación se realizó en la campana de flujo laminar para asegurar las condiciones de asepsia, los tubos en los que se contenía el medio de cultivo fueron flameados inicialmente, introduciendo en alcohol al 96% la parte tapada con aluminio y colocándola cerca de los mecheros de alcohol. El ápice se extrajo a partir de las fracciones de vareta previamente esterilizadas, utilizando para ello un microscopio de disección, eliminando las brácteas externas de la yema, hasta dejar una porción de 2-3 mm, aproximadamente, colocando ésta en los tubos con medio de cultivo, para esto la tapa de aluminio es aflojada de tal manera que se pueda quitar fácilmente con una mano, implantando una yema por tubo; posterior a la siembra, la tapa de aluminio se introduce en alcohol al 96% y se flama para cubrir el tubo, sellándolo con la mano y amarrándolo con una liga de hule.

Manteniendo en todos los casos los tubos con las yemas implantadas, así como las yemas y los tubos sin implantar la yema aún, dentro de la campana de flujo laminar y cerca de la flama de los mecheros.

Las pinzas y bisturí utilizados para el corte e implantación de cada yema, se sumergieron en alcohol y se flamearon antes de realizar cada corte; la platina del microscopio se limpió entre corte y corte con alcohol al 96% para eliminar residuos, lo mismo se hizo con las manos para obtener mejores condiciones de asepsia.

4.4. Condiciones de incubación

Las yemas implantadas se incubaron en un cuarto de cultivo, con temperatura controlada a $27 \pm 1^{\circ}\text{C}$, empleando un calentador IEM Solar automático; el fotoperíodo se reguló a 16 horas luz por día, utilizando un reloj Midtex Cyclomaster, con luz emitida por lámparas fluorescentes.

Se colocaron los tubos sobre repisas de cristal y se mantuvo cerrada la puerta para evitar la introducción de partículas extrañas.

4.5. Materiales y equipo

a) Material de laboratorio

- Tubos de ensaye fondo plano (25 x 100 y 25 x 160 mm)
- Vasos de precipitados de 15, 20, 1000 y 2000 ml
- Matraz aforado de 500 a 2000 ml
- Matraz erlenmeyer de 1000 y 2000 ml
- Pipetas graduadas de 1, 5 y 10 ml
- Papel aluminio 1001 usos ("Reynolds Wrap")
- Rejillas metálicas de 28 cm de diámetro

- Ligas de hule del No. 18 y 64
- Pinzas para disección de mango largo y punto fino
- Mango para bisturí (No. 3)
- Navajas para bisturí, filo recto (No. 11)
- Marcadores y plumones
- Mecheros de alcohol
- Reactivos

b) Equipo de laboratorio

- Autoclave modelo popular
- Esterilizador de presión
- Potenciómetro (Corning Model 12)
- Balanza analítica (Sartorius 0.0001 g)
- Balanza granataria digital (Ohaus 1500 D)
- Jeringa de flujo continuo (Cornwell 10 ml)
- Microscopio de disección (Olympus Tokyo con lente G 10 X)
- Cuarto de implantación con campana de flujo laminar
- Cuarto de incubación con control de temperatura y fotoperíodo y lámparas fluorescentes

4.6. Fecha de implantación

El establecimiento de las yemas se realizó el 28 de Junio de 1982 para todos los tratamientos en esta fase (I). Los brotes obtenidos fueron subcultivados cada 4 ó 5 semanas durante 4 ocasiones.

En el enraizamiento se estableció inicialmente el medio con expo-

sición parcial a reguladores del crecimiento (7 días), transfiriéndolo después al medio de diferenciación radical libre de reguladores del crecimiento.

4.7. Diseño experimental

a) Establecimiento

Se utilizaron ápices de yemas axilares de manzano de 2 a 3 mm de longitud del cv Elah y del portainjerto MM 106, realizándose un total de 6 tratamientos para cada uno, que se condujeron en forma independiente con un diseño experimental completamente al azar (D.C.A.) con 4 repeticiones de cinco tubos cada una; la unidad experimental estuvo constituida por cinco tubos de ensaye, el total de tubos fue de 240.

- Factores de estudio

Medios: Completo (100% de concentración de sales minerales) y diluído (50% de concentración de sales minerales)

Material vegetativo: cv Elah y portainjerto MM 106

Reguladores del crecimiento: Dosis de bencilaminopurina (0.5, 1.0 y 1.5 mg/l)

b) Proliferación

Las yemas que generaron brotes durante el establecimiento se transfirieron a un medio de cultivo para proliferación (subcultivos); para el segundo subcultivo se utilizaron los brotes obtenidos en el primero, utilizando así sucesivamente los brotes obtenidos en el cultivo

precedente hasta el subcultivo cuatro. El diseño utilizado fue completamente al azar (D.C.A.) con 10 repeticiones, la unidad experimental la constituyó un tubo de ensaye, y el total de tubos para evaluar por subcultivo fue de 20.

- Factores de estudio

Subcultivos: Primero, segundo, tercero y cuarto

Material vegetativo: cv Elah y el portainjerto MM 106

c) Enraizamiento

En los experimentos realizados para enraizamiento (exposición permanente y parcial a reguladores del crecimiento) el diseño utilizado fue completamente al azar (D.C.A.) con 10 repeticiones, la unidad experimental estuvo constituida por un tubo de ensaye; el total de tubos fue de 120 para el primer experimento y de 20 para el segundo.

- Factores de estudio

Reguladores del crecimiento: Auxina, auxina más floriglucinol, auxina más carbón activado (bajo condiciones de exposición permanente) y auxina más floriglucinol (en exposición parcial)

Material vegetativo: cv Elah y el portainjerto MM 106

4.8. Toma de datos

La toma de datos se realizó en base a los siguientes parámetros:

- a) Contaminación. Todos aquéllos tubos en los que se implantaron yemas o brotes y antes de 72 horas desarrollaron patógenos
- b) Cultivos asépticos. Son aquellos tubos en los que se implantaron yemas o brotes y después de 72 horas no desarrollaron patógenos
- c) Yemas no desarrolladas. Son aquéllas que después de cuatro semanas de implantadas no mostraron actividad
- d) Formación de brotes. Aquéllos que presentaban desarrollo de 4 o más hojas con un eje central, después de cuatro semanas
- e) Número de brotes por tubo en cada subcultivo. El conteo se realizó cuatro semanas después de haber realizado cada transferencia
- f) Formación de raíces. A las cinco semanas de estar en el medio de enraizamiento se cuantificó número y tamaño de raíces por brote

4.9. Análisis de los datos

De cada una de las variables en estudio se obtuvieron las medias aritméticas y porcentajes, y se presentaron gráficamente, además de que se llevaron a cabo análisis de varianza y comparación de medias mediante la metodología estadística establecida.

5. RESULTADOS Y DISCUSION

Los resultados obtenidos así como la discusión de los mismos, se presentan de acuerdo a las fases o etapas desarrolladas.

5.1. Establecimiento (Fase I)

a) Cultivos asépticos y contaminación

Al realizar el análisis de varianza de los datos obtenidos sobre cultivos asépticos (Apéndice 2) se encontró que existe diferencia altamente significativa entre el material vegetativo, pero no así para concentración del medio y dosis de reguladores del crecimiento.

En la comparación de medias entre el cv Elah y el portainjerto MM 106, se encontró que existe diferencia altamente significativa (Cuadro 4).

Cuadro 4. Comparación de medias y porcentajes en la variable cultivos asépticos para el cv Elah y el portainjerto MM 106

Material vegetativo	Cultivos (%)		Media ^{1/}
	Asépticos	Contaminados	
Portainjerto MM 106	96.5	3.5	4.75* a
Cultivar Elah	83.5	16.5	4.20 b
Media	90.0	10.0	

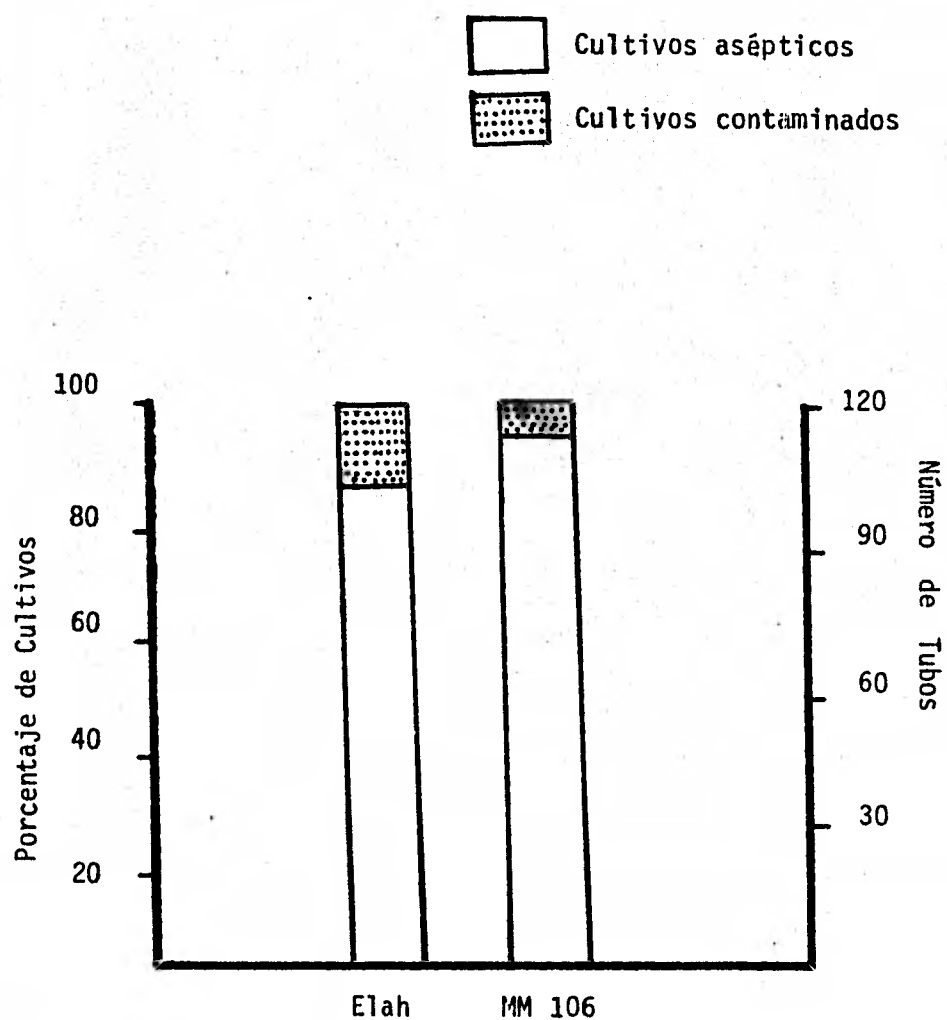
* Valores con la misma letra son estadísticamente iguales ($P \leq 0.01$: 0.3841) de acuerdo con la prueba DMSH de Tukey.

^{1/} Medias obtenidas de 24 repeticiones de 5 tubos cada una.

Respecto al porcentaje de cultivos asépticos se observa que el portainjerto MM 106 presenta mayor porcentaje (96.5%) que el cv Elah (83.5%), teniendo ambos una media de 90%, lo cual nos permite inferir sobre la efectividad del método de desinfección empleado (Cuadro 4, Gráfica 1).

El porcentaje obtenido de cultivos asépticos superan los porcentajes reportados por Werner y Boe (1980), quienes trabajando con portainjertos de manzano reportan una contaminación del 15% en el establecimiento.

Dentro de los factores que afectan la contaminación en los cultivos están: factores anatómicos y morfológicos de las yemas (tamaño, número de brácteas o escamas, grado de pubescencia de las mismas) y el factor humano (habilidad para extraer el meristemo contenido en la yema). Villegas (1982) señala que en base a estos factores se generan diferencias entre cultivares. Otro de los factores que afectan notablemente la contaminación en la edad y lugar en donde se desarrollan las plantas; Giladi et al. (1979) reportan que encontraron diferencias en cuanto a cultivos asépticos al utilizar plantas adultas de cítricos (20 años) creciendo en campo y al utilizar plántulas bajo condiciones de ambiente controlado, reportando porcentajes de cultivos asépticos de 22 y 97% respectivamente, mientras que al utilizar plantas de tres años de edad, las cuales crecieron bajo condiciones de invernadero, obtuvieron un 90% de cultivos asépticos. Las varetas utilizadas en el presente estudio en el caso del cv Elah procedían de árboles adultos, mientras que las del portainjerto MM 106 provenían de plantas acodadas (de cepa) de un año de



MATERIAL VEGETATIVO

Gráfica 1. Porcentaje de cultivos asépticos y contaminados para el cv Elah y el portainjerto MM 106 en seis medios de cultivo.

edad explicando así probablemente la diferencia en el porcentaje de cultivos asépticos.

Respecto al tamaño de yema, Jones et al. (1979) trabajando con cinco cultivares de manzano reportan que al utilizar ápices de tamaño reducido (0.5 a 1.0 mm) se obtuvo una mortalidad del 100% de los ápices, debido muy probablemente a que la porción del ápice utilizado el meristemo no estaba contenido en ella, por el contrario al utilizar fracciones de tamaño mayor (5.0 a 8.0 mm) el porcentaje de mortalidad obtenido fue del 40%; sin embargo al aumentar el tamaño aumenta la posibilidad de contaminación del medio, debido a la mayor retención de partículas extrañas por parte de las estructuras externas del ápice. De las yemas que se utilizaron en el presente trabajo, las del cv Elah tenían una mayor dimensión que las del portainjerto MM 106, lo cual también contribuye a la explicación de las diferencias de porcentaje de cultivos asépticos.

b) Desarrollo de brotes

La formación y desarrollo de brotes a partir de yemas axilares en el establecimiento estuvo estimulada por la concentración del medio y de reguladores del crecimiento.

El análisis de varianza realizado muestra que existen diferencias altamente significativas entre el material vegetativo, concentración de reguladores del crecimiento y la interacción de material vegetativo por concentración del medio, pero no así para la concentración del medio y

la interacción de concentración del medio por reguladores del crecimiento (Apéndice 2).

En la comparación de medias del material vegetativo para la variable desarrollo de brotes, se observa que el portainjerto MM 106 formó una mayor cantidad de brotes a partir de yemas que el cv Elah (Cuadro 5).

Cuadro 5. Comparación de medias para la variable desarrollo de brotes del cv Elah y del portainjerto MM 106

Material vegetativo	Media ^{1/}
Portainjerto MM 106	1.34 a *
Cultivar Elah	0.65 b

* Valores con la misma letra son estadísticamente iguales ($P \leq 0.01$: 0.4755) de acuerdo a la prueba DMSH de Tukey.

^{1/} Medias obtenidas de 24 repeticiones de 5 tubos cada una.

En lo que se refiere a la concentración del medio, no existió en el establecimiento diferencia significativa, ya que el cultivar Elah desarrolló el mayor porcentaje de brotes en el medio diluido (al 50% de su concentración de sales minerales), mientras que el portainjerto MM 106 desarrolló el mayor porcentaje de brotes con el medio completo (100% de concentración de sales minerales); en ambos casos empleando 1.5 mg/l de BA, correspondiendo a los medios III y VI del Cuadro 2. A este respecto y tomando en cuenta la edad y procedencia del material vegetativo, cabe señalar que el portainjerto MM 106 fue reproducido a partir de una plan-

ta juvenil, y según Bould (1970) en la cantidad de reservas acumuladas es mínima en plantas juveniles, mientras que en plantas adultas existe una mayor acumulación de reservas, lo cual coincide con lo encontrado ya que el material vegetativo del cv Elah era de plantas adultas y requirió de una menor concentración del medio de cultivo, no así el portainjerto que requirió de la máxima concentración.

Existen pocos trabajos donde se reporta el desarrollo y formación de brotes en el establecimiento; Villegas (1982) reporta que trabajando con cultivares de manzano en 4 fechas de implantación, existieron fechas en donde el porcentaje de brotes desarrollados fue superior al 80%, pero también en donde el porcentaje fue de tan sólo el 1% (lo cual le da un comportamiento poco consistente, debido probablemente a la concentración de auxina en el medio).

Vasil y Vasil (1972) mencionan que la regeneración de plantas a partir de ápices o de otras estructuras es un fenómeno de gran importancia en las plantas debido a que éstas constituyen los medios de propagación de las diversas especies, sin embargo mencionan que los ápices dentro de una misma planta pueden llegar a tener un comportamiento variable, lo cual hace que existan diferencias en cuanto a formación y desarrollo de brotes, formación de callos y yemas que no desarrollen.

En lo que se refiere a concentración de reguladores del crecimiento durante el establecimiento, la mayor formación de brotes se obtuvo utilizando 1.5 mg/l de BA, la cual fue la máxima concentración empleada, mientras que al utilizar 0.5 y 1.0 mg/l de BA no existió diferencia sig

nificativa, pero mostrando una tendencia a incrementar el desarrollo de brotes al aumentar la concentración de BA en el medio de cultivo (Cuadro 6).

La concentración de 1.5 mg/l de BA fue la que más favoreció el desarrollo de brotes, independientemente de la concentración del medio, ya que el cv Elah a una concentración del medio del 50% y empleando 1.5 - mg/l de BA se obtuvo el máximo desarrollo de brotes, mientras que el portainjerto MM 106 a una concentración del 100% del medio y 1.5 mg/l de BA desarrolló el mayor porcentaje de brotes.

Cuadro 6. Comparación de medias y porcentajes para la variable formación de brotes a partir de yemas del cv Elah y del portainjerto MM 106, con diferentes concentraciones de reguladores del crecimiento

Bencilaminopurina (BA) (mg/l)	Media ^{1/}	MM 106 (%)	Elah (%)
1.5	1.60 a*	50	60
1.0	0.75 b	25	25
0.5	0.65 b	25	15

* Valores con la misma letra son estadísticamente iguales ($P \leq 0.01$: 0.7019) de acuerdo a la prueba DMSH de Tukey.

^{1/} Medias obtenidas de 16 repeticiones de 5 tubos cada una.

Villegas (1982) reporta haber obtenido la mayor proporción de brotes a partir de ápices al emplear 1.5 mg/l de BA, encontrando que esta concentración favorece el desarrollo de brotes en un 10% más que al uti

lizar sólo 1.0 mg/l de BA.

Los resultados obtenidos durante el establecimiento muestran que existe una respuesta diferencial a la formación de brotes, dependiendo de la concentración del medio y reguladores del crecimiento.

5.2. Proliferación (Fase II)

a) Brotes por subcultivo

El número promedio de brotes del cv Elah y del portainjerto MM 106, mostró una tendencia a incrementarse al paso de los subcultivos.

Al realizar el análisis de varianza (Apéndice 2) este muestra que existe diferencia altamente significativa entre el material vegetativo, subcultivos y la interacción material vegetativo por subcultivo.

En el Cuadro 7 se observan las medias para número de brotes por subcultivo, en donde el subcultivo cuatro presenta diferencia altamente significativa con los subcultivos 3, 2 y 1 y a su vez muestran éstos diferencias significativas entre sí.

Cuadro 7. Comparación de medias p-ra la variable número de brotes por subcultivo por tubo del cv Elah y del portainjerto MM 106

Subcultivo	Media ^{1/}
4	16.40 a*
3	11.95 b
2	6.75 c
1	2.70 d

* Valores con la misma letra son estadísticamente iguales ($P \leq 0.01$: 3.2769) de acuerdo a la prueba DMSH de Tukey.

^{1/} Medias obtenidas a partir de 20 repeticiones de un tubo cada una.

La tendencia a incrementar el número de brotes a medida que transcurren los subcultivos puede ser debido a que la planta al estar en contacto con el medio de cultivo, durante un período prolongado de tiempo y en forma continua, desarrollan un mecanismo de adaptación que le permiten una mejor respuesta a las condiciones in vitro; Villegas (1982) menciona una tendencia similar a la obtenida en el presente trabajo. Sin embargo, Lane (1978) cita que el número de brotes por subcultivo decrece al incrementarse éstos, en tanto que Jones et al. (1977) mencionan que el número de brotes por subcultivo se puede mantener constante de un subcultivo a otro, es decir con la misma tasa de proliferación.

b) Brotes por cultivar y portainjerto

En este aspecto los resultados obtenidos muestran que existió una

respuesta diferencial entre el cv Elah y el portainjerto MM 106, si bien el portainjerto MM 106 mostró una mejor respuesta en el establecimiento; sin embargo, no lo fue en la proliferación como la del cultivar Elah. En la comparación de medias en el Cuadro 8 se observa que el cv Elah muestra diferencia altamente significativa con relación al portainjerto MM 106, en donde el cv Elah muestra la máxima tasa de proliferación, observándose además que al paso de los subcultivos tanto el cv Elah y el portainjerto MM 106, muestran la tendencia a incrementar el número de brotes por tubo (Gráfica 2).

Cuadro 8. Comparación de medias para la variable de brotes por tubo para el cv Elah y el portainjerto MM 106 en 4 subcultivos

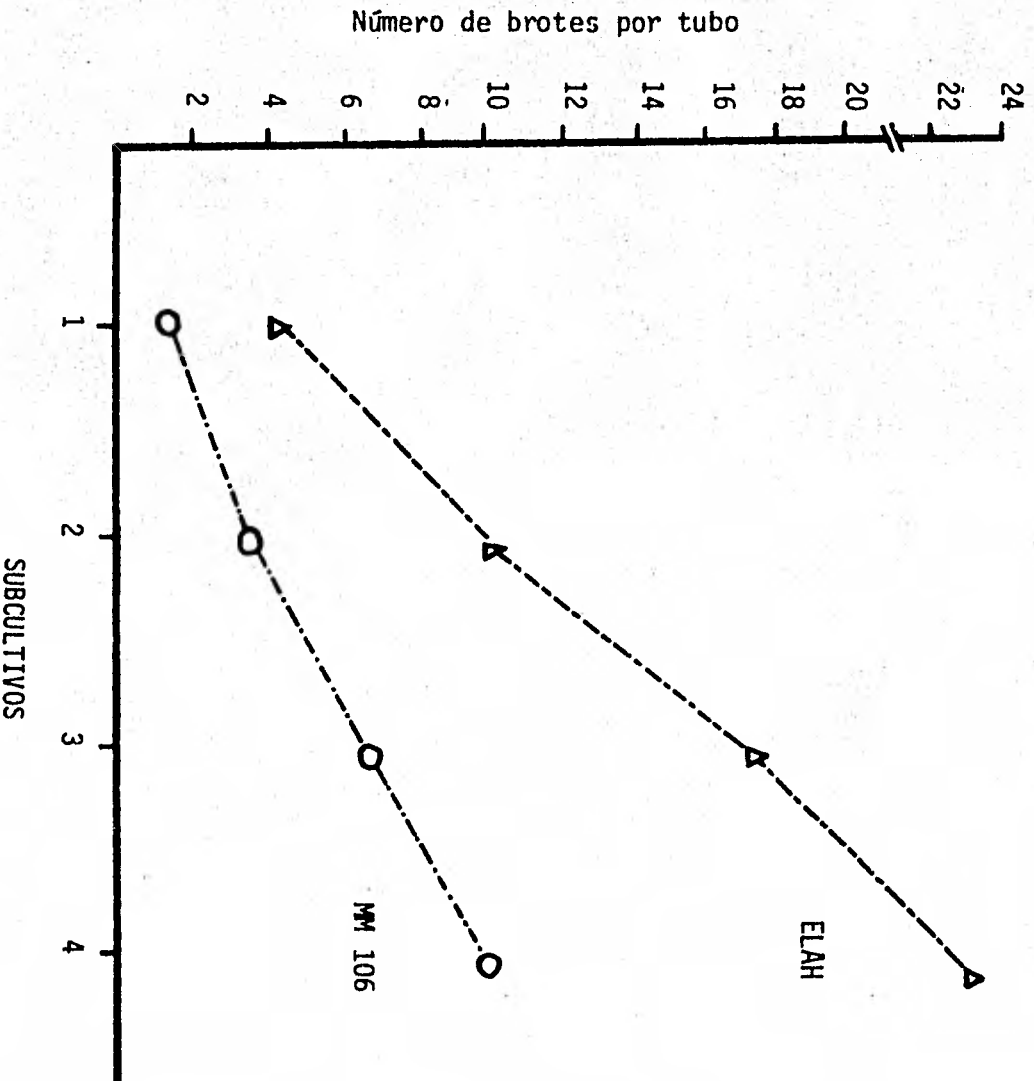
Material vegetativo	Número de brotes por subcultivo ^{1/}				\bar{x}
	1	2	3	4	
Portainjerto MM 106	1.2 a* ^{2/}	3.4 a	6.7 a	10.0 a	5.3
Cultivar Elah	4.2 a	10.1 b	17.2 b	22.9 b	13.8

* Valores con la misma letra son estadísticamente iguales ($P \leq 0.01$: 3.1500) de acuerdo a la prueba DMSH de Tukey.

^{1/} Media obtenida a partir de 10 repeticiones de un tubo cada una.

^{2/} Los brotes obtenidos en este subcultivo del portainjerto MM 106 provenían del medio VI, mientras que los demás fueron obtenidos a partir del medio III (ver Cuadro 2).

En lo que se refiere al número de brotes por subcultivo Jones et al. (1977) mencionaron que en la propagación del portainjerto M 26, potencialmente se podían llegar a obtener más de 60,000 brotes a partir



Gráfica 2. Número de brotes por tubo en cada subcultivo cv Elah y del portainjerto MM 106.

de un solo ápice en un período de 8 meses; con un número de 5 brotes por tubo en cada subcultivo; sin embargo, con la metodología empleada en el presente estudio, se obtuvieron tasas de proliferación mayores, con las que se puede elevar de manera significativa el número de brotes que se pueden obtener potencialmente después de un cierto período de tiempo.

Se puede explicar la diferencia del número de brotes en cada subcultivo del cv Elah y del portainjerto MM 106 considerando que los requerimientos del material vegetativo y por lo tanto la optimización del medio que ofrezca una mejor respuesta de éste, pueden variar de una fase a otra. Murashige (1977) reporta que los requerimientos a través de las fases del cultivo de tejidos son diferenciales, de acuerdo a la etapa en que se desarrolle el material vegetativo, si bien en el establecimiento el medio utilizado para el portainjerto MM 106 fue óptimo debido al mayor desarrollo de brotes a partir de yemas, en la proliferación no tuvo el mismo grado de respuesta, en base a que formó un número menor de brotes por tubo en cada subcultivo que el cv Elah. Otro factor que contribuye a la explicación es el vigor que mostraron los brotes obtenidos a partir del portainjerto MM 106 eran mucho más vigorosos que los del cv Elah, relacionando este aspecto con la dominancia apical citada por Wareing (1970) en la que menciona que a medida que el brote central presenta un mayor vigor las ramificaciones tienden a ser en un número más reducido.

Abbott y Whiteley (1976) mencionan que el mayor número de brotes por tubo y la respuesta del material vegetativo se obtienen al emplear yemas procedentes de plántulas, mientras que al utilizar árboles adultos el número de brotes se reduce notablemente; sin embargo en el presente

estudio, si bien manifestó en la primera etapa una mayor actividad, el portainjerto MM 106 no fue el más prolífico.

Zimmerman (1980) reporta que llega a obtener en cultivares de manzano sólo de 3 a 4 brotes por tubo en cada subcultivo, mientras que Villagas (1982) reporta que es factible llegar a obtener hasta más de 9 brotes por subcultivo como media de 5 cultivares de manzano.

Werner y Boe (1980) reportaron haber obtenido 13 brotes por tubo con la dilución del medio al 50%, los resultados aquí obtenidos y en particular los del cv Elah superan los resultados obtenidos por estos investigadores, mas no así los del portainjerto MM 106, aunque se considera un promedio mayor de brotes por tubo que los reportados en otras investigaciones, cuando utilizan en proliferación un medio completo (100% de concentración de sales minerales de MS) (Jones et al. (1977), Zimmerman (1980), Snir y Erez (1980), remarcando así la importancia que tiene la dilución del medio, lo cual se refleja en una mayor formación y desarrollo de brotes, mencionando además que en el cuarto subcultivo los brotes mostraron daños, esto atribuido a la toxicidad causada por subcultivos periódicos con BA. En el caso del cv Elah y del portainjerto MM 106 en el cuarto subcultivo, no mostraban daños en forma significativa que reflejaran la toxicidad de cuatro subcultivos periódicos con Bencilaminopurina.

c) Origen de los brotes

El origen de los brotes reviste particular importancia debido a que se encontró que cuando se presentaban de origen axilar, el número de ellos era menor que cuando eran de origen adventicio, debido al mayor número de puntos de proliferación. En el cv Elah en los tres primeros subcultivos los brotes obtenidos fueron de origen adventicio, manteniendo esta tendencia en el último subcultivo donde además formó brotes axilares. En el caso del portainjerto MM 106, los brotes obtenidos hasta el tercer subcultivo eran de origen axilar, mientras que en el cuarto subcultivo presentó brotes axilares y adventicios. Lo anterior no coincide con lo reportado por Abbott y Whiteley (1976), quienes mencionan que en varetas de plantas juveniles los brotes formados fueron tanto de origen axilar y adventicio, mientras que los obtenidos de plantas adultas fueron de origen axilar; sin embargo son similares los resultados obtenidos a los de Nasir y Miles (1981) y de Snir y Erez (1980) en los que mencionan que en la propagación de portainjertos de manzano los primeros brotes originados fueron de origen axilar, mientras que en subcultivos posteriores se encontraron brotes tanto de origen axilar como adventicio.

5.3. Enraizamiento (Fase III)

Los resultados obtenidos a partir de diferentes experimentos realizados para el enraizamiento de brotes del cv Elah y del portainjerto MM 106 no fueron sometidos a análisis estadístico debido a la marcada diferencia que existió entre ellos.

a) Exposición permanente a reguladores del crecimiento

- Auxinas

En el enraizamiento del portainjerto MM 106 tuvo en todos los experimentos una mejor respuesta que el cv Elah. Al utilizar auxina en concentraciones de 0.2 y 0.5 mg/l de AIB, el cv Elah presentó únicamente el 10% de enraizamiento para ambas concentraciones, mientras que en el portainjerto MM 106 fue del 40% para las dos concentraciones de AIB antes señaladas, no mostrando así el cv Elah y el portainjerto MM 106 respuesta en cierta forma gradual o proporcional a la concentración de auxina en el medio. James y Thurbon (1979) reportan que cuando se colocan brotes en un medio a exposición permanente a reguladores del crecimiento (auxinas), los brotes forman abundante callo en la base, además de formar un número reducido de raíces. Lane (1978) señala que el enraizamiento es inhibido por elevadas concentraciones de auxinas, además de la excesiva formación de callo, la cual interfiere con el enraizamiento. Las concentraciones utilizadas en el presente trabajo se podrían considerar bajas, no existiendo formación de callo en la base de los brotes, sin embargo la finalidad de emplear estas dosis fue para evitar la doble transferencia señalada por James y Thurbon (1979) y que en un solo medio existiera el desarrollo de raíces. Después de un mes en que los brotes estuvieron en contacto con el medio no se observaron daños apreciables causados por las auxinas, como puede ser la defoliación de los brotes, formación de callo en los nudos del tallo, clorosis y detención del crecimiento observados al usar dosis más altas (Villagas, 1982) (Gráfica 3 y 4).

- Auxinas más floriglucinol

En este experimento se obtuvieron los mayores porcentajes de enraizamiento y mayor desarrollo de las raíces formadas, tanto del portainjerto MM 106 como del cv Elah en los que el porcentaje de cultivos enraizados representó más del 100% que al utilizar auxina sola (Gráfica 3 y 4), obteniendo para el portainjerto MM 106, al utilizar 0.2 y 0.5 mg/l de AIB, complementado con 162 mg/l de floriglucinol, un enraizamiento del 70 y 80% respectivamente, mientras que el cv Elah empleando las mismas concentraciones enraizó 20 y 40% respectivamente, manifestando así claramente el sinergismo de un compuesto fenólico como lo es el floriglucinol y las auxinas, mencionado por Jones y Hatfield (1976) los que reportan porcentajes de enraizamiento del 70%. James y Thurbon (1979) mencionan que existe un mayor desarrollo de raíces al utilizar AIB más floriglucinol, ya que cuando solamente se emplea AIB señalan que éste tiene efecto inhibitorio sobre la elongación y formación de las raíces, estableciendo además que el floriglucinol no es efectivo en ausencia de auxinas en el enraizamiento de brotes.

Tomando en cuenta la sugerencia de Jones y Hatfield (1976) sobre la forma en que actúan los compuestos fenólicos, inhibiendo la AIA-oxidasa para evitar la destrucción de la auxina, incrementando así el porcentaje de enraizamiento al utilizar auxina más floriglucinol que al utilizar solamente auxina. Los resultados obtenidos en el presente estudio son similares, con lo que queda demostrado el sinergismo de auxinas y floriglucinol.

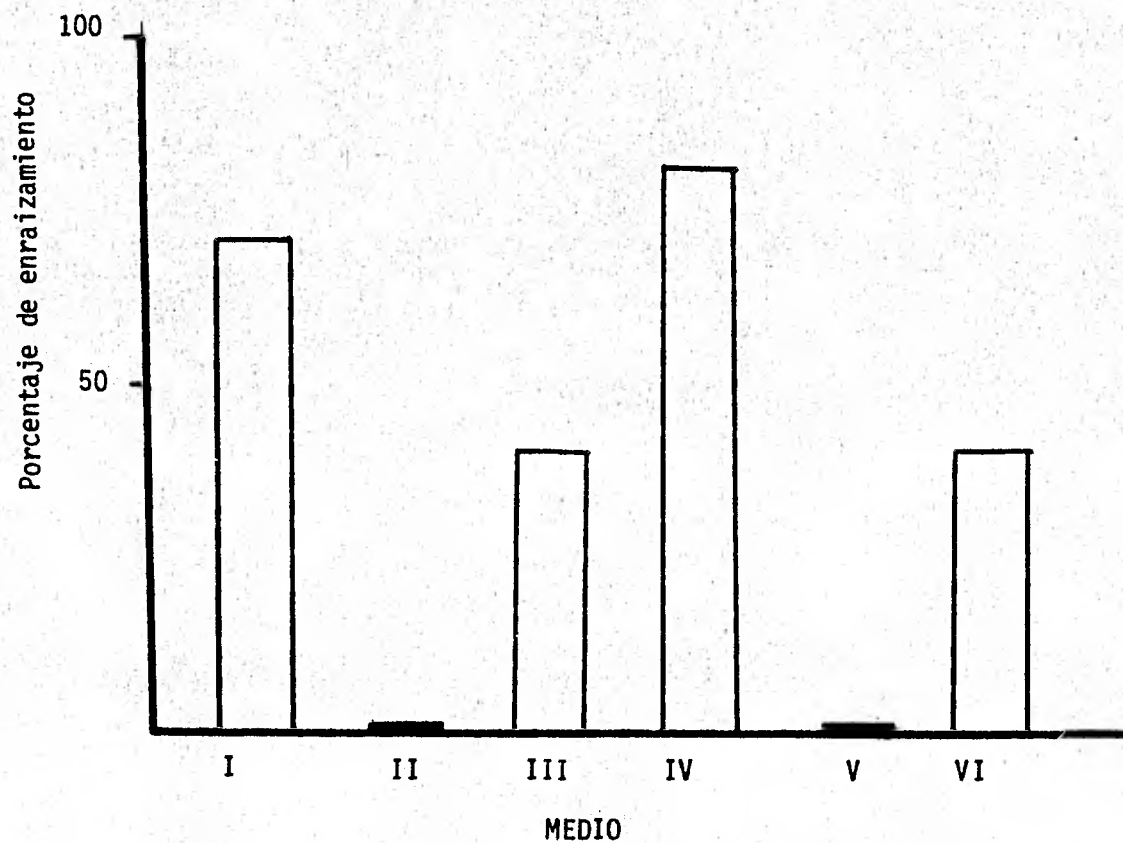
Zimmerman y Brome (1981) reportan que al incluir floriglucinol en

una concentración de 162 mg/l en el medio de cultivo complementado con AIB, no había respuesta consistente en el enraizamiento de brotes de cultivares de manzano, debido a que no había diferencia significativa con la adición o sin ésta de floriglucinol, mencionando que este compuesto no es esencial para el enraizamiento; sin embargo en el presente estudio se observa que con la adición del floriglucinol se incrementa casi al doble el porcentaje de enraizamiento tanto del cv Elah como del portainjerto MM 106.

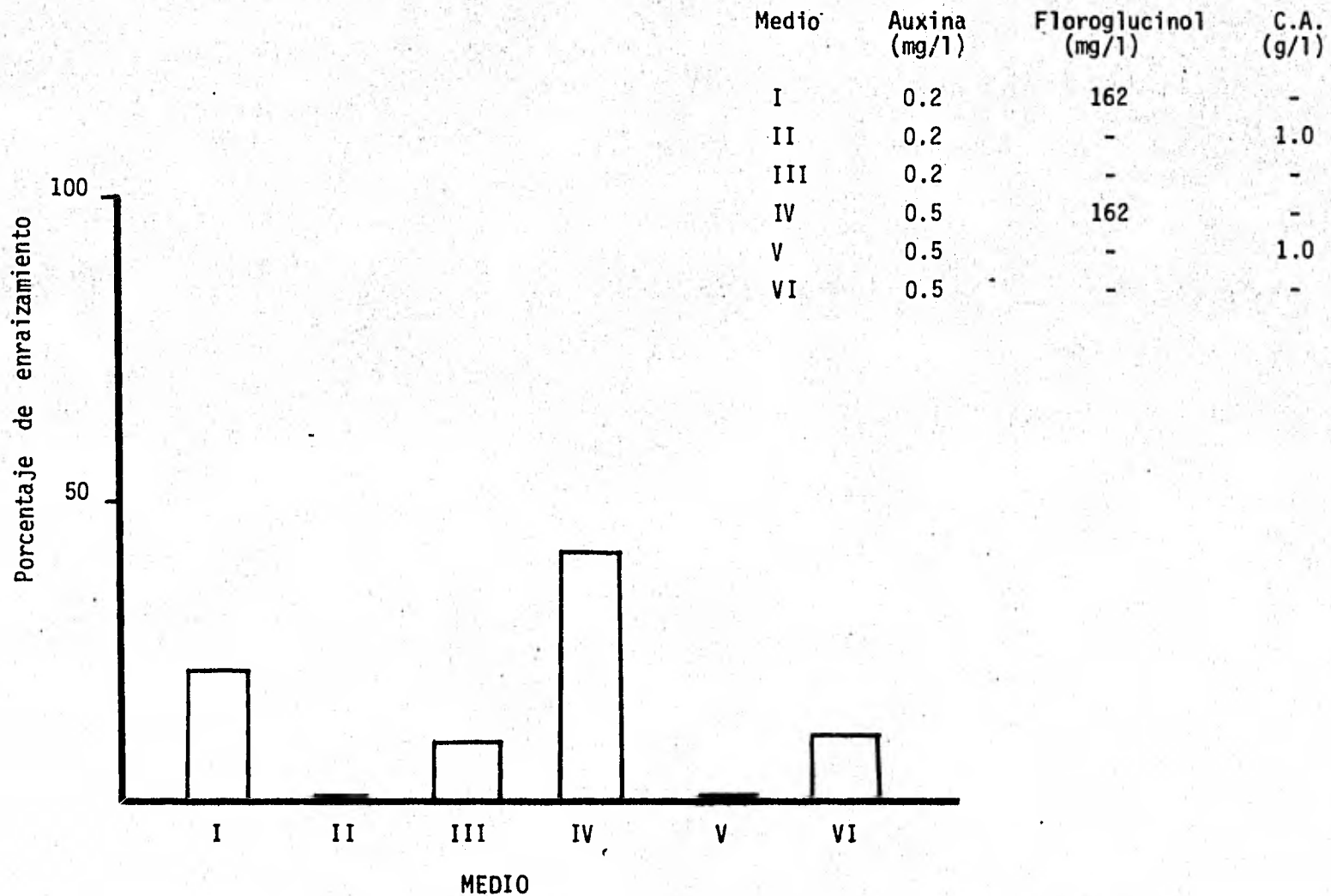
- Auxina más carbón activado

En este caso no existió ninguna respuesta tanto del portainjerto MM 106 como del cv Elah para las concentraciones de 0.2 y 0.5 mg/l de AIB más 1 g/l de carbón activado, debido a que no existió enraizamiento en estos medios (Gráfica 3 y 4). Wang y Huang (1976) y Snir y Erez (1980) mencionan que al utilizar carbón activado en un medio con auxinas, lograron un mayor porcentaje de enraizamiento y elongación de raíces, debido muy probablemente a que el carbón activado es capaz de adsorber el exceso de auxinas y otros agentes tóxicos que pueden inhibir la formación y crecimiento de las raíces, además de que el medio de cultivo adquiere una característica natural del suelo que es la obscuridad estimulada por la adición del carbón activado. Debido a la naturaleza del carbón activado en el presente estudio y las dosis empleadas de AIB (0.2 y 0.5 mg/l) siendo éstas bajas, se considera que las auxinas quedaron adsorbidas en el carbón activado, no pudiendo éstas manifestar su efecto sobre el enraizamiento, lo que indica que al utilizar carbón activado se podrían emplear dosis más elevadas de AIB.

Medio	Auxina (mg/l)	Floroglucinol (mg/l)	C.A. (g/l)
I	0.2	162	-
II	0.2	-	1.0
III	0.2	-	-
IV	0.5	162	-
V	0.5	-	1.0
VI	0.5	-	-



Gráfica 3. Efecto del AIB, AIB más Floroglucinol y AIB más Carbón Activado (CA). Sobre el enraizamiento del portainjerto MM 106.



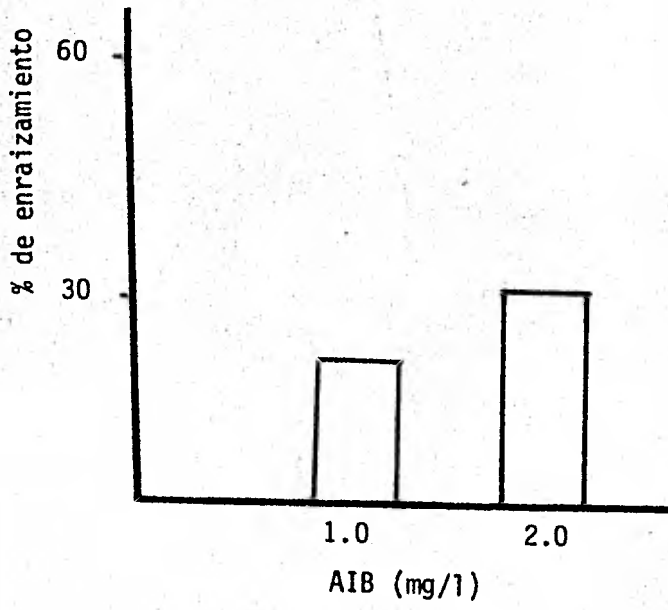
Gráfica 4. Efecto del AIB, AIB más Floroglucinol y AIB más Carbón activado (CA), sobre el enraizamiento del cv Elah

b) Exposición parcial a reguladores del crecimiento

Como el portainjerto MM 106 mostró una buena respuesta al enraizamiento en el experimento anterior, en el presente sólo se trabajó con el cultivar Elah.

Este experimento se basó en la metodología empleada por James y Thurbon (1979), permaneciendo los brotes 7 días en el medio para la inducción radical después de los cuales fueron transferidos a un medio para la diferenciación de raíces (medio sin reguladores del crecimiento), permaneciendo en éste durante 30 días.

Los porcentajes de enraizamiento obtenidos para las concentraciones de 1.0 y 2.0 mg/l de AIB, complementado en ambos casos con 162 mg/l de floroglucinol en el medio de inducción fueron del 20 y 30% respectivamente (Gráfica 5), los cuales son inferiores a los obtenidos en el medio de exposición permanente para el cv Elah, además de que el enraizamiento no fue uniforme en los brotes enraizados. Los porcentajes de enraizamiento obtenidos son inferiores a los reportados por James y Thurbon (1979), de un 70% utilizando 2 mg/l de AIB y 162 mg/l de floroglucinol, aunque estos investigadores no utilizan brotes obtenidos a partir de un cuarto subcultivo con una tasa de proliferación de 22.9 brotes por tubo. Tomando en cuenta lo señalado por Feucht y Dausend (1976) en que los niveles de citocinina, en este caso bencilaminopurina contenidos en los brotes tienen un efecto inhibitorio sobre el enraizamiento de los mismos, los brotes expuestos a niveles elevados de proliferación debieron contener niveles elevados de bencilaminopurina en forma endógena, explicando así la respuesta mínima del cv Elah al enraizamiento, y la muy buena res



Gráfica 5. Efecto del AIB más Floroglucinol en el enraizamiento del cv Elah.

puesta del portainjerto MM 106.

Los resultados obtenidos confirman lo reportado por Villegas (1982) en cuanto a que existe poca consistencia en los reportes sobre enraizamiento, realizados por diferentes investigadores; en cuanto al uso de reguladores del crecimiento, concentración y compuestos fenólicos, como Zimmerman y Brome (1981) quienes reportan elevados porcentajes de enraizamiento (90 y 100%), mientras que Abbott y Whiteley (1976) solamente lograron enraizar del 10 al 20% de los brotes obtenidos.

Lo anterior hace necesario que se generen metodologías para el enraizamiento de brotes en un solo medio a fin de evitar la doble transferencia, lo cual se puede obtener por medio del empleo de diversos reguladores del crecimiento que estimulen la formación de raíces de los brotes, así como la concentración de los mismos. Otro aspecto importante sería el de transferir previamente los brotes a enraizar a un medio sin reguladores del crecimiento, con el fin de eliminar al máximo los residuos de citocininas que podrían tener un efecto antagónico con el enraizamiento. Feucht y Dausend (1976) mencionan que los niveles de citocinina contenidos en los brotes obtenidos en la proliferación pueden inhibir o reducir notablemente el enraizamiento de los brotes, además de que el transferir los brotes a un medio sin reguladores del crecimiento, proporcionaría nutrientes que le darían vigor al brote y éste pueda así tener mayor facilidad para enraizar.

6. CONCLUSIONES

1. El método de desinfección empleado es efectivo, obteniendo un promedio de 90% de cultivos asépticos.
2. El empleo de un medio de cultivo diluido favoreció el desarrollo de brotes a partir de ápices del cv Elah, mientras que al emplear un medio completo favoreció el desarrollo de brotes a partir de ápices del portainjerto MM 106.
3. Al emplear 1.5 mg/l de bencilaminopurina se observó el mayor desarrollo de brotes del cv Elah y del portainjerto MM 106.
4. A medida que transcurren los subcultivos, el número de brotes por tubo tiende a incrementarse, siendo mayor la respuesta en el cv Elah.
5. En el enraizamiento el portainjerto MM 106 mostró mejor respuesta, llegando a obtener 80% de enraizamiento, mientras que el cv Elah sólo logró 20 y 40%.
6. Emplear 162 mg/l de floroglucinol más AIB en el medio de cultivo permitió incrementar en 100% más el porcentaje de enraizamiento, comparado cuando se utiliza únicamente AIB.
7. Utilizar 1.0 g/l de carbón activado en el medio de enraizamiento no estimula la formación de raíces del cv Elah y del portainjerto MM 106.

8. Es posible la obtención de plantas del cv Elah y del portainjerto MM 106 a partir de yemas axilares cultivadas in vitro.
9. Las técnicas empleadas en el presente estudio para la propagación in vitro de manzano se consideran apropiadas, pero requieren de modificaciones dependiendo de los cultivares y portainjertos, su edad y condiciones en las que se desarrollen.

APENDICE

1. Soluciones concentradas de las sales minerales del medio de Murashige y Skoog (1962)

I.	NITRATOS	g/l
	Nitrato de Amonio (NH_4NO_3)	165.0
	Nitrato de Potasio (KNO_3)	190.0
II.	SULFATOS	
	Sulfato de Magnesio ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	37.0
	Sulfato de Manganeso ($\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)	1.690
	Sulfato de Zinc ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0.860
	Sulfato Cúprico ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)	
III.	HALOGENOS	
	Cloruro de Calcio ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	44.0
	Ioduro de Potasio (KI)	0.083
	Cloruro de Cobalto ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	0.0025
IV.	PO_4 , BO_3 y MoO_4	
	Fosfato de Potasio (KH_2PO_4)	17.0
	Acido Bórico (H_3BO_3)	0.620
	Molibdato de Sodio ($\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	0.025
V.	Na Fe EDTA	
	Sulfato Ferroso ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	2.784
	Acido Etilendinitrilotetra-acetato ($\text{Na}_2\text{.EDTA}$)	3.724

2. Significancia en las pruebas F de los factores de variación para cada variable de estudio

Variable	Factores de Variación							
	M.V.	M.C.	B.A.	S	M.V. x M.C.	M.V. x B.A.	M.C. x B.A.	M.V. x S
Cultivos asépticos	**	N.S.	N.S.	-	N.S.	N.S.	N.S.	-
Desarrollo de brotes	**	N.S.	**	-	**	N.S.	N.S.	-
Número de brotes por subcultivos	**	-	-	**	-	-	-	**

M.V. = Material vegetativo

M.C. = Medio de cultivo

B.A. = Bencilaminopurina

S = Subcultivo

** = Significancia al 1%

N.S. = No significativo

7. LITERATURA REVISADA

- Abbott, A. J. and E. Whiteley. 1976. Culture of Malus tissues in vitro. I. Multiplication of apple plantas from isolated shoot apices. *Scientia Horticulturae*. 4: 183-189.
- Bould, C. 1970. The nutrition of fruit trees. *Physiology of tree crops*. Ed. by L. C. Luckwill and C. V. Cutting. Acad. Press. London N.Y. p. 233-237.
- Cheng, T. Y. 1979. Propagating woody plantas through tissue culture. *Amer. nurs.* 7-8: 94-100.
- Feucht, W. and B. Dausend. 1976. Root induction in vitro of easy-to-root Prunus pseudocerasus and difficult-to-root Prunus avium. *Scientia Horticulturae*. 4: 49-54.
- Giladi, I., A. Altman and R. Goren. 1979. A method for aseptic culture of bud explants from citrus trees. *Scientia Horticulturae*. 10: 357-362.
- Hammerschlag, F. 1982. Factors affecting establishment and growth of peach shoots in vitro. *HortSci.* 17 (1): 85-86.
- Hitchinson, P. A., A. J. Macleod and M. M. Yeoman. 1977. Growth patterns in tissue (callus) cultures. *Plant tissue and cell culture*. Ed. by H. E. Street. 2nd. ed. Blackwell Scientific Public. p. 32-48.
- Hyndman, S. E., P. M. Hasegawa and R. A. Bressan. 1982. Stimulation of root initiation from cultured rose shoots through the use of reduced concentration of mineral salts. *HortSci.* 17 (1): 82-83.
- James, D. J. and I. J. Thurbon. 1979. Rapid in vitro rooting of the apple rootstock M 9. *J. Hort. Sci.* 54 (4): 309-311.
- Jones, O. P. 1965. Observation on the growth effects of xylem sap from apple trees. *Rep. E. Malling Res. Sth.* p. 119-122.
- _____ and S. G. S. Hatfield. 1976. Root initiation in apple shoots cultured in vitro with auxins and phenolic compounds. *J. Hort. Sci.* 51: 495-499.
- _____, M. E. Hopgood and D. O'Farrell. 1977. Propagation in vitro of M 26 apple rootstocks. *J. Hort. Sci.* 52: 235-238.
- _____, C. A. Pontikis and M. E. Hopgood. 1979. Propagation in vitro of five apple scion cultivars. *J. Hort. Sci.* 54 (2): 155-158.

- Lane, W. D. 1978. Regeneration of apple plants from shoot meristem tips. *Plant Sci. Lett.* 13: 281-285.
- Morini, S. 1980. Preliminary trial on micropropagation of apple trees. *Riv. Orotoflorofruit.* 64: 41-50.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with Tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-492.
- _____. 1974. Plant propagation through tissue cultures. *Ann. Rev. Plant. Physiol.* 25: 135-166.
- _____. 1977. Plant cell and organ cultures as horticultural practices. *Acta Horticulturae* 78: 17-30.
- _____. 1978. The impact of plant tissue culture on Agriculture. *Frontiers of plant tissue culture 1978.* Ed. by T. A. Thorpe. Published by the International Association for plant tissue culture. Economy Bookbrindery Co. Ltd. Calgary. p. 15-26.
- Nasir, R. F. and N. W. Miles. 1981. Histological origin of EMLA apple shoots generated during micropropagation. *Abst. Hortsci.* 16: 53.
- Obando R., R. 1982. Logros y aportaciones de la investigación agrícola en los frutales de hoja caduca. INIA, SARH. Folleto especial No. 91 p. 5-17.
- Ortega O., C. 1976. Descripción de patrones de propagación vegetativa de manzano. *Fruticultura. Mimeog.* E.N.A. Chapingo, Méx. p. 1-15.
- Rodríguez P., M. A. 1977. Evaluación de siete cultivares de manzano sobre tres portainjertos vegetativos diferentes. Tesis M.C. Colegio de Postgraduados. Chapingo, Méx.
- Singha, S. 1982. In vitro propagation of Crabapple cultivars. *Hortsci.* 17 (2): 191-192.
- Snir, I. and A. Erez. 1980. In vitro propagation of Malling Merton apple rootstocks. *Hortsci.* 15 (5): 597-598.
- Thorpe, T. A. 1982. Aspectos básicos y aplicados de la organogénesis de las plantas in vitro. Contribuciones del cultivo de tejidos al mejoramiento y conservación de las plantas. C.P. Centro de Genética, Chapingo, Méx. p. 13-27.
- Vasil, I. K. and V. Vasil. 1972. Totipotency and embryogenesis in plant cell and tissue cultures. *In vitro* 8: 117-125.
- Villegas M., A. 1982. Propagación de cultivares de manzano (Malus pumila Mill) in vitro. Tesis M.C. C.P. Chapingo, Méx. p. 3-70.

- Wang, P. J. and L. C. Huang. 1976. Beneficial effects of activated charcoal on plant tissue and organ cultures. *In vitro* 12: 260-262.
- Wareing, P. F. 1970. Growth and its coordination in trees. *Physiology of the tree crops*. Ed. by L. C. Luckwill and C. V. Cutting. Acad. Press. London N. Y. p. 3-15.
- Werner, E. M. and A. A. Boe. 1980. *In vitro* propagation of Malling 7 apple rootstock. *Hortsci.* 15 (4): 509-510.
- Zimmerman, R. H. 1980. Fruit plants micropropagation at Betsville - Fruit Laboratory and in North America. *Riv. Ortoflorofruit.* 64: 214-256.
- _____ and O. C. Broome. 1981. Phloroglucinol an *in vitro* rooting of apple cultivar cuttings. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 106 (5): 648-652.