

**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA  
FACULTAD DE AGRONOMIA  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES AGRONOMICAS**

**Efecto de antioxidantes, desinfectantes, medios de cultivo y reguladores de crecimiento, en la propagación *in vitro* del cultivo de yemas axilares de melocotón *prunus persica* (L.) Batsch var. Salcajá**

**TESIS**

**PRESENTADA A LA HONORABLE JUNTA DIRECTIVA DE LA FACULTAD DE AGRONOMIA DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA**

**POR**

**ALFREDO CABRERA MORALES**

**En el acto de investidura como**

**INGENIERO AGRONOMO**

**EN**

**SISTEMAS DE PRODUCCIÓN AGRÍCOLA**

**EN EL GRADO ACADEMICO DE**

**LICENCIADO**

**Guatemala, noviembre del 2003**

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA

**RECTOR**

**M. V. LUIS ALFONSO LEAL MONTERROSO**

**JUNTA DIRECTIVA DE LA FACULTAD DE AGRONOMIA**

**DECANO**

**VOCAL PRIMERO**

**VOCAL SEGUNDO**

**VOCAL TERCERO**

**VOCAL CUARTO**

**VOCAL QUINTO**

**SECRETARIO**

**Dr. Ariel Abderraman Ortiz López**

**Ing. Agr. Alfredo Itzep Manuel**

**Ing. Agr. Manuel de Jesús Martínez Ovalle**

**Ing. Agr. Erberto Raúl Alfaro Ortiz**

**Ing. Agr. Luis Antonio Raguay Pírique**

**Bachiller Juan Manuel Corea Ochoa**

**Ing. Agr. Pedro Peláez Reyes.**

Guatemala, Noviembre del 2003

Honorable Junta Directiva  
Honorable Tribunal Examinador  
Facultad de Agronomía  
Universidad de San Carlos de Guatemala

Distinguidos miembros:

De conformidad con las normas establecidas en la Ley orgánica de la Universidad de San Carlos de Guatemala, tengo el honor de someter a vuestra consideración, el trabajo de tesis titulado:

**Efecto de antioxidantes, desinfectantes, medios de cultivo y reguladores de crecimiento en la propagación *in vitro* del cultivo de yemas axilares de melocotón *prunus persica* (L.) Batsch var. Salcajá.**

Presentado como requisito previo a optar el título de Ingeniero Agrónomo en sistemas de Producción Agrícola, en el grado académico de Licenciado.

Esperando que la presente investigación llene los requisitos para su aprobación, sin otro particular me suscribo a ustedes, como su atento y seguro servidor.

Atentamente,

---

Alfredo Cabrera Morales

## **ACTO QUE DEDICO**

**A:**

**DIOS:** **Pilar de sueños alcanzables, base de ideas y logros inmensamente fabulosos.**

**MIS PADRES:** **Martín Cabrera Pérez, Aurelia Morales Buch  
Como el gran regalo que Dios me dio para ustedes, gracias por estar aquí, y por su gran apoyo económico, moral, espiritual, Dios les bendiga.**

**MIS HERMANAS/OS** **Maria Mercedes, Dolores Aurelia, Mariana de Jesús, Concepción Aurelia, Sara del Rosario, Juan Antonio, Francisco Javier. Por la ayuda mutua que entre nosotros siempre a imperado.**

**ALEJANDRA P. SAMAYOA B.** **Por su gran amistad y cariño, motivación grande que sirvió de base para emprender y alcanzar metas difíciles, gracias por estar siempre aquí.**

**FACULTAD DE AGRONOMIA** **Por ser grande entre las grandes, forjadora de hombres y mujeres con verdadera preparación profesional.**

**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA** **Por seguir proveyendo al país de verdaderos profesionales.**

**A todos los que deberían de estar aquí pero que no lo están**

## **TESIS QUE DEDICO**

**A:**

**FRUTICULTOR  
GUATEMALTECO**

**Especialmente al de san Bartolo Milpas Altas por contribuir al desarrollo y preservación de la misma. Señores, Reginaldo Días, David Aspuac.**

**CULTIVADOR DE  
TEJIDOS**

**Que con su perseverancia y dedicación logran alcanzar los objetivos trazados. Especialmente a Mak Milan Cruz por su amistad, colaboración y su acertada orientación en el desarrollo de la investigación.**

**MIS COMPAÑEROS  
Y AMIGOS**

**Fausto Fajardo, Estuardo López, Gerardo Cáceres, Amed Juárez, Manuel Henry, Nery Palacios, David Herrera, Selvin Piox, Luis Chaicoj, Wuenseslao Roblero, Horacio Gómez, Estuardo Arroyabe, Wilson Raxón, Emerson Herrera, Eduardo Paz, Oscar Tuquer, Werner Pocon, Edwin López, Julio Berduo, Jorge Quinteros, German Chamale, Raul Aspuac, Eduardo Sunum, Luis Golcher, Estuardo Galicia, Venancio Ramos, Mario Zamora, Mauro De León, Carlos Rosales, Gustavo Pineda, Yasil Cumes, Silvia García, compañeros y amigos como ellos difícil de conseguir, gracias por su amistad en los buenos y malos momentos, agradeciendo todas esas gratas experiencias vividas a lo largo de la carrera y en la vida misma.**

**Y a todas esas personas que no haya nombrado y que de igual manera contribuyeron a culminar esta meta.**

**ESCUELA NACIONAL PARA VARONES LUIS MENA.**

**PROMOCION 90-92 DE MAGISTERIO INSTITUTO NORMAL PÁRA VARONES ANTONIO LARRAZABAL .**

**Y a todas esas personas que no haya nombrado y que de igual manera contribuyeron a culminar esta meta.**

## **AGRADECIMIENTOS**

**ASESORES DE TESIS:** **Ing. Agr. Domingo Amador, Ing. Agr. Marco Antonio Najera, por su valiosa contribución para la realización de dicha tesis.**

**MARIANA DE JESÚS CABRERA MORALES** **Por su valiosa colaboración y ayuda incondicional para la presentación de dicho texto, gracias por tu Ayuda**

**MAK MILÁN CRUZ:** **Por su amistad, colaboración y su acertada orientación en el desarrollo de la investigación.**

**BYRON QUIROA** **Por su colaboración y contribución en dejar plasmado los recuerdos de dicho trabajo.**

**REGINALDO DÍAS, DAVID ASPUAC** **Por ser participes en el engrandecimiento intelectual de mi persona.**

**A TODAS LAS PERSONAS QUE CONTRIBUYERON PARA ENGRANDECER DICHO TRABAJO DE TESIS.**

INDICE GENERAL	vii
INDICE DE CUADROS	xii
INDICE DE FIGURAS	xiv
GLOSARIO DE ABREVIATURAS	xv
RESUMEN	xvi
1. INTRODUCCIÓN	1
2. DEFINICIÓN DEL PROBLEMA	2
3. MARCO TEORICO	3
3.1 MARCO CONCEPTUAL	3
3.1.1 Generalidades del cultivo	3
3.1.2 Clasificación taxonómica de <i>Prunus persica</i> (L.) Batsch	3
3.1.3 Descripción botánica de <i>Prunus persica</i> (L) Batsch	4
3.1.4 Composición del fruto	5
3.1.5 Origen del melocotón en Guatemala	5
3.1.6 Cultivo del melocotón en Guatemala	5
A. Area sembrada	5
B. Crecimiento del cultivo	6
C. Producción	7
D. Perspectivas de desarrollo	7
E. Competencia	7
F. Situación de la demanda y la oferta nacional	7
G. Precios	8
3.1.7 Cultivo de tejidos	9
3.1.8 Métodos de micropropagación	10
A. Micropropagación por brotes axilares	10
3.1.9 Medio de cultivo	11
3.1.10 Macronutrientes	11
A. Nitrógeno	12
B. Fósforo	12
C. Potasio	12
D. Calcio	12
3.1.11 Micronutrientes	12
A. Hierro	12
B. Magnesio	12
3.1.12 Vitaminas	13
3.1.13 Fuentes de carbono	13
3.1.14 pH del medio	13
3.1.15 Factores que afectan a la técnica de cultivo de tejidos	13
A. La oxidación en el cultivo de tejidos	13
B. Establecimiento del cultivo	15
C. Estabilidad genética del material vegetal	15
D. Vitrificación de los explantes	15
E. Contaminación de los cultivos	15
a. Contaminación por bacterias	15
b. Tipos de bacterias	16
c. Bacterias patógenas de las plantas	16
F. Algunos antibióticos y fungicidas usados en el control de la contaminación	17
a. Antibióticos	17
1. Las penicilinas	17
2. Estreptomina	17

3. Eritromicina	18
4. Cloranfenicol (Cloromicetina)	18
5. Tetraciclinas	18
b. Fungicidas	18
1. Benomyl	18
2. Sulfato de cobre pentahidratado	19
3.1.16 Reguladores del crecimiento	19
A. Funciones	19
3.1.17 Auxinas	19
A. Ruta de biosíntesis	20
B. Modo de acción	21
3.1.18 Citoquininas	21
A. Ruta de biosíntesis	22
B. Modo de acción	22
3.1.19 Giberelinas	23
A. Ruta de biosíntesis	23
B. Mecanismos de acción	24
3.1.20 Aplicación de los reguladores del crecimiento al cultivo <i>in vitro</i>	24
A. Auxinas	24
a. Efectos en los tejidos <i>in vitro</i>	24
B. Citoquininas	24
a. Efectos en los tejidos <i>in vitro</i>	25
C. Giberelinas	25
a. Efectos en los cultivos <i>in vitro</i>	25
3.1.21 Propagación tradicional del cultivo de <i>Prunus persica</i> (L.) Batsch	26
3.1.22 Cultivo de tejidos en <i>Prunus persica</i> (L.) Batsch	26
A. Importancia de la propagación vegetativa <i>in vitro</i> del durazno	26
B. Trabajos realizados en el genero <i>Prunus persica</i> (L.) Batsch utilizando la técnica <i>in vitro</i>	26
C. Métodos de cultivo de plantas seleccionadas	27
D. Propagación <i>in vitro</i> de durazno <i>Prunus persica</i> (L) Batsch a partir de yemas axilares	27
E. Obtención de plantas libres de virus y propagación <i>in vitro</i> de durazno <i>Prunus persica</i> (L.) Batsch, var. Diamante	27
F. Cultivo <i>in vitro</i> de embriones de melocotón	27
G. Micropropagación de materiales de frutales deciduos tratados con radiación	28
3.2 MARCO REFERENCIAL	29
3.2.1 Ubicación del área experimental	29
3.2.2 Origen de la variedad Salcajá	29
3.2.3 Descripción del fruto de la variedad Salcajá	30
3.2.4 Caracterización agronómica del melocotón Salcajá ( <i>Prunus persica</i> (L.) Batsch var. Salcajá)	30
A. Porte	30
B. Corteza	30
C. Formación de yemas	30
D. Hojas	30
E. Floración	31
F. Época en que florece el 50% de yemas	31
G. Época de maduración	31
H. Periodo de duración entre el cuajado de las flores y la maduración	31
I. Dormancia	31

J. Fructificación	31
3.2.5 Generación de empleo en plantaciones de Salcajá	31
4. OBJETIVOS	32
4.1 General	32
4.2 Específicos	32
5. HIPÓTESIS	33
6. MATERIALES Y METODOS	34
6.1 Reactivos y materiales	34
6.2 Cristalería y equipo	34
6.3 Medios de cultivo	34
6.3.1 Preparación de las soluciones madres	34
A. Solución madre de macronutrientes del medio nutritivo Linsmaier y Skoog	34
B. Solución madre de micronutrientes	35
C. Solución madre de hierro a 200X	36
D. Solución madre de vitaminas a 1000X	36
E. Solución madre de myo inositol a 1000X	36
F. Reguladores de crecimiento	36
6.3.2 Preparación de los medios de cultivo	37
6.4 Fases de la investigación	38
6.4.1 FASE DE SOBREVIVENCIA DE EXPLANTES A LA OXIDACIÓN POR FENOLES Y A LA CONTAMINACIÓN POR MICROORGANISMOS	38
A. Control de la oxidación	38
a. Descripción de los tratamientos para el control de la oxidación de los explantes	38
b. Descripción de la unidad experimental y condiciones de incubación	39
c. Factores a evaluar	40
d. Variables de respuesta	40
B. Desinfección del material vegetal	40
a. Descripción de los tratamientos	40
b. Factores	41
c. Variables de respuesta	41
d. Análisis de la información	41
6.4.2 FASE DE INDUCCIÓN DE BROTES EN LOS EXPLANTES CULTIVADOS	42
A. Material vegetal	42
B. Preparación del material vegetal para cultivos	42
C. Desinfección a nivel de campo y preservación del material	42
D. Desinfección de explantes a nivel de laboratorio	42
E. Inoculación de yemas axilares	43
F. Incubación de los tejidos	43
G. Descripción de los tratamientos	44
H. Descripción de la unidad experimental	45
I. Factores a evaluar	45
J. Variables de respuesta	45
K. Análisis de la información	46
6.4.3 FASE DE INDUCCIÓN DE RAÍCES EN LOS BROTES OBTENIDOS	46
A. Materiales	46
B. Inoculación	46
C. Incubación de los tejidos	46

D. Descripción de los tratamientos	47
E. Descripción de la unidad experimental	47
F. Factores a evaluar	47
G. Variables de respuesta	48
H. Análisis de los resultados	48
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	49
7.1 FASE DE SOBREVIVENCIA DE EXPLANTES A LA OXIDACIÓN Y A LA CONTAMINACIÓN POR MICROORGANISMOS.	49
7.1.1 Efecto de los antioxidantes en la fenolización de tejidos y su sobrevivencia	49
7.1.2 Efecto de los fungicidas y bactericidas en la desinfección del material vegetal en la presencia de microorganismos en los tejidos y su sobrevivencia	52
7.2 FASE DE INDUCCIÓN DE BROTES EN LOS EXPLANTES CULTIVADOS	54
7.2.1 Comportamiento de los explantes en el medio nutritivo de Almehdi y Parfitt	54
A. Porcentaje de sobrevivencia de explantes a la oxidación y contaminación.	54
a. Oxidación de explantes en el medio nutritivo Almehdi y Parfitt	55
b. Contaminación por microorganismos en el medio nutritivo de Almehdi y Parfitt	56
B. Porcentajes de brotación de yemas en el medio nutritivo de Almehdi y Parfitt	57
B.1 Brotación de yemas a los 15 días	57
B.2 Brotación de yemas a los 30 días	57
B.3 Brotación de yemas a los 60 días	58
C. Número de brotes	59
C.1 Número de brotes a los 30 días	59
C.2 Número de brotes a los 60 días	59
C.3 Número de brotes a los 90 días	60
C.4 Tratamientos sin respuesta a la brotación	62
7.2.2 Comportamiento de los explantes en el medio nutritivo de Gamborg	63
A. Porcentajes de sobrevivencia a la oxidación y contaminación	63
a. Oxidación de explantes en el medio Gamborg	63
b. Contaminación por microorganismos en el medio nutritivo Gamborg	64
B. Porcentaje de brotación de yemas en el medio nutritivo de Gamborg	65
B.1 Brotación de yemas a los 15 días	65
B.2 Brotación de yemas a los 30 días	65
B.3 Brotación de yemas a los 60 días	66
C. Número de brotes	67
C.1 Número de brotes a los 30 días	67
C.2 Número de brotes a los 60 días	67
C.3 Número de brotes a los 90 días	68
C.4 Tratamientos sin respuesta a la brotación	70
7.2.3 Comportamiento de los explantes en el medio nutritivo de Linsmaier y Skoog	70
A. Porcentajes de sobrevivencia a la oxidación y contaminación	70
a. Oxidación de explantes en el medio nutritivo de Linsmaier y Skoog	70
b. Contaminación por microorganismos en el medio Linsmaier y Skoog	71
B. Porcentaje de brotación de yemas en el medio nutritivo Linsmaier y Skoog	72

B.1 Brotación de yemas a los 15 días	72
B.2 Brotación de yemas a los 30 días	72
B.3 Brotación de yemas a los 60 días	72
C. Número de brotes	73
C.1 Número de brotes a los 30 días	73
C.2 Número de brotes a los 60 días	73
C.3 Número de brotes a los 90 días	74
7.3 Fase de inducción de raíces en los brotes obtenidos	75
8. CONCLUSIONES	77
9. RECOMENDACIONES	79
10. BIBLIOGRAFÍA	80
11. APÉNDICE	83
11.1 Concentraciones para preparar soluciones madres	83
11.2 Concentración para preparar 0.7 l de solución madre	84
11.3 Concentración de cloruro de calcio	84
11.4 Concentración de micronutrientes	84
11.5 Concentración de yoduro de potasio	84
11.6 Concentración de hierros	85
11.7 Concentración de vitaminas	85
11.8 Concentración de otros componentes de los medios	85

## INDICE DE CUADROS

CUADRO 1. Contenido nutricional del melocotón	5
CUADRO 2. Distribución del área, en hectáreas, sembradas de melocotón en Guatemala hasta octubre del 2001	6
CUADRO 3. Crecimiento del área cultivada de melocotón en Guatemala, en hectáreas, del año 1994 al 2001	6
CUADRO 4. Producción per capita de melocotón para el año 1997	8
CUADRO 5. Oferta de melocotón en fresco en tonelada métrica de 1996 a 2001	8
CUADRO 6. Precio de la tonelada métrica de melocotón en quetzales puesto en centro de acopio para el año 2001	9
CUADRO 7. Caracterización agronómica del fruto del melocotón Salcajá <i>Prunus persica</i> (L.) Batsch var. Salcajá	31
CUADRO 8. Componentes de macronutrientes Linsmaier y Skoog a 20X	35
CUADRO 9. Componentes micronutrientes del medio nutritivo Linsmaier y Skoog	35
CUADRO 10. Distribución de los tratamientos con antioxidantes	39
CUADRO 11. Factores evaluados con los antioxidantes, carbón activado ácido cítrico y polivinilpirrolidona	40
CUADRO 12. Concentraciones de los desinfectantes utilizados para controlar las contaminaciones de los explantes dentro del medio de cultivo	41
CUADRO 13. Descripción de los tratamientos utilizados en la inducción	

	de brotación en cada medio de cultivo	44
CUADRO 14.	Factores y dosis que se evaluaron en el estudio de la respuesta de explantes de melocotón	45
CUADRO 15.	Descripción de los tratamientos utilizados en la inducción de raíces en los brotes de melocotón <i>Prunus persica</i> (L.) Batsch var. Salcajá	47
CUADRO 16.	Concentraciones del medio basal Murashige y Skoog y del ácido indolbutírico utilizados en la fase de enraizamiento de brotes	48
CUADRO 17.	Resultados obtenidos en el control de la oxidación en explantes de melocotón <i>Prunus persica</i> (L.) Batsch var. Salcajá a los 15 días de inoculados los tejidos, utilizando diferentes antioxidantes y dosis de los mismos.	51
CUADRO 18.	Resultados de la sobrevivencia de explantes de melocotón <i>Prunus persica</i> (L.) Batsch var. Salcajá a la contaminación por microorganismos en tiempos de 12 y 24 horas de exposición a soluciones desinfectantes y preservantes, benomyl, sulfato de cobre estreptomycin, cloranfenicol, oxitetraciclina, ácido ascórbico y cítrico, a los 15 días de inoculados los explantes.	54
CUADRO 19.	Resultados de porcentajes de sobrevivencia a la oxidación de explantes de melocotón <i>Prunus persica</i> (L.) Batsch var. Salcajá utilizando 900.0 mg/l de polivinilpirrolidona a los 15 días de inoculados los explantes en el medio nutritivo Almehdi y Parfitt.	55
CUADRO 20.	Comportamiento de la sobrevivencia de explantes de melocotón <i>Prunus persica</i> (L.) Batsch var. Salcajá a la contaminación a los 15 días de inoculados los explantes utilizando como desinfectantes y preservantes, benomyl, sulfato de cobre, estreptomycin, cloranfenicol, oxitetraciclina, ácido ascórbico y cítrico,	57
CUADRO 21.	Porcentajes de brotación en explantes de melocotón <i>Prunus persica</i> (L.) Batsch var. Salcajá a los 30 días de sembrados los explantes.	58
CUADRO 22.	Comportamiento de la brotación a los 60 días de sembrados los explantes de melocotón <i>Prunus persica</i> (L.) Batsch var. Salcajá	59
CUADRO 23.	Número de brotes a los 90 días de inoculados los explantes de melocotón <i>Prunus persica</i> (L.) Batsch var. Salcajá en el medio Almehdi y Parfitt.	61
CUADRO 24.	Comportamiento de la sobrevivencia a la oxidación de explantes de melocotón <i>Prunus persica</i> (L.) Batsch var. Salcajá utilizando 900.0 mg/l de polivinilpirrolidona a los 30 días de inoculados los explantes en el medio nutritivo de Gamborg	63
CUADRO 25.	Comportamiento de la sobrevivencia de explantes de melocotón <i>Prunus persica</i> (L.) Batsch var. Salcajá a la contaminación a los 15 días de inoculados los explantes utilizando como desinfectantes y preservantes, benomyl, sulfato de cobre, estreptomycin, cloranfenicol, oxitetraciclina, ácido ascórbico	

	y cítrico,	65
CUADRO 26.	Comportamiento de la brotación a los 30 días de sembrados los explantes de melocotón <i>Prunus persica</i> (L.) Batsch var. Salcajá.	66
CUADRO 27.	Comportamiento de la brotación a los 60 días de sembrados los explantes de melocotón <i>Prunus persica</i> (L.) Batsch var. Salcajá.	67
CUADRO 28.	Número de brotes a los 90 días de inoculados los explantes de melocotón <i>Prunus persica</i> (L.) Batsch var. Salcajá en el medio nutritivo de Gamborg.	68
CUADRO 29.	Comportamiento de la sobrevivencia a la oxidación de explantes de melocotón <i>Prunus persica</i> (L.) Batsch var. Salcajá utilizando 900.0 mg/l de polivinilpirrolidona a los 47 días de inoculados los explantes en el medio nutritivo de Linsmaier y Skoog.	71
CUADRO 30.	Comportamiento de la sobrevivencia de explantes de melocotón <i>Prunus persica</i> (L.) Batsch var. Salcajá a la contaminación a los 20 días de inoculados los explantes utilizando como desinfectantes y preservantes, benomyl, sulfato de cobre, estreptomycin, cloranfenicol, oxitetraciclina, ácido ascórbico y cítrico,	72
CUADRO 31.	Comportamiento de la brotación a los 60 días de sembrados los explantes de melocotón <i>Prunus persica</i> (L.) Batsch var. Salcajá.	73
CUADRO 32.	Número de brotes a los 90 días de inoculados los explantes de melocotón <i>Prunus persica</i> (L.) Batsch var. Salcajá en el medio nutritivo de Linsmaier y Skoog.	74
CUADRO 33.	Concentraciones de los componentes de los medios de cultivo utilizados en el estudio	83
CUADRO 34.	componentes de macronutrientes a concentración 20X en los medios de cultivo utilizados	84
CUADRO 35.	Cloruro de calcio a diferentes concentraciones por cada medio de cultivo	84
CUADRO 36.	Concentraciones de micronutrientes en los medios de cultivo utilizados	84
CUADRO 37.	Yoduro de potasio a concentración 1000X	84
CUADRO 38.	Hierros a concentración 200X por cada medio basal	85
CUADRO 39.	Vitaminas a concentración 1000X por cada medio basal	85
CUADRO 40.	Otros componentes a concentración 1000X	85

## INDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Efecto de la concentración de citocininas y auxinas en la Formación de brotes en el medio nutritivo de Almehdi y Parfitt.	62
Figura 2.	Efecto de la concentración de citocininas y auxinas en la formación de brotes en el medio nutritivo de Gamborg.	69
Figura 3.	Efecto de la concentración de citocininas y auxinas en la formación de brotes en el medio nutritivo de Linsmaier y Skoog	75

## GLOSARIO DE ABREVIATURAS

ABREVIATURA	SIGNIFICADO
AIA	Ácido indolacético
AP	Medio de cultivo de Almehdi y Parfitt
ANAPDE	Asociación nacional productores de deciduos
ANA	Ácido naftalenacético
B5	Medio de cultivo de Gamborg
BAP	Bencil aminopurina
CV.	Cultivar
CaCl <sub>2</sub> . 2H <sub>2</sub> O	Cloruro de calcio dihidratado
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	Dicloruro de cobalto hexahidratado
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	Sulfato de cobre pentahidratado
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	Sulfato de hierro heptahidratado
GA3	Ácido giberélico
HCl	Ácido clorhídrico
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	Ácido bórico
IBA	Ácido indol butírico
ICTA	Instituto de ciencia y tecnología agrícola
IK	Yoduro de potasio
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Dihidrogenofosfato de potasio
KNO <sub>3</sub>	Nitrato de potasio
LS	Medio de cultivo de Linsmaier y Skoog
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	Sulfato de magnesio
MnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O	Sulfato de manganeso
msnm	Metros sobre el nivel del mar
MS	Medio de cultivo de Murashige y Skoog
MVA	Ácido mevalónico
ANA	Ácido naftalenacético
NADPH	Fosfato del dinucleótido de nicotinamida y adenina
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> . 2H <sub>2</sub> O	Molibdato de sodio
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	Dihidrogenofosfato de sodio
NaOH	Hidróxido de sodio
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	Nitrato de amonio
PVP	Polivinilpirrolidona
ppm	Partes por millón
TM	Tonelada métrica
Var.	variedad

Efecto de antioxidantes, desinfectantes, medios de cultivo y reguladores de crecimiento en la propagación *in vitro* del cultivo de yemas axilares de melocotón  
*Prunus persica* (L.) Batsch var. Salcajá

Effect of antioxidant, disinfectants, mediums of culture and regulator of growth in the propagation *in vitro* of culture axillary buds of peach  
*Prunus persica* (L.) Batsch var. Salcajá

## RESUMEN

EL melocotón pertenece a la familia de las rosáceas, genero *Prunus*, especie *Prunus persica*. Es un árbol robusto, de copa ovalada, con una vida útil económica de 20 años. En Guatemala entre los árboles deciduos ocupa un segundo lugar después de la manzana en cuanto a producción y comercialización, sin embargo no se descarta que en un futuro pueda ocupar el primer lugar debido a la creciente demanda del consumo del fruto, tanto nacional como internacional, y además de esto la variedad se ve favorecida con las condiciones climáticas y edáficas que Guatemala posee. La propagación *in vitro* de esta planta puede ser una buena alternativa en la reproducción vegetativa, sin embargo esta tiene varias limitantes, entre las que se puede mencionar, la oxidación de los explantes al momento de su inoculación por las heridas ocasionadas en el tejido, además los niveles de contaminación de microorganismos en las plantas madres que directamente repercuten en los explantes inoculados en los medios de cultivo. Por lo que es necesario buscar metodologías adecuadas para reducir estos efectos, y así adaptar el cultivo a etapas de establecimiento para su posterior propagación masiva *in vitro*. La investigación constó de 3 fases, la primera fue la sobrevivencia de explantes a la oxidación y a contaminación por microorganismos, probando para ello el efecto de antioxidantes y soluciones desinfectantes fungicidas-bactericidas, los resultados reflejan que el mejor antioxidante que controló la oxidación fue el polivinilpirrolidona en la dosis de 900 mg/l, con un 93 y 95% de sobrevivencia y el tiempo de exposición del material vegetal a soluciones desinfectantes de fungicidas y bactericidas que mejor controló la contaminación fue el de 24 horas. La segunda fase fue la de inducir brotes en explantes cultivados para ello se evaluaron tres medios nutritivos de cultivo, Almehdi y Parfitt, Gamborg y Linsmaier y Skoog, utilizando combinaciones de reguladores; ácido indolbutírico y bencil amino purina. El mejor medio fue el Gamborg ya que favoreció la proliferación de los brotes con un promedio de 2.12 y la mejor dosis de regulador en dicha proliferación correspondió a la de 2.0 mg/l de bencil amino purina + 1.5 mg/l de ácido indol butírico. La tercera fase fue la de inducir raíces en los brotes obtenidos en la segunda fase, para ello se probaron concentraciones del medio basal Murashige y Skoog con diferentes niveles de ácido indol butírico, sin embargo los resultados obtenidos en esta etapa no fueron los satisfactorios ya que no se logró enraizar dichos brotes.

## 1. INTRODUCCION

La fruticultura en Guatemala ha tomado gran auge en los últimos años, a raíz del desarrollo de la política de exportación de productos no tradicionales específicamente en lo que se refiere a los deciduos, como lo es el melocotón. Solo en los años de 1996 al 2001 se produjeron 16,702 TM, de las cuales 1518 fueron exportadas. En tanto la demanda nacional para dicho periodo fue aproximadamente de 19540 TM, haciéndose necesario importar aproximadamente 4358 TM de otros países (31).

El incremento de la demanda nacional se ha debido a las características físicas (pulpa consistente al transporte, color), químicas (contenido de agua, cenizas, olor agradable, sabor dulce), y alimenticias (proteínas, carbohidratos, vitamina c, calcio, fósforo, hierro, tiamina entre otros). Sin embargo es necesario mejorar la calidad y cantidad de la fruta, con el fin de abastecer el mercado nacional y mercado para exportación.

Actualmente existe la variedad de melocotón Salcajá, la cual de las 1080 ha. existentes, el 85.42 % es cultivada con la misma, y además es la más comercializada en el país ya que industrialmente posee una gran demanda, debido a las características que su fruto presenta no solo por su pulpa resistente al transporte sino al sabor dulce que este posee. Esta variedad tiene su origen en el año de 1970 cuando se realizó un cruce entre las variedades Elberta y W. H. Hall con un criollo guatemalteco.

El presente trabajo de investigación se realizó en el laboratorio de cultivo de Tejidos vegetales de la Facultad de Agronomía de la Universidad de san Carlos de Guatemala. El estudio consistió en tres fases, la primera fue la de sobrevivencia de explantes a la oxidación y a la contaminación por microorganismos, probando el efecto de antioxidantes como carbón activado, ácido cítrico, polivinilpirrolidona (PVP) y fungicidas – bactericidas; la segunda fase fue la de inducir brotes en los explantes cultivados para ello se evaluaron diferentes combinaciones de ácido indol butírico y bencil amino purina probando los siguientes medios de cultivo, Almehdi y Parfitt (AP), Gamborg (B5), Linsmaier y Skoog (LS), con lo cual se estableció la combinación hormonal que produjo el mayor número de brotes con su respectivo medio basal. La tercera fase fue la de inducir raíces en los brotes obtenidos en la segunda fase, para ello se probaron diferentes concentraciones del medio basal Murashige y Skoog con diferentes dosis de ácido indol butírico, sin embargo los resultados obtenidos en esta etapa no fueron los satisfactorios ya que no se logró enraizar dichos brotes.

## **2. DEFINICION DEL PROBLEMA**

La fruticultura nacional no ha alcanzado un desarrollo sustancial debido a que no se cuenta con estudios sistematizados que creen la tecnología adecuada para producir frutos en cantidad y con calidad, aunado a la falta de visión empresarial y a la falta de una política de gobierno adecuada para mejorar dicho cultivo.

Uno de los problemas en la propagación vegetativa es que no se conoce un método efectivo para la selección del material en la propagación del melocotonero que asegure el desarrollo y la multiplicación de plantas sanas, en un corto tiempo y que presenten una uniformidad genética en el material seleccionado.

Además las plantaciones existentes poseen una amplia variabilidad genética, con brotación y floración irregular, y a la vez también presentan problemas de heterogeneidad en cuanto a vigor, precocidad, productividad, longevidad, entre otros aspectos.

### 3. MARCO TEORICO

#### 3.1 MARCO CONCEPTUAL

##### 3.1.1 Generalidades del cultivo.

El melocotón, pertenece a la familia de las rosáceas, genero *Prunus*, especie *Prunus persica*. Se creía originaria de Persia, aunque probablemente lo es de China pues su cultivo en dicho país se conoce desde tiempos remotos (30).

El melocotón, esta comprendido entre los frutales que fueron introducidos a Guatemala, luego de la conquista en la época de la colonia. En la actualidad se observan plantaciones comerciales o simplemente árboles dispersos desde los 1,500 hasta 2,400 msnm. Actualmente existe mucha variabilidad genética en los duraznos sembrados en el país entre estos se encuentran aquellos de pulpa blanca (conocidos como duraznos blancos) sembrados en el país, y que actualmente se han estado utilizando como porta injerto de los de pulpa amarilla o melocotón. El cultivo del melocotón se encuentra difundido en todo el mundo, pero la producción principal se encuentra localizada en Europa, donde se obtienen unos 3.5 millones de TM lo que representa casi el 50% de la producción mundial (31).

El cultivo es ampliamente conocido como cultivo de clima templado, sin embargo en los últimos años con el mejoramiento genético que han estado realizando países como Estados Unidos (estados de Alabama, Florida y California) Brasil y México quienes han estado sacando variedades de bajo requerimiento de horas frío (80 a 250 y 250 a 600 horas) lo que ha permitido a Guatemala contar con variedades como Diamante (Early Grand, Early Gold) y por supuesto Salcajá (30).

##### 3.1.2 Clasificación taxonómica de *Prunus persica* (L.) Batsch .

El melocotonero pertenece a la familia de las rosáceas y dentro de ella al genero *Prunus* y a la especie *Prunus persica* (30). Tobar mencionado por Ruano (28) enuncia la clasificación botánica siguiente:

Reino	Plantae
Sub-reino	Embryobionta
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Subclase	Rosidae
Orden	Rosales
Familia	Rosaceae
Genero	<i>Prunus</i>
Especie	<i>Prunus persica</i> (L.) Batsch

### 3.1.3 Descripción botánica de *Prunus persica* (L.) Batsch.

Fideghelli y Gonzáles citado por Ruano (28) dicen que *Prunus persica* (L.) Batsch es un árbol robusto de copa ovalada con una vida útil económica de 20 años. Presenta una raíz principal o pivotante las cuales tienen un típico color anaranjado con lenticelas muy evidentes que están muy ramificadas al igual que en la mayor parte de las plantas arbóreas están muy extendidas y poco profundas. La zona explorada por las raíces ocupa una superficie mayor que la zona de proyección de la copa del árbol.

Si se deja crecer la planta libremente adopta un porte globoso y adquiere unas dimensiones medias de 4 - 6 metros. Las ramas de *Prunus persica* (L.) Batsch, según las dimensiones y la distribución de las yemas de flor se clasifican en, ramas mixtas, chifonas, ramas de mayo y chupones (28).

Las yemas pueden ser de madera o de flor, las primeras se distinguen sobre todo por su forma cónica y menores dimensiones (longitud: 3,5-6 mm, diámetro 2-3.5 mm) están formadas por 8-10 perulas revestidas por una tomentosidad blanquecina. Las yemas de flor son globosas, de mayores dimensiones (longitud 5-7 mm, diámetro 3-4 mm) y están formadas por 10-12 perulas mucho más tomentosas que las anteriores tienen por lo general una sola flor y a veces dos (28,33).

Las hojas son oblongas lanceoladas, con una longitud generalmente de 140-180 mm y una anchura de 40-50 mm el limbo es liso y a veces ondulado a lo largo del nervio central, los bordes son serrados, crenados o doblemente dentados. El color de las hojas en otoños es un índice para la distinción de las variedades de pulpa o carne amarilla de las de pulpa blanca las hojas de las primeras se colorean de amarillo intenso o anaranjado claro y las de las segundas de amarillo claro (28,30).

El fruto es una drupa (pericarpio membranoso, mesocarpio pulposo y endocarpio leñoso) de forma más o menos globosa con un surco longitudinal bien marcado y una cavidad alrededor del pedúnculo (28,30). El pericarpio puede ser adherente a la pulpa o fácilmente separable. La pulpa adherida puede ser de color amarillo (del amarillo claro al anaranjado) o blanco el hueso adherente a la pulpa o libre. Es frecuente el caso de pigmentación roja en la pulpa que en algunos casos puede cubrir casi completamente el color de fondo (28,30).

Las yemas de flor del melocotonero para poder completar su formación y llegar a florecer deben superar un reposo a temperaturas relativamente bajas. Esta exigencia fisiológica de las yemas de flor se conoce con el nombre de “necesidades en frío” y se mide convencionalmente por el número de horas por debajo de 7.2 grados centígrados necesarias para superar el periodo de reposo. La necesidad en frío varía entre límites muy amplios según los cultivares (de pocas

horas hasta mas de 1000). También las yemas de madera tienen unas exigencias en frío pero ello no constituye normalmente un problema agronómico (28,30).

### 3.1.4 Composición del fruto.

En los últimos años el consumidor ha puesto especial interés en los alimentos que protegen y conservan la salud. Hay preferencia por los alimentos naturales y sanos poco contaminados y de alto valor energético. Las frutas y dentro de ellas el melocotón es una opción que se tienen para la alimentación saludable (28). Fideghelli citado por Ruano (28) indica el siguiente contenido nutricional para el melocotón.

**Cuadro 1 Contenido nutricional del melocotón**

Contenido nutricional		Contenido nutricional	Mg.
Agua	83%	Vitamina C	5
Energía	49 Kcal.	Calcio	5
Proteína total	0.9 g	Fósforo	16
Grasa total	0.5 g	Hierro	0.1
Carbohidratos	11.8 g	Tiamina	0.02
Cenizas	0.5 g	Riboflavina	0.04
Fracción comestible	0.91 %	Niacin	0.99
Retinol equivalente	74 mg		

### 3.1.5 Origen del melocotón en Guatemala.

Guatemala llega el cultivo procedente de España a través del descubrimiento de América y su conquista. En la época colonial, los religiosos fueron quienes iniciaron el proceso de introducción de especies vegetativas procedentes de España. Dentro de las cuales se cree que vinieron algunos tipos de durazno. Estos iniciaron un proceso de adaptación en la nueva región, muchos murieron y otros que sobrevivieron fueron los orígenes de los que aun se encuentran diseminados en todo el altiplano guatemalteco y que hoy conocemos como duraznos criollos (28).

### 3.1.6 Cultivo del melocotón en Guatemala.

#### A. Area sembrada.

En Guatemala el cultivo del melocotón *Prunus persica* (L.) Batsch es de gran importancia, ya que entre los frutales deciduos, ocupa un segundo lugar después de la manzana (31), en el país hay actualmente 1,080 hectáreas cultivadas de melocotón en trece departamentos del país concentrándose la mayor cantidad en la zona del altiplano central y occidental,

principalmente en el departamento de Quetzaltenango con 400 hectáreas y Chimaltenango con 206, cuadro 2. El 85.42% del área total cultivada corresponde a plantaciones con la variedad Salcajá, el resto esta formado por variedades como flor DLyz, L-27, Diamante y otras. De las 400 hectáreas sembradas en Quetzaltenango el 57.62% se estima que es un área dispersa en todo el departamento, funcionando como una fruticultura llamada de traspatio o considerada como de seguridad alimentaría por lo que solo 170 hectáreas están registradas como plantaciones compactas (28).

**Cuadro 2 Distribución del área en hectáreas sembradas de melocotón en Guatemala, hasta octubre de 2001**

DEPARTAMENTO	HECTÁREAS
Quetzaltenango	400
Chimaltenango	206
Jalapa	136
San Marcos	78
Sacatepéques	70
Quiché	50
Huehuetenango	43
Totonicapán	42
Guatemala	23
Sololá	19
El progreso	8
Chiquimula	3
Jutiapa	2
<b>TOTAL</b>	<b>1080</b>

**Fuent e: Profruta.**

### **B. Crecimiento del cultivo.**

El cultivo de melocotón en Guatemala ha crecido 416 hectáreas en los últimos siete años de 420 a 836 hectáreas de los años 1994 a 2001 ver cuadro 3, aunque la tendencia de crecimiento del cultivo es a la alza el porcentaje de crecimiento es bajo, entre el 7 y 12%, lo cual se debe entre otras causas a la falta de un plan de desarrollo del cultivo con estrategias adecuadas acordes a sus necesidades y a las del productor, entre las que se puede mencionar el financiamiento para el establecimiento y el mantenimiento de las plantaciones. Además el crecimiento del cultivo en los últimos tres años se debe en parte a la siembra en nuevos departamentos como el Progreso, Jutiapa y Guatemala, donde las plantaciones se han establecido a alturas inferiores a los 1800 msnm ya que se dispone de variedades de bajo requerimiento de frío como la Diamante (28).

**Cuadro 3 Crecimiento del área cultivada de melocotón en Guatemala en hectáreas del año 1994 al 2001.**

Año	Área establecida en ha.	Área total en ha.	Crecimiento (%)
1994	44	433	10.16
1995	49	482	10.16
1996	43	525	8.19
1997	52	577	9.01
1998	54	631	8.56
1999	51	682	7.48
2000	65	747	8.70
2001	102	849	12.01

El cuadro no incluye las 230 hectáreas dispersas. Fuente Profruta

### **C. Producción.**

Actualmente se estima que existe una producción de 4608 toneladas métricas (TM) producto de 512 hectáreas en edad productiva y un rendimiento promedio nacional de 9 TM por hectárea (13, 29), sin embargo esta producción no satisface la creciente demanda de la población y de la industria tanto en el ámbito nacional como Centroamericano. De acuerdo con nuestro historial de comercialización desde hace más de dos décadas hemos venido exportando melocotones hacia Centroamérica y surtiendo el mercado nacional, no obstante cada día los mercados se vuelven más exigentes en la calidad del producto lo que hace pensar a los productores y profesionales en revisar las técnicas del cultivo así como ampliar la temporada de producción, actualmente el 95% de la producción se concentra en los meses de julio a septiembre (30).

### **D. Perspectivas de desarrollo.**

El melocotón es una fruta que puede estar destinada para el consumo en fresco o para la industria dependiendo de su destino los frutos de las distintas variedades presentan diferentes características (30, 28). Los melocotones también son muy demandados por la industria en grandes cantidades, para la producción de néctares, concentrados y deshidratados (30).

Los atributos del producto que lo hacen aceptable en el mercado obedecen a frutas atractivas para el consumo en fresco, las cuales contienen de 50 a 80 calorías por fruta más vitaminas A y C (12). En general el melocotón es una fruta que externamente varía del color de amarillo al rojo (50 a 80%), de pulpa amarilla. Su sabor debe ser dulce por lo que el contenido de sólidos solubles debe comprender entre 11 a 14 grados brix, debe ser consistente que lo haga resistente al transporte y de aroma agradable (28,30). En Guatemala se comercializan cinco variedades, que han presentado las características mencionadas anteriormente siendo las siguientes: Salcajá, Diamante, Early Grand, Spring Gold, Indian Blood (28).

### **E. Competencia.**

Actualmente a Guatemala llega fruta procedente de estados Unidos y Chile, y en menor escala u ocasionalmente de México y Francia. En los últimos 7 años la importación ha ido en aumento, lo que indica que hay mayor consumo de la fruta. El total de melocotón que ingresó al país en el año 2000 fue de 963,479 kilogramos. El producto llega a Guatemala a un precio de USA \$ 16.50 la caja de melocotones de 11.3 kilogramos (28).

### **F. Situación de la demanda y la oferta nacional.**

Guatemala es el único país de Centro América y el Caribe que produce melocotón en el ámbito comercial debido principalmente a las condiciones climáticas, en especial por las diferentes altitudes que tiene el país. Esta ventaja natural que dispone Guatemala hace que toda esta región se convierta en el potencial mercado para los productores de melocotón del país. Según fuente de la FAO, los países de Centro América importan 826 toneladas métricas de melocotón por un valor de USA \$ 811,000.00 (no incluido Guatemala) de Estados Unidos y Chile principalmente. Guatemala participa con un 47% de estas importaciones representadas por 390 TM (28).

El consumo per capita de melocotones en el ámbito de Guatemala se ve incrementado año con año, así para 1994 la producción nacional fue de 2390 TM y las importaciones de 331 TM para 1997 la producción nacional fue de 2958 TM y las importaciones subieron a 1008 TM también las exportaciones han ido en aumento, en 1994 se exportaron 158 TM y en 1997 460 TM, cuadro 4 lo que indica que este tipo de fruta tiene demandada a nivel nacional y de Centro América (31).

**Cuadro 4 Producción per capita de melocotón para el año 1997. (8)**

Producción nacional	2958 TM
Exportaciones	460 TM
Importaciones	1008 TM
Consumo nacional	3506 TM
Consumo per capita	0.32 Kg

Fuente: Banguat

La producción nacional se estima en 4608 TM lo que representa un incremento de 1,655 TM en los últimos cinco años. Del total de la producción únicamente el 8.46% de la producción se destina a la exportación y el 91.54% para el consumo interno. Así el volumen de oferta de Guatemala y la producción han ido en aumento en los últimos cinco años, de 1996 al 2001, tiempo durante el cual hubo un aumento de 1872 TM cuadro 5 (31,28).

**Cuadro 5 Oferta de melocotón en fresco en toneladas métricas de 1996 a 2001**

Año	Producción nacional	Exportaciones	Importaciones	Oferta 1/
1996	2736	276	396396	2856
1997	2953	461	1008	3500
1998	3460	102	741	4099
1999	3570	289	1245	4526
2000	3986	390	963	4559

Fuente: Banguat, Profruta

1/ oferta igual producción nacional menos exportaciones más importaciones

### G. Precios.

Los precios han sido regulados por los intermediarios, pero últimamente a través de las organizaciones de productores y las negociaciones con comercializadoras se ha tratado de disminuir la intermediación (31). Los precios de la fruta dependen de la categoría a la que pertenece y estos alcanzan desde los Q 4400.00 hasta Q 13200.00 la TM, la norma establecida clasifica la fruta en extra, grande, primera, segunda, tercera, y pepita, ver cuadro 6 (28).

**Cuadro 6 Precio de la tonelada métrica de melocotón en quetzales puesto en centro de acopio para el año 2001.**

CATEGORIA	PRECIO/TM
Extra	Q 13,200.00
Grande	Q 9900.00
Primera	Q 7700.00
Segunda	Q 5500.00
Tercera	Q 3300.00
Pepita	Q 2200.00

Fuente: ANAPDE .

En Guatemala los precios que alcanza el melocotón nacional oscilán entre los Q 13.20 a Q 24.20 el kilogramo, mientras que el melocotón importado maneja precios entre Q 12.10 a Q 26.40 el kilogramo dependiendo de la calidad del producto. Además los precios bajos del melocotón importado se presentan en los meses de cosecha del melocotón nacional con fines de competencia. En Centro América los precios a nivel de supermercado de un melocotón grande esta a Q 25.19 el kilogramo en Honduras, Q 19.03 por kilogramo en Costa Rica y Q 22.88 el kilogramo en el Salvador .

Los precios se consideran atractivos para el productor lo que ha hecho que se incrementen las áreas del cultivo, pero para mantenerlos o mejorarlos ahora que las producciones se están incrementando por la entrada a cosecha de nuevas plantaciones se deben establecer nuevas estrategias como mejorar los canales de comercialización, cambiar la presentación del producto, incrementar los rendimientos a través del uso de mayor tecnología, reducción de los costos de producción y comercialización, así como de la ampliación de mercados a través de implementación de estrategias de mercado (28).

### **3.1.7 Cultivo de tejidos.**

El cultivo de tejidos, como técnica consiste esencialmente en aislar una porción de la planta (explante) y proporcionarle artificialmente las condiciones físicas y químicas apropiadas para que las células expresen su potencial intrínseco o inducido. Es necesario además adoptar procedimientos de asepsia para mantener los cultivos libres de contaminación microbiana (24), la parte de la planta de la cual son obtenidos los explantes va a depender de:

- El tipo de cultivo que se va a iniciar
- El propósito del cultivo y
- La especie vegetal que se utilice (12).

Por otra parte la investigación en cultivo de tejidos puede cubrir un rango amplio de actividades, por ejemplo desde la investigación básica sobre los procesos bioquímicos y morfológicos de la diferenciación celular hasta la que realizan aquellos laboratorios que se dedican a la investigación aplicada y al desarrollo de tecnologías para utilizar esta investigación en la propagación clonal o en el mejoramiento genético de las plantas (15). En cultivo de tejidos es posible distinguir los siguientes tipos de cultivo aséptico de origen vegetal.

- Cultivo de plántulas obtenidas a partir de semillas.
- Cultivo de embriones a partir de embriones maduros e inmaduros.
- Cultivo de órganos a partir de órganos aislados (incluye cultivos derivados de ápices de raíz, ápices de tallo, primordios foliares o partes inmaduras de la flor).
- Cultivo de tejidos en epidermis y cambium.
- Cultivo de protoplasmas a partir de células separadas de su pared (12).

### **3.1.8 Métodos de micropropagación.**

Una de las aplicaciones mayores del cultivo *in vitro* es la micropropagación en grandes escalas de las plantas especialmente de uso agrícola, se describen a continuación algunos métodos (12).

- Por multiplicación de tallos a partir de yemas terminales y axilares; permite en general obtener plantas genéticamente idénticas, para ello existen los siguientes procedimientos.
  - Cultivo de meristemos o de ápices del tallo
  - Cultivo de nudos con una yema axilar.
- Por organogenesis directa; tallos y raíces son regeneradas directamente del tejido en cultivo sin pasar por la formación de callo.

- iniciación directa de tallos
- embriogenesis somática directa
- Por la formación de órganos de almacenamiento.
- Por microinjerto (12).

#### **A. Micropropagación por brotes axilares.**

Morel (1964) mencionado por Orozco (20) dice que la producción de plantas por brotes axilares es uno de los métodos más utilizados en la propagación *in vitro*, el cual se popularizó a raíz del descubrimiento de la formación de protocormos a partir de ápices en orquídeas. Lo que sugirió que el cultivo de estos ápices podría ser usado para un eficiente y rápido método de propagación clonal en orquídeas (20).

La micropropagación por brotes axilares puede hacerse utilizando ápices del tallo o nudos con una o varias yemas axilares. Los ápices que se usan son de dos centímetros de largo y los nudos pueden ser de ápices terminales o laterales con parte del tallo incorporado. El uso de explantes más grandes es deseable ya que son más fáciles de disectar y tienen una mayor posibilidad de sobrevivir y crecer que explantes pequeños. Pero, por otro lado a mayor largo del explante es más difícil la descontaminación en algunas especies de plantas. La ventaja de este método de propagación es la estabilidad genética que muestran los individuos ya que las plantas regeneradas provienen de una multiplicación clonal (20).

#### **3.1.9 Medio de cultivo.**

Para que se pueda dar un cultivo *in vitro*, las células allí establecidas para crecer requieren una variedad de nutrimentos orgánicos e inorgánicos estos requerimientos se demuestran fácilmente en órganos y tejidos extirpados en plantas superiores e inferiores. Los nutrimentos orgánicos al igual que los inorgánicos, se requieren en dos niveles: uno macro y uno micro (10).

Existe además una cantidad de sustancias orgánicas adicionales que se requieren en cantidades mínimas y que son muy activas en el crecimiento a menudo la necesidad de los factores orgánicos de crecimiento se hace evidente solo cuando se considera un crecimiento largo y continuado o potencialmente indefinido (10). En un estudio de cultivo de tejidos los Zimmerman informaron que la mayoría de los investigadores que trabajan con especies cultivadas usan una modificación del medio Murashige Skoog con un medio de sales minerales alto o bajo en alguna fase del cultivo (9).

Un número grande de sistemas utilizan el medio Murashige Skoog y es particularmente notable desde que el medio se publicó en 1962. Es convenido generalmente que el desarrollo del

medio Murashige Skoog constituyo uno de los descubrimientos más importantes en el cultivo de tejidos (9).

Los medios de cultivo están normalmente constituidos por los siguientes componentes.

- Macronutrientes (siempre agregados)
- Micronutrientes (siempre agregados)
- Vitaminas (generalmente incorporados aunque su número varia)
- Aminoácidos y otra fuente de nitrógeno
- Azucares (fuente de carbohidratos)
- Fuentes de hierro
- Compuestos de origen indefinido (agua de coco, jugos de frutas) (12).

### **3.1.10 Macronutrientes.**

Los medios actuales en relación con los primeros propuestos aportan varias mejoras, como lo es el aumento de las concentraciones de  $\text{KNO}_3$  en el medio, introducción de N en la forma NH (amonio). Estas mejoras permiten un mejor crecimiento de callos pero también la formación de órganos (12). Los componentes inorgánicos son importantes para el crecimiento de las plantas. Si escasean estos elementos aparecen los síntomas característicos correspondientes a la deficiencia de cada elemento (17).

#### **A. Nitrógeno.**

A la vez que es el componente más importante para la organogenesis (12) es el componente de aminoácidos (proteínas), vitaminas y ácidos nucleicos, mientras la planta esta en crecimiento activo, necesita gran cantidad de nitrógeno, este se encuentra en forma de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  y  $\text{KNO}_3$  (15).

Sin embargo la adición en los medios se hace en forma de nitrato de amonio ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ) y esto debido a efectos prácticos de control del pH. Existen varias influencias del nitrógeno, en concentraciones altas promueve el enraizamiento, mientras que en bajas promueve el desarrollo de callo (17).

#### **B. Fósforo.**

El fósforo es uno de los elementos necesarios para el metabolismo de las plantas, principalmente es utilizado para sintetizar ATP como fuente de energía, dentro de los medios de cultivo las plantas lo absorben en forma de  $\text{PO}_4$  (17).

### **C. Potasio.**

Existe relación entre el potasio iónico y la diferenciación de órganos (17).

### **D. Calcio.**

El calcio es componente de la pared celular (17).

## **3.1.11 Micronutrientes.**

### **A. Hierro.**

Para los vegetales, el hierro es importante particularmente ya que es un componente de la clorofila. Normalmente se da en forma de quelatos (Fe-EDTA) en los medios de cultivo, en otra forma se precipitaría (17). Inicialmente fue suministrado bajo la forma de sulfato férrico o de nitrato férrico, pero existía el problema de precipitación a pH ácidos (12).

### **B. Magnesio.**

El magnesio es un componente importante de la molécula de clorofila los otros microelementos son el Zn, B, Cu, Mo, y el Mn, son indispensables en el desarrollo de las plantas en micropropagación (12).

## **3.1.12 Vitaminas.**

De todas las empleadas sólo las vitaminas del complejo B (tiamina, ácido nicotínico, piridoxina (HCl) ) son necesarias y de estas sólo la tiamina es indispensable en el medio (12).

## **3.1.13 Fuentes de carbono.**

Muy pocos cultivos *in vitro* son autótrofos y por lo tanto es necesario agregar al medio una fuente de carbono. La sacarosa (2% a 5%) es la fuente de carbono que más se utiliza y se puede reemplazar por glucosa y en menor medida por fructosa, en general la maltosa y la galactosa son menos efectivas. Así también la incorporación del mioinositol al medio (100 mg/l) generalmente da como resultado un mejor crecimiento de los callos y suspensiones celulares (24).

## **3.1.14 pH del medio.**

Cuando se prepara un medio de cultivo después de añadir todos sus componentes se procede a ajustar el pH final al valor deseado añadiendo OHNa 0.1 N ó HCl 0.1 N al medio. Una

vez ajustado el pH se procede a esterilizar el medio. El pH final del medio de cultivo es un factor importante por diversas razones.

- a. Valores bajos inferiores a 3.5 impiden la solidificación de los agentes gelificantes añadidos a los medios sólidos.
- b. Si la evolución del pH de medio lo hace bajar por debajo de 3.5 se puede producir su licuación.
- c. El valor del pH puede afectar a la solubilidad de algunos componentes del medio de cultivo.
- d. El valor del pH puede afectar a la absorción de determinados nutrientes por parte del explante (por ejemplo la absorción de iones  $\text{NO}_3$  aumenta con la acidez del medio).
- e. El valor del pH del medio puede afectar al pH del citoplasma y como consecuencia a la actividad de muchas enzimas.

Por todas estas razones conviene optimizar el pH del medio para cada caso en concreto. En general no obstante en la mayoría de situaciones se trabaja a pH entre 5.2 y 5.8 (8).

### **3.1.15 Factores que afectan a la técnica de cultivo de tejidos.**

#### **A. La oxidación en el cultivo de tejidos.**

Vuylsteke, mencionado por Villancinda (32) indica que el ennegrecimiento del explante es causado por la oxidación de compuestos fenólicos en la herida del tejido. Estos compuestos son exudados dentro del medio que son atrapados por el agar y acumulados, formando una área negra alrededor del explante. Esta puede interferir con la absorción de nutrientes resultando una inhibición del crecimiento.

Bidwell citado por Villancinda (32) menciona que la compresión o tensión parecen tener poco efecto, doblar la hoja tiene más y él cortarla o fracturarla parece estimular al máximo la respiración.

El herir o romper los tejidos estimula mucho la respiración por tres razones. La primera es la rápida oxidación de los compuestos fenólicos que tiene lugar cuando la organización que mantiene a estos substratos separados de sus oxidasas se rompe. La segunda, son los procesos normales de glicólisis y catabolismo oxidativo que aumentan conforme la disrupción de la célula o células que causa una mucha mayor accesibilidad de los substratos a la maquinaria enzimática de la respiración. Tercera, la consecuencia general de la herida es la reversión de ciertas células al estado meristemático seguido por la formación de callo y la “curación” o reparación de la herida. Tales células y tejidos en activo crecimiento tienen tasas respiratorias muy superiores a los tejidos maduros o en descanso. La tasa de respiración por célula o por unidad de proteína de

algunos componentes de tejidos, como tallos (es decir, las células de compañía del floema, del cambium o del parénquima) puede ser muy alta.

Se reconocen varias enzimas que oxida a los fenoles dando quinonas, dos de las más importantes son la monofenol oxidasa (tirosinasa) y la polifenol oxidasa (catecol oxidasa). Estas enzimas participan en la característica "reacción traumática" de las plantas y contribuyen a la respiración traumática convirtiendo los fenoles liberados en la herida a quinona. El color café en la herida (por ejemplo cuando a un tubérculo de papa o una manzana se le hace un corte o se golpea) es un resultado de dicha reacción. Es evidente por la rápida reacción que ocurre al herir, que tanto la enzima como su substrato, los cuales parecen ser solubles deben haber estado apartados uno del otro en la célula normal, aprisionados en diferentes compartimentos celulares. Las labores siguientes son necesarias para mantener vivo el material en el cultivo.

- a. Pretratamiento de los explantes con un antioxidante por inmersión en una solución estéril de cisterna, ácido ascórbico o ácido cítrico (solos o en combinación) antes de la inoculación en el medio.
- b. Incluir antioxidantes en el medio de cultivo. La adición de carbón activado tiene también el propósito de prevenir el ennegrecimiento.
- c. Transferir frecuentemente los cultivos a un medio fresco. Cuando el ennegrecimiento es severo, el cultivo podría ser transferido semanalmente, si este viene en menor grado la transferencia puede ser cada 3 ó 4 semanas. Se ha observado ocasionalmente que el ennegrecimiento se incrementa cuando niveles de citosina son aumentados para estimular la proliferación del brote (32).

## **B. Establecimiento del cultivo.**

Roca mencionado por Calderón (6) dice que la selección del explante esta definida por el objeto perseguido si el objetivo final es la obtención de callo pueden utilizarse una amplia gama de explantes, siempre y cuando pueda inducirse en los mismos la desdiferenciación del tejido, sin embargo para técnicas de producción de órganos directamente se sugiere utilizar partes que permanecen en crecimiento activo o en constante diferenciación como las puntas meristematicas y las yemas axilares de los tallos.

## **C. Estabilidad genética del material vegetal.**

La propagación con altas concentraciones hormonales puede causar variación también influye en este el tipo de explante que se utiliza y el tipo de desarrollo del mismo. Se ha demostrado que la propagación por medio de puntas meristematicas y yemas axilares provocan

un mínimo de variabilidad mientras que por otro lado la formación y regeneración de callo es desventajosas para la formación de clones fieles al tipo (14).

#### **D. Vitricación de los explantes.**

La vitricación de los explantes es un problema común en la micropropagación de plantas con crecimiento secundario que se caracteriza por la acumulación de agua y la apariencia traslúcida de las hojas. Las hojas vitrificadas tienen apariencia de un parénquima de empalizada apropiado pero poseen grandes espacios intercelulares, la cutícula cerosa es muy delgada y con pocos estomas de los cuales la mayoría no son funcionales. Bajos niveles de etileno y de vapor de agua en la atmósfera del medio de cultivo reducen la vitricación, también puede ser minimizada por la reducción de amonio y de los niveles de brotes producidos. También puede ser reducida limitando la absorción de agua del explante aumentando la concentración de agar o usando otro tipo de sostén como el gelrite (27).

#### **E. Contaminación de los cultivos.**

Un continuo problema en las plantas con crecimiento leñosos es la contaminación durante las fases del cultivo. En las plantas que tienen vellosidad o pubescencia en las puntas meristemáticas y hojas que es muy común, continua siendo un verdadero problema. Dado que la desinfección o esterilización del tejido influye no sólo en la contaminación o no del mismo sino en su capacidad de regenerarse en el medio de cultivo la técnica de desinfección utilizada debe estar orientada a lograr un mínimo de contaminación y oxidación prematura del explante por efectos de plasmólisis (27).

##### **a. Contaminación por bacterias.**

La población de bacterias del suelo sobrepasa a todos los demás grupos de microorganismos, tanto en número como en variedad. Existe gran variedad nutricional y fisiológica de los tipos de bacterias que se hallan en el suelo y que ninguna situación de cultivo, por si sola, puede proporcionar un medio y alimentos adecuados para soportar el desarrollo de todas las distintas células viables de una muestra. En el suelo se encuentran bacterias autótrofas, heterótrofas, mesófilas, termófilas y psicófilas, aerobias y anaerobias, degradadoras de celulosa y oxidantes del azufre, fijadoras de nitrógeno y degradadoras de proteína, y otros tipos (22).

##### **b. Tipos de bacterias.**

Las bacterias sometidas al método de Gram pertenecen a dos grupos, las bacterias grampositivas que retienen el cristal violeta y aparecen de color violeta profundo, las bacterias gramnegativas que pierden el cristal violeta y por el contraste de la safranina aparecen rojas. Las gramnegativas contienen un porcentaje más alto de lípidos que las bacterias grampositivas. Las grampositivas son, por lo general, más susceptibles a la penicilina y menos a la desintegración por métodos mecánicos a algunas enzimas que las gramnegativas (22).

### **c. Bacterias patógenas de las plantas.**

*Pseudomonas*, producen manchas en las hojas, marchitamiento y enfermedades similares, tizones, agallas, canchros y quemaduras de las yemas.

*Xanthomonas sp.* son generalmente patógenas para las plantas y producen necrosis. La mayoría produce colonias amarillas, unas pocas producen colonia desde blanquecinas a color crema. Producen manchas foliares, pudriciones del esqueje, ennegrecimiento de nervaduras, pudriciones del bulbo, canchros y tizones.

*Agrobacterium sp.* viven en el suelo, las raíces o tallos de las plantas en las que producen agallas, y raíz pilosa.

*Corynebacterium*, es un género que incluye parásitos y microorganismos patógenos de las plantas y animales. Los microorganismos patógenos de los vegetales se encuentran en el suelo y en plantas enfermas, produce pudriciones, canchros, marchitamientos, manchas de frutos y fasciación.

*Erwinia sp.* invade los tejidos de las plantas vivas produciendo necrosis seca, agallas, marchitamiento y reblandecimiento de las raíces.

*Streptomyces sp.* son responsables de la roña de las patatas y de las enfermedades de las raíces y raicillas de las patatas dulces (camote, batata) (22).

*Clavibacter*, (*Corynebacterium*) bastones rectos o ligeramente curvos y con dimensiones de 0.5 a 0.9 x 1.5 a 4  $\mu\text{m}$ . En ocasiones presentan segmentos irregularmente teñidos o gránulos e hinchamientos en forma de maza. Varias especies de *Corynebacterium* producen enfermedades en el hombre y los animales (1).

*Xylilla*, bastones rectos principalmente aislados, con dimensiones de 0.3 x 1 a 4  $\mu\text{m}$  y que bajo ciertas condiciones de cultivo forman filamentos largos. Forman colonias pequeñas que tienen bordes lisos o finamente ondulados, gram negativos no móviles sin flagelos estrictamente aerobios y no pigmentados. Con respecto a su nutrición se consideran fastidiosas pues requieren medios nutritivos especiales, viven en el xilema de las plantas (1).

## **F. Algunos antibióticos y fungicidas usados en el control de la contaminación .**

Los antibióticos son una clase especial de agentes quimioterapéuticos obtenidos generalmente de organismos vivos. La palabra antibiótico se refiere a un producto metabólico de un organismo que es perjudicial o inhibitorio en muy pequeñas cantidades para otros microorganismos (22).

Son sustancias que producen los actinomicetos y algunos otros hongos, como el *Penicillium* y son bastante tóxicos a las bacterias (incluso a las bacterias fastidiosas vasculares), micoplasmas, e incluso a algunos hongos.

Los antibióticos que se utilizan para el control de las enfermedades de las plantas son absorbidos y translocados sistemáticamente por las plantas. Estas sustancias controlan las enfermedades de las plantas al actuar sobre el patógeno o directamente sobre el hospedante o bien después de haber pasado una transformación dentro de este último.

Entre los antibióticos más importantes que se utilizan en el control de enfermedades de las plantas se encuentran la estreptomina, las tetraciclinas y la cicloheximida (1).

### **a. Antibióticos.**

#### **1. Las penicilinas.**

El primero de los antibióticos modernos y aun el más útil la penicilina, la producen *Penicillium notatum*, *P. Crisogenum* y otras especies de mohos. La penicilina es selectiva para bacterias grampositivas, algunas espiroquetas y diplococos gramnegativos (*Neisseria*) (22).

#### **2. Estreptomina.**

La estreptomina es producida por *Streptomyces griseus*, un organismo del suelo aislado por Schatz, Bugie y Waksman, quienes comunicaron su actividad antibiótica en 1944. Este descubrimiento fue muy importante porque la estreptomina se une a los ribosomas bacterianos a inhibe la síntesis de proteínas, el proceso de iniciación de las cadenas peptídicas y el reconocimiento de los tripletes normales, inhibe muchos organismos resistentes a las sulfonamidas y a la penicilina. Tiene un espectro antibacteriano amplio que abarca bacterias gramnegativas como *Francisella tularensis* y algunos organismos del grupo de las salmoneras. Tiene también un efecto inhibitorio sobre varias especies de *Mycobacterium* entre esta *M. tuberculosis*, así también en el control de algunas especies de *Xanthomonas*, y varios oomicetos especialmente sobre *Pseudoperonospora humuli* causante del mildiu de los lúpulos (22, 1).

#### **3. Eritromicina.**

La eritromicina es activa contra bacterias grampositivas, algunas gramnegativas y espiroquetas patógenas. En cuanto a su espectro antibacteriano y su utilidad clínica es semejante

a la penicilina. También es activa contra organismos que se han hecho resistentes a la penicilina y a la estreptomina.

#### **4. Cloranfenicol (Cloromicetina).**

El cloranfenicol es un antibiótico de amplio espectro contra muchas bacterias grampositivas y gramnegativas.

#### **5. Tetraciclinas.**

Clortetraciclina, oxitetraciclina y tetraciclina son los nombres genéricos para tres antibióticos que tienen propiedades biológicas y químicas similares estas se unen a los ribosomas bacterianos y bloquean la unión de los aminoacil tRNAs a los aminoácidos, lo cual da como resultado la inhibición de la síntesis de proteínas. Como grupo se les llama comúnmente tetraciclinas. *Streptomyces aureofaciens* produce la oxitetraciclina y se les considera como antibióticos de amplio espectro (22). Actúan sobre muchas bacterias, todos los micoplasmas y algunas bacterias fastidiosas vasculares, y con frecuencia la oxitetraciclina se utiliza con la estreptomina para controlar el tizón de fuego de perales y manzanos (1 ).

### **b. Fungicidas.**

#### **1. Benomyl.**

Fungicida efectivo en el control de una gran variedad de pústulas y manchas foliares ocasionadas por *Cercospora*, tizones, pudrición café de frutos de hueso y pudriciones de frutos en general, roñas de manzanas, duraznos y pecanas, enfermedades de semillas y otras que causan enfermedades del suelo, también controla varias enfermedades ocasionadas por *Sclerotinia* y *Botrytis*.

El benomyl presenta un gran efecto inhibitor de las infecciones ocasionadas por *Rhizoctonia*, *Thielaviopsis*, *Ceratocystis*, *Fusarium* y *Verticillium*, sin embargo no tiene ningún efecto sobre los Oomycetes, algunos hongos imperfectos que producen bacterias oscuras, como *Helminthosporium* y *Alternaria*, algunos basidiomicetes e incluso bacterias (1).

#### **2. Sulfato de cobre pentahidratado.**

Controla a la mayoría de las manchas foliares bacterianas y fungosas, alternariosis, tizones, antracnosis, moniliosis, oomicosis, venturiosis, micosferellosis, plamoparosis, mildius y cancos, pero ocasiona la quemadura de las hojas o el oscurecimiento de frutos, tales como las manzanas, cuando se aplica en climas húmedos y fríos (1 ).

### 3.1.16 Reguladores del crecimiento.

Son compuestos orgánicos diferentes de los nutrientes, que en pequeñas cantidades y por la naturaleza o el arreglo de su molécula fomentan, inhiben o modifican el desarrollo de las plantas (12). Adicionalmente a los nutrientes es necesario agregar una o más sustancias reguladoras frecuentemente auxinas y/o citoquininas pero a veces también giberelinas o ácido abscisico para así mejorar el desarrollo del cultivo *in vitro* de tejidos (14). En micropropagación principalmente se utilizan citoquininas y auxinas como reguladores de crecimiento (24).

#### A. Funciones.

- Para formación de yemas adventicias

Promoción: Auxina < Citocinina

Inhibición: Auxina > Citocinina

- Para formación de raíces adventicias

Promoción: Auxina > Citocinina

Inhibición: Auxina < Citocinina

- Para diferenciación de callo

Promoción: Auxina > Citocinina

Inhibición: Auxina < Citocinina (20).

### 3.1.17 Auxinas.

El nombre auxina significa en griego "crecer" (14) y es el término genérico que se aplica al grupo de compuestos caracterizados por su capacidad para inducir la extensión de las células (12). El ácido indolacético (AIA) es la más predominante sin embargo evidencias recientes sugieren que existen otras auxinas indolicas naturales en las plantas (4). Aunque la auxina se encuentra en toda la planta las más altas concentraciones se localizan en las regiones meristemáticas en crecimiento activo y se le encuentra tanto como molécula libre o en formas conjugadas inactivas (4). La auxina ha sido implicada en la regulación de un número de procesos fisiológicos. (4, 18).

- *In vitro* se utilizan para promover la división celular y la diferenciación de raíces.

- Estimula el crecimiento y maduración de frutos.
- Floración.
- Senectud.
- Geotropismo. La auxina se dirige a la zona oscura de la planta produciendo células que se encuentran en la zona clara de la planta. Esto produce una curvatura de la planta hacia la luz movimiento que se conoce como fototropismo.
- La caída de hojas, flores y frutos jóvenes.
- Dominancia apical. El efecto inicial preciso de la hormona que subsecuentemente regula este arreglo diverso de eventos fisiológicos no es aún conocido. Durante la elongación celular inducida por la auxina se piensa que actúa por medio de un efecto rápido sobre el mecanismo de la bomba de protones AT en la membrana plasmática y un efecto secundario mediado por la síntesis de enzimas.

Normalmente se usan los componentes siguientes como fuente de auxina (24).

De origen natural:

- Ácido indolacético (AIA)
- Ácido fenilacético

De origen sintético:

- Ácido naftalenacético (ANA)
- Ácido indol 3-butírico (IBA)
- Naftalenacético (2,4 D) (14,24).

#### **A. Ruta de biosíntesis.**

El precursor primario en la planta es el triptofano y la biosíntesis se realiza en ápices en crecimiento hojas en desarrollo (hojas pequeñas en crecimiento), semillas, frutos. Y donde se sintetiza existe más cantidad (8), para ello existen 3 rutas de síntesis.

- a. Vía del ácido indol-pirúvico, es la vía primaria de la síntesis
  - b. Vía del triptomina
  - a. Vía del indol-acetaldoxina, presente sobre todo en el género *Brassica* (repollo coles)
- (4).

#### **B. Modo de acción.**

A nivel celular la estimulación del crecimiento exige necesariamente en las células vegetales un aumento de la plasticidad de la pared celular, la cual es consecuencia de la ruptura de enlaces de las moléculas que configuran esta pared. La auxina induce el aumento de la plasticidad parietal, y la extensión de los protones H del citoplasma hacia el espacio parietal. El aumento de acidez provoca la distensión de las paredes y la activación de ciertas enzimas. Esta acción conlleva dos fases, una acción rápida y una acción lenta (4).

- Activa la bomba de protones
- Coenzima (H-receptor): Activa una serie de enzimas al unirse al receptor.
- Aumenta la síntesis de RNA
- Síntesis de nuevo de mRNA (4).

### **3.1.18 Citoquininas.**

Las citoquininas son hormonas vegetales naturales que estimulan la división celular en tejidos no meristemáticos. Inicialmente fueron llamadas quininas, sin embargo debido al uso anterior del hombre para un grupo de compuestos de la fisiología animal, se adopta el término citoquinina (citocinesis o división celular). Son producidas en las zonas de crecimiento como los meristemas en la punta de las raíces. Las mayores concentraciones de citoquininas se encuentran en embriones y frutas jóvenes en desarrollo ambos sufriendo una rápida división celular. Las citoquininas también se forman en las raíces y son translocadas a través del xilema hasta el brote. Sin embargo, cuando los compuestos se encuentran en las hojas son relativamente inmóviles. Entre los efectos generales de las citoquininas en los procesos fisiológicos de las plantas se encuentran (4).

- Estimulación de la germinación de las semillas.
- Estimulación de la formación de frutas sin semillas.
- Ruptura de letargo de la semilla.
- Inducción de la formación de brotes.
- Mejora la floración.
- Alteración en el crecimiento de frutos.
- Ruptura de la dominancia apical.
- Mantiene la síntesis de proteínas.
- Acción de la organogénesis (8).
  - Suprime el efecto inhibitorio de la auxina sobre las yemas específicas para el desencadenamiento de la mitosis
  - Retarda la senescencia de los tejidos (8).

- Aumenta la división y diferenciación celular. Su acción ocurre en dos etapas.
  - Durante la mitosis aumenta la cantidad de ADN
  - En la citocinesis estimulan la síntesis de proteínas específicas de la división celular (8).

Se adicionan al medio de cultivo para promover la división celular y la diferenciación de yemas y brotes adventicios de callos y órganos. Se usan los compuestos siguientes como fuente de citoquinina (24).

Cinética.

BA (6-Benciladenina).

BAP (6-Bencilaminopurina) estimula la proliferación de yemas axilares

2ip (N-Isopentaniminopurina).

Zeatina, promueve el crecimiento del tallo principal (24).

#### **A. Ruta de biosíntesis.**

Las citoquininas están presentes en todos los tejidos y su metabolismo es complicado, estas sustancias están presentes en el tejido bajo varias formas.

- a. Bases libres
- b. Ribonucleosis
- c. Ribonucleótidos

como constituyente de ciertos (ARNT) existen dos mecanismos de biosíntesis.

- a. Isopentenilación de la adenina monofosfato (AMP)



Las tres primeras formas se originan por esta vía.

- b. Por degradación de moléculas de ARN, por esta vía se produce muy poca citoquinina (12).

#### **B. Modo de acción.**

Se considera que actúan a través del control de la síntesis de proteínas específicas para el desencadenamiento de la mitosis (8).

### 3.1.19 Giberelinas.

Es la hormona del crecimiento son diterpenoides tetracíclicos ácidos derivados del ent – kaureno (14). Todas tienen la misma estructura química, el ent-giberelano y las diferentes giberelinas difieren por las características de los grupos laterales (-CH<sub>3</sub>, -CH<sub>2</sub>OH, CHO, etc.) (12), existen dos tipos.

- de 20 carbonos
- de 19 carbonos (+ activos) (8)

entre los efectos fisiológicos en las plantas se encuentran los siguientes:

- Producen el alargamiento de entrenudos en plantas enteras. (su déficit produce plantas enanas).
- Estimulan la floración sobre todo en plantas de roseta al favorecer la elongación de los entrenudos.
- Estimulan el crecimiento de hojas y de frutos (partenocarpia).
- Estimulan la germinación y la brotación de yemas al suprimir la inhibición causada por procesos de dormancia (12).
- Revierte la planta adulta en juvenil (8).
- Baja desarrollo de fruto y la maduración (8).
- Vernalización (8).

#### A. Ruta de biosíntesis.

- Precursor primario. El ácido mevalónico (MVA) a partir de él se generan una serie de compuestos intermediarios hasta llegar al Kaureno y luego al aldehído del AG<sub>12</sub>. De este se derivan las múltiples giberelinas que se conocen. Pero antes de llegar al Kaureno existe un paso intermedio que forma el Farnesil – Pirofosfato (FPP). Es un paso clave ya que a partir de él podemos orientar la síntesis hacia el ácido giberélico o desviarla hacia el ácido abscísico (ABA). Esto dependerá de la situación fisiológica de la planta (12).
- Sitios de síntesis. Las síntesis ocurren en aquellas regiones que presentan división celular activa: ápices de tallo y raíces, en las hojas, en el embrión (12). También se presenta en órganos productores (flores, semillas inmaduras, embriones germinados) (8).

#### B. Mecanismos de acción.

- Estimula la síntesis de la  $\alpha$ -amilasa, enzima encargada de hidrolizar el almidón para formar compuestos energéticos necesarios al crecimiento del embrión.

- Efecto sobre la organización de la membrana, participan en la síntesis activa de enzimas implicadas en la formación de los lípidos que conforman la membrana celular (12).

### **3.1.20 Aplicación de los reguladores del crecimiento al cultivo *in vitro*.**

Adicionalmente a los nutrientes generalmente es necesario agregar una o más sustancias reguladoras frecuentemente auxinas y/o citoquininas, pero a veces también giberelinas o ácido abscísico para mejorar el desarrollo del cultivo *in vitro* de tejidos y órganos. Por otro lado los requerimientos de estas sustancias varían considerablemente con los tipos de tejidos y los niveles endógenos de estos reguladores, así como la finalidad del cultivo *in vitro* (15).

#### **A. Auxinas.**

Sé relaciona con la elongación, tropismo, dominancia apical, abscisión, enraizamiento y otros. En cultivo *in vitro* las auxinas son utilizadas principalmente para la diferenciación de raíces y la inducción del callo. El IBA y el ANA son usados frecuentemente para enraizamiento, el 2,4-D es muy efectivo para la inducción de callos. Las auxinas se disuelven usualmente en etanol diluido o en una solución de hidróxido de sodio 1N (16).

##### **a. Efectos en los tejidos *in vitro*.**

- Promueve el crecimiento del callo, de las suspensiones celulares, de órganos (meristemas y ápices)
- Regula la morfogénesis, especialmente en asociación con las citoquininas (12).
- Inducción de raíces (10).

#### **B. Citoquininas.**

En los medios para cultivo *in vitro* se incorporan citoquininas para promover la división celular y la inducción de yemas adventicias en callos y órganos. Además se usan estos compuestos para la proliferación de tallos axilares por la ruptura de la dominancia apical. Las citoquininas generalmente son diluidas con ácido clorhídrico o hidróxido de sodio 1N (15). *In vitro* inhibe las auxinas-oxidasas (mediante el nivel de auxina en los tejidos). Está también implicado en el metabolismo de los carbohidratos, en la actividad enzimática de las vías glucolítica y oxidativa de las pentosas fosfato (12).

##### **a. Efectos en los tejidos *in vitro*.**

- Estimulación de la división celular. En su ausencia la metafase de la mitosis es considerablemente afectada.
- Involucradas en la síntesis de proteína.
- La proliferación de callo proveniente de tejidos de dicotiledoneas requiere la presencia tanto de auxina como de citoquinina, pero la aplicación en forma secuencial es más provechosa (12).
- Modificación de la dominancia apical (15).

### **C. Giberelinas.**

Existen multitud de giberelinas conocidas, la de mayor uso es el GA<sub>3</sub> pero debe tenerse en cuenta que es muy sensible al calor ya que se pierde el 90% de su actividad después del autoclaveado. Comparado con las auxinas y citoquininas las giberelinas se utilizan raramente. La mayoría de los explantes sintetizan cantidades suficientes de este grupo de hormonas. Cuando se aportan giberelinas al medio de cultivo su función principal es el alargamiento de las regiones subapicales. El GA<sub>3</sub> es soluble en agua fría hasta 1000 mg l<sup>-1</sup> (15) y sus efectos son debidos a la estimulación de enzimas específicas o a cambios en la disponibilidad endógena de auxina (12).

#### **a. Efectos en los cultivos *in vitro*.**

En general el crecimiento y la diferenciación ocurre sin giberelinas, en el caso de cultivos de células en bajas densidades son sin embargo esenciales.

- Efecto sobre la morfogénesis.
- Inhibe la formación de embriones somáticos.
- Tiene poco o ningún efecto en la diferenciación de células.
- Estimula el crecimiento y el desarrollo en órganos preformados (meristemo) generalmente impide la formación de raíces, en el cultivo de ápices estimula el crecimiento y su presencia es generalmente crítica para permitir la elongación de los tallos formados (12).

#### **3.1.21 Propagación tradicional del cultivo de *Prunus persica* (L.) Batsch.**

Uno de los factores que afectan en mayor proporción el rendimiento en las variedades de estos frutales es el ataque de patógenos en especial de virus, los cuales se propagan por medio de los métodos de reproducción vegetativa tradicional como son el uso de acodo aéreo, estacas y la injertación, aunque la mayor parte de la producción de durazno para patrones depende de

árboles procedentes de semillas por medio de la cual las enfermedades virosas y las originadas por otros patógenos se transmiten con mayor dificultad, pero con esta se presentan mayores problemas de heterogeneidad en los árboles y en la producción en cuanto a vigor, precocidad, productividad, y longevidad entre otros (23).

### **3.1.22 Cultivo de tejidos en *Prunus persica* (L.) Batsch.**

#### **A. Importancia de la propagación vegetativa *in vitro* del durazno.**

El uso de la técnica de cultivo de tejidos, la termoterapia y la quimioterapia, ya sea solas o en su combinación representan buenas alternativas para la propagación de durazno y ofrecen la posibilidad de obtener plantas homogéneas y sanas para proveer al productor de material vegetativo más uniforme y libre de patógenos, este método mejora también en forma sustancial la tasa de multiplicación aportando una mayor cantidad de plantas en un menor tiempo y espacio (23).

La técnica de propagación *in vitro* representa ventajas potenciales respecto a las tradicionales ya que aparte de usarse en la producción de farmacéuticos y obtención de otros productos naturales, también es aplicable al mejoramiento genético de cultivos, lo cual permite la recuperación de clones libres de enfermedades y la preservación de germoplasma valioso, así como una rápida multiplicación clonal de variedades seleccionadas (Murashige 1974) (2).

#### **B. Trabajos realizados en el género *Prunus persica* (L.) Batsch utilizando la técnica de propagación *in vitro*.**

En la actualidad, muy pocos árboles son propagados comercialmente por técnicas *in vitro* debido a la dificultad en su propagación Zimmerman mencionado por Altamirano (2), de las investigaciones hechas en el género *Prunus*, algunas se han enfocado hacia la obtención de callos a partir de discos de hoja de donde se ha logrado regenerar plantas completas. Así mismo se han inducido callos a partir de raíces siendo posible obtener plantas de algunas especies de *P. dawyckensis*, *P. canescens* y *Prunus incisa x serruta* (2). Trabajos considerables se han hecho en melocotones *Prunus persica* (L.) Batsch. con modificaciones menores de los medios convencionales, pero sólo con un éxito modesto (18).

#### **C. Métodos de cultivo de plantas seleccionadas.**

Almehdi y Parfitt divagaron que tuvieron a partir de las normas un éxito, aparentemente notable con etapas sucesivas I y II usando para ello de ambos explantes, tanto juveniles como maduros (18). Ellos fueron partidarios del crecimiento de retoños en la multiplicación de 56

variedades usando para ello el medio Almehdi y Parfitt. Sin embargo el establecimiento en el suelo continua siendo un problema (18).

#### **D. Propagación *in vitro* de durazno *Prunus persica* (L.) Batsch. a partir de yemas axilares.**

Altamirano Z y compañía (2) trabajaron durante el periodo de julio de 1989 a abril de 1990, teniendo como objetivo conocer la respuesta en la propagación *in vitro* de dos genotipos de durazno con diferente época de floración la selección 66 (tardía) y la selección 50 (intermedia). El trabajo consistió en tres etapas a) establecimiento aséptico del cultivo, b) multiplicación, y c) enraizamiento.

De los ocho medios probados para el establecimiento el medio de Almehdi y Parfitt sólido fue el más adecuado ya que permitió un 78% de sobrevivencia y 75% de brotación contra 43.75% y 25% respectivamente del medio Murashige y Skoog (1962) sólido usado como testigo. El mayor grado de multiplicación de brotes en la selección 66 (S-66) se alcanzo con 4 mg/l, y en la selección 50 (S-50) con 6 mg/l de BAP, en ambas selecciones se observaron diferencias en cuanto a enraizamiento de brotes. La S-66 mostró un mejor enraizamiento que la S-50 obteniendo en el nivel de 4.06 mg/l y de 8.12 mg/l de ácido indolbutirico (IBA) obteniendo raíces con mayor longitud en el nivel de 4.06 mg/l. En la S-50 el enraizamiento fue mas escaso, sobresaliendo el nivel de 2 mg/l de ácido naftalanacetico (ANA) (2).

#### **E . Obtención de plantas libres de virus y propagación *in vitro* de durazno *Prunus persica* (L.)**

##### **Batsch var. Diamante**

En esta investigación se consideró el interés de obtener plantas de durazno cultivar Diamante, libres de virus en condiciones *in vitro*, el estudio se dividió en 4 fases experimentales. En la primera fase, se utilizaron técnicas de termoterapia y quimioterapia para intentar erradicar los patógenos de plantas de vivero y campo. Se trataron las plantas con estreptomycin + oxytetraciclina y captan. Se mantuvo el material vegetativo en invernadero a una temperatura de 33 a 37° C durante el día y 25 a 30 °C durante la noche por 25 días antes de la siembra *in vitro*. Las varetas se mantuvieron en refrigeración durante 72 horas se desinfectó con cloralex al 10% (6% de hipoclorito de sodio) y tween 20. En la segunda fase se probó el medio de Murashige y Skoog (MS 1962) con diferentes niveles de 6- benzil-aminopurina (BA), kinetina, 2-isopentenil adenina (2-ip) y 0.1 mg/l de ácido indol acético (AIA), complementado con tiamina (0.4 mg/l) e inositol (100mg/l), 0.3 % de sacarosa, 0.8% de agar; pH de 5.7 +/- 0.1. Las mejores respuestas para la inducción de la brotación y crecimiento de yemas axilares y ápices se obtuvieron con 100% de sales de Murashige y Skoog y 1.5mg/l de BA. En la tercera fase de la investigación

(multiplicación de los brotes obtenidos a partir de las yemas axilares), se complementó el medio básico con 0.5 mg/l de Piridoxina y 0.5 mg/l de ácido nicotínico. Se determinó que las mejores respuestas para la multiplicación y crecimiento de brotes se presentaron con 75 ó 100% del medio básico de MS (1962) y 2.0 mg/l de BA. En la cuarta fase, el mejor tratamiento para las variables crecimiento y número de raíces fue con 0.4 mg/l de AIA en un medio básico de Murashige y Skoog al 75%, complementado con vitaminas, 2% de sacarosa, 8 g/l de agar y con un pH de 5.7+/-0.1 (23).

#### **F. Cultivo *in vitro* de embriones de melocotón.**

Este trabajo tuvo como objetivo la reducción del procesamiento de mejoramiento genético y rescate de embriones maduros. Esto porque generalmente para el mejoramiento genético de plantas se requiere un plazo largo para obtener una variedad nueva tratándose de frutales deciduos este tiempo es mucho más largo que con otras especies. En el caso específico del melocotón además de tomar un tiempo largo para obtener una variedad nueva se ha encontrado el problema de que al realizar los cruzamientos entre las variedades criollas y las introducidas se da un aborto del fruto a edad muy temprana, cuando aun el embrión no ha completado su ciclo para llegar a la madurez por lo que no ha sido posible obtener semilla de estas variedades producto de esta cruce. A través del cultivo *in vitro* de embriones puede obtenerse una nueva variedad en un tiempo mucho más corto ya que no depende del ambiente natural y se puede ejecutar en cualquier tiempo (18). Para este trabajo se utilizó las variedades, Y17-168, June Gold, Early Grande, Necta Red, J-9-37, 14-DR-60, y Salcajá. Como medio de cultivo se utilizó el medio basal Murashige y Skoog. Obteniendo como resultado crecimientos defectuosos en algunas variedades, esto debido a la relación entre tamaño de embriones y germinación como lo demuestran los resultados que entre más grande el embrión mejores resultados. Y entre algunas recomendaciones se tiene que se debe seleccionar medios de cultivos para cada variedad (16).

#### **G. Micropropagación de materiales de frutales deciduos tratados con radiación.**

La técnica de cultivo de tejidos representa una buena alternativa para propagar vegetativamente los materiales que son tratados con radiación para inducir mutaciones que conduzcan a desarrollar individuos con características de precocidad, ventaja muy importante en la producción de frutales deciduos ya que permite que los árboles entren en producción en un tiempo menor de lo normal (26).

Las ventajas al utilizar cultivo de tejidos para la propagación de los materiales tratados serian que desde el cultivo *in vitro* se podría observar que individuos presentan una mejor

respuesta en vigorosidad, precocidad, brotación y enraizamiento, y desde ahí hacer una selección de estos individuos, incrementarlos hasta el número deseado y adaptarlos a condiciones naturales para posteriormente evaluarlos en el campo. Otra de las ventajas es que dado al ambiente controlado bajo el cual se manejan las especies se reduce considerablemente el efecto del ambiente durante la evaluación de la intensidad de radiación más adecuada para los cultivares en tratamiento (26).

El material vegetal utilizado en este trabajo fueron varetas de árboles establecidos en el campo de melocotón var. Salcajá y de manzana Wealthy con yemas en estado de dormancia y como medio de cultivo el Murashige y Skoog + bencil amino purina. Entre los resultados se tiene que los tratamientos de rayos gamma aplicados a varetas de melocotón Salcajá y de manzana Wealthy, no tuvieron éxito en la regeneración de plantas ya que el caso de Salcajá se tuvo un 100% de contaminación de los explantes con lo cual no hubo sobrevivencia y respecto a Wealthy se tuvo un 90% de oxidación de los explantes por lo cual tampoco hubo sobrevivencia de los explantes, la contaminación se atribuyo al hecho de que el material provenía del campo con lo cual estaba expuesto a microorganismos contaminantes (26).

## **3.2 MARCO REFERENCIAL**

### **3.2.1 Ubicación del área experimental.**

La investigación se desarrolló en el laboratorio de cultivo de tejidos vegetales de la Subarea de Manejo y Mejoramiento de Plantas, Área Tecnológica de la Facultad de Agronomía de la Universidad de San Carlos de Guatemala, así como en el invernadero ubicado en el centro experimental docente de Agronomía (CEDA).

### **3.2.2 Origen de la variedad Salcajá.**

En Guatemala no existe un historial exacto del cultivo mejorado del melocotón aunque se tiene conocimiento que el primer intento por su desarrollo se dio a partir de la década de los 40, cuando el Estado y algunos agricultores particulares impulsaron su cultivo por medio de la introducción de variedades mejoradas. De los Estados Unidos de América fueron introducidos materiales para su adaptación los cuales por sus altos requerimientos de frío no lograron adaptarse (28).

No fue sino hasta que un prominente pomólogo del municipio de Salcajá en Quetzaltenango, Manuel Ovalle Soto, trabajó en el mejoramiento genético de cultivares, produciendo un cultivar comercial a la que denomino Salcajá y que hoy es la más ampliamente propagada en el país, este cultivar se obtuvo con cruces de las variedades norteamericanas Elberta y W.H. Hall con un criollo guatemalteco. La producción comercial de este cultivar que inicio a partir de 1970

(28).El cultivar por sus características de calidad, pero sobre todo por su adaptabilidad a las condiciones de Guatemala se propagó en el altiplano occidental y posteriormente a otras regiones del país (28).

### **3.2.3 Descripción del fruto de la variedad Salcajá.**

Es un fruto de color amarillo con una chapa roja de pulpa consistente adherida al hueso soporta bien el transporte, 180 días de floración a cosecha. Frutos medianos a grandes que oscilan entre los 150 a 200 gramos. Con aroma característico y una concentración de sólidos solubles que oscilan de 12 a 15 grados brix. La época de la cosecha depende de la región y va desde finales de julio hasta principios de octubre. En Chimaltenango y Sacatepéquez se cosecha desde la segunda quincena de julio hasta fines de septiembre. En Quetzaltenango se cosecha desde el mes de septiembre hasta la segunda semana de octubre. Esta diferencia en la época de cosecha determina una ventaja para los productores de Chimaltenango y Sacatepéquez, ya que la competencia no existirá, únicamente durante la primera quincena del mes de septiembre. Se estima un requerimiento de frío de 500 a 600 horas y puede emplearse tanto para el consumo en fresco como para la industria (28).

### **3.2.4 Caracterización agronómica del melocotón Salcajá *Prunus pérsica* (L). Batsch var. Salcajá.**

De acuerdo con el Instituto de Ciencia y Tecnología Agrícola (ICTA) se reporta la siguiente información para la variedad Salcajá (3).

#### **A. Porte.**

Altura promedio; 2.70 metros, muy vigoroso, longitud media de chupones; 44 cms, grosor: 5 mm de diámetro.

#### **B. Corteza.**

Color en partes viejas; grisáceo, color en partes nuevas; verde, en la corteza vieja hay pecas de forma horizontal.

#### **C. Formación de yemas.**

Tamaño; mediano, distancia entre yemas vegetativas; 3.5 cms distancia pequeña.

#### **D. Hojas.**

Grandes; 15.8 x 4.2 cms, forma; alargada, color; verde oscuro, con bordes aserrados.

#### **E. Floración.**

Posee abundante floración.

**F. Época en que florece el 50% de yemas.**

Finales de marzo, tamaño de flores; grandes, color; rosado suave.

**G. Época de maduración.**

Finales de agosto.

**H. Periodo de duración entre el cuajado de las flores y la maduración.**

21 semanas (marzo - agosto)

**I. Dormancia.**

Diciembre - febrero.

**J. Fructificación.**

Se detalla a continuación las siguientes características.

**Cuadro 7 Caracterización agronómica del fruto del melocotón Salcajá  
*Prunus persica* (L.) Batsch. var. Salcajá (3)**

Rendimiento de frutos/ árbol	50 Kg
Forma de frutos	redondos
Color externo	amarillo con partes rojas
Longitud del pedúnculo	no tiene
Color pulpa	amarillo fuerte
Sabor	dulce y jugoso
Características de transporte	excelente

Fuente: ICTA

**3.2.5 Generación de empleo en plantaciones de Salcajá .**

En la generación de empleo se ven beneficiadas 221,409.6 personas, esto sólo para el caso de las plantaciones de Salcajá. Si tomamos en cuenta que se emplean 240 jornales/ha, teniendo un total de 922.54 (85.42% del área total) hectáreas sembradas con Salcajá, de las 1080 existentes actualmente en las zonas productoras. El 14.58% restante equivalente a 157.46 hectáreas se encuentran sembradas con otras variedades, lo que beneficia a 37,790.4 personas, sumando ambos resultados nos da que 259,200 personas son beneficiadas con dicho cultivo (28).

## 4. OBJETIVOS

### 4.1 General

Evaluar el efecto de antioxidantes, desinfectantes, medios de cultivo y reguladores de crecimiento en la propagación *in vitro* del cultivo de yemas axilares de melocotón *Prunus persica* (L) Batsch var. Salcajá.

### 4.2 Específicos

- 4.2.1 Determinar la efectividad de los antioxidantes en la sobrevivencia de las yemas axilares a la oxidación, en los medios de cultivo.
- 4.2.2 Determinar la efectividad de los desinfectantes en la sobrevivencia de las yemas axilares a los microorganismos contaminantes.
- 4.2.3 Determinar las combinaciones de bencilaminopurina y ácido indolbutírico que inducen a la brotación de las yemas axilares en cada medio de cultivo
- 4.2.4 Determinar la concentración de medio nutritivo Murashige y Skoog y la dosis de ácido indolbutírico que induce la formación de raíces, en brotes provenientes de yemas axilares

## 5. HIPOTESIS

- 5.1 Al menos un tratamiento de antioxidante es efectivo en la sobrevivencia a la oxidación en explantes de melocotón *Prunus persica* (L.) Batsch var. Salcajá.
- 5.2 Al menos un tratamiento de desinfectantes influye en la sobrevivencia de explantes de melocotón *Prunus persica* (L.) Batsch var. Salcajá a microorganismos contaminantes.
- 5.3 Al menos una combinación de bencilaminopurina y ácido indol butírico inducirá a la brotación de explantes de melocotón *Prunus persica* (L.) Batsch var. Salcajá cultivados *in vitro*.
- 5.4 Al menos una concentración del medio basal Murashige & Skoog y una dosis de ácido indolbutírico favorece a la inducción de raíces en brotes de melocotón *Prunus persica* (L.) Batsch var. Salcajá.

## 6. MATERIALES Y METODOS

### 6.1 Reactivos y materiales.

Salas minerales, constituyentes de los medios de cultivo, agua destilada, agua desmineralizada, hipoclorito de sodio, alcohol al 70 y 90%, sacarosa, ácido giberélico, ácido indolbutirico, bencil amino purina, agar, ácido clorhídrico, hidróxido de sodio 1 N, papel aluminio, papel toalla, maskin, marcadores, mesas, frascos de 100 ml de capacidad.

### 6.2 Cristalería y equipo.

Balanza analítica, potenciómetro, horno microondas, autoclave, campana de flujo laminar, refrigerador, agitador magnético, pipetas de 1, 5, 10 y 25 mililitros, micro pipetas de 100 y 1000 mililitros, probetas de 10, 50, 100, 250, 500 y 1000 mililitros, erlenmeyer de 25, 50, 100, 250, 500 y 1000 mililitros, frascos, mecheros, papel parafilm, agujas de disección, micro espátulas, tijeras, bisturí, pinzas, pizetas, cajas petri, frascos de 100 mililitros , incubadora.

### 6.3 Medios de cultivo.

#### 6.3.1 Preparación de las soluciones madres.

Las soluciones madres se hicieron en función de los componentes para cada uno de los grupos que conforman los medios Almehdi y Parfitt (AP) (18 ), Gamborg *et al* (B5) (17), Linsmaier y Skoog (LS) (9), Murashige y Skoog (MS) (18). Esto con el fin de ahorrar pasos en la elaboración de los medios de cultivo. A continuación se describe la forma en que se realizó la preparación de las soluciones patrón para el medio Linsmaier y Skoog ya que se siguió la misma metodología para los medios Almehdi y Parfitt, Gamborg y Murashige y Skoog respetando siempre los grupos de los componentes para cada medio.

#### A. Solución madre de macronutrientes del medio nutritivo Linsmaier y Skoog.

Se preparó 700 ml de esta solución, para lo cual se empleó un beacker de 1 litro, en el cuadro 8 se describen los componentes.

**Cuadro 8 Componentes de macronutrientes  
Linsmaier y Skoog a concentración 20 X.**

Sustancia	Peso (grs.)
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	23.1
KNO <sub>3</sub>	26.6
MgSO <sub>4</sub> (7H <sub>2</sub> O)	5.18
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2.38

Pesados los componentes se agregaron al beacker conteniendo 250 ml de agua desmineralizada estéril, este se mantuvo en constante agitación en el agitador magnético hasta observar que todas las sustancias estuvieran disueltas, el contenido se traslado a una probeta de 1000 ml luego se aforó con agua desmineralizada estéril hasta llegar al volumen deseado, seguidamente se volvió a agitar la solución y se guardo en frascos esterilizados identificados y tapados adecuadamente, estos se guardaron hasta su huso en refrigeradora a una temperatura de 4 °C. De igual forma se preparó una solución patrón a 30X de macronutrientes consistentes en  $\text{CaCl}_2(2\text{H}_2\text{O})$  para lo cual se prepararon 500 ml.

### **B. Solución madre de micronutrientes.**

Se prepararon dos soluciones por aparte de 100 ml cada una, a las que se les nombró micro A y micro B, para ello se agregaron 50 ml de agua desmineralizada estéril en un beacker de 250 ml luego de pesados se agregaron los componentes que se describen a continuación.

**Cuadro 9 Componentes micronutrientes del medio nutritivo Linsmaier y Skoog**

Sustancia	Peso (gram)
	MICRO A a 1000X
$\text{MnSO}_4 \cdot (4\text{H}_2\text{O})$	2.23
$\text{ZnSO}_4 \cdot (7\text{H}_2\text{O})$	0.86
$\text{H}_3\text{BO}_3$	0.62
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.025
	MICRO B a 5000X
$\text{CoCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.0125
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.0125

Pesados los componentes se agregaron al beacker conteniendo 50 ml de agua desmineralizada estéril esta se mantuvo en constante agitación en el agitador magnético hasta observar que todas las sustancias estuvieran disueltas el contenido se traslado a una probeta de 500 ml luego se aforó con agua desmineralizada estéril hasta llegar al volumen deseado, seguidamente se volvió a agitar la solución y se guardo en frascos esterilizados, identificados y tapados adecuadamente, además de colocarles forro de papel aluminio, estos se guardaron hasta su huso en refrigeradora a una temperatura de 4 °C

Por aparte se preparó otra solución de micro nutriente de KI la cual estuvo a 1000X para ello se preparó 50 ml en la que se agregó 0.0415 gramos del compuesto mencionado.

### **C. Solución madre de hierro a 200X.**

Se preparó una solución de 250 ml de la siguiente forma:

- a. En un beacker se colocó 100 ml de agua desmineralizada estéril
- b. Seguidamente el beacker se colocó en la estufa
- c. Se agregó al agua caliente 1.865 grm de  $\text{Na}_2\text{EDTA}(\text{H}_2\text{O})$
- d. Disuelto lo anterior se agregó 1.3925 grm de  $\text{FeSO}_4(7\text{H}_2\text{O})$ .

Disueltos los elementos, la solución se aforó en una probeta al volumen deseado, se volvió a agitar y luego se traslado la solución a su envase colocándole su respectiva etiqueta, además de colocarle forro de papel aluminio, se tapo debidamente y se guardo en refrigeradora a 4°C.

#### **D. Solución madre de vitaminas a 1000X.**

Se preparó una solución de 50 ml para lo cual en un beacker de 100 ml se colocó 25 ml de agua desmineralizada estéril en constante agitación, se peso 0.02 grm de tiamina y se agregó al beacker, después de disuelto el compuesto se aforó en una probeta de 50 ml según el volumen deseado, la solución se traslado a un envase de vidrio y se guardo en refrigeradora a 4°C.

#### **E. Solución madre de myo inositol a 1000X.**

Se preparó una solución de 100 ml para lo cual en un beacker de 100 ml se colocó 25 ml de agua desmineralizada estéril en constante agitación, se peso 1.5 grm de myo inositol y se agregó al beacker, después de haber disuelto el compuesto se aforó en una probeta de 100 ml según el volumen deseado, la solución se traslado a un envase de vidrio y se guardo en refrigeradora a 4°C.

#### **F. Reguladores de crecimiento.**

Los reguladores utilizados fueron, BAP (bencil-amino purina), IBA (ácido indol butírico) GA<sub>3</sub> (ácido giberelico) previo a su utilización el BAP y el IBA se disolvieron en hidróxido de sodio 1 N, para el GA<sub>3</sub> se disolvió en alcohol al 95%.

Se realizaron soluciones madres para cada regulador en las siguientes concentraciones, BAP 2000 mg/l, IBA a 800 mg/l, GA<sub>3</sub> 2000 mg/l.

#### **6.3.2 Preparación de los medios de cultivo.**

Se preparó la cantidad de medio basal según conveniencia para lo cual se siguió la siguiente metodología. En un beacker se agregó agua desmineralizada estéril, se agregó al recipiente una barra magnética y se colocó sobre el agitador magnético el cual estuvo en constante agitación, se agregaron los componentes de cada medio basal (cuadro 33) según cantidad deseada, para el caso del medio nutritivo Linsmaier y Skoog el orden fue el siguiente.

- a) Macro nutrientes;  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ,  $\text{KNO}_3$ ,  $\text{MgSO}_4(7\text{H}_2\text{O})$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{CaCl}_2(2\text{H}_2\text{O})$
- b) Micronutrientes A;  $\text{MnO}_4(4\text{H}_2\text{O})$ ,  $\text{ZnSO}_4(7\text{H}_2\text{O})$ ,  $\text{H}_3\text{BO}_3$ ,  $\text{NaMoO}_4(2\text{H}_2\text{O})$ ,  
KI
- c) Micronutrientes B;  $\text{CoCl}_2(6\text{H}_2\text{O})$ ,  $\text{CuSO}_4(5\text{H}_2\text{O})$
- d) Hierros,  $\text{Na}_2\text{EDTA}$ ,  $\text{FeSO}_4(7\text{H}_2\text{O})$
- e) Vitaminas; tiamina
- f) Myo inositol
- g) Reguladores de crecimiento según las dosis a evaluar, para la fase de inducción de brotes; 2.0 mg/l; 4.0 mg/l; 6 mg/l; y 8.0 mg/l, de bencil amino purina (BAP). 0.01 mg/l, 0.1 mg/l y 1.5 mg/l de ácido indol butírico (IBA), a excepción de los tratamientos testigos que tuvieron cero dosis de reguladores evaluados. Todas las unidades experimentales fueron suplementados con 1 mg/l de  $\text{GA}_3$ . Para la fase de inducción de raíces en los brotes solo se utilizó el ácido indol butírico (IBA) y las concentraciones fueron 0.1 mg/l, 0.5 mg/l, 1.0 mg/l.
- h) Sucrosa.
- i) Se agregó antioxidante establecido en la fase de sobrevivencia de explantes a la oxidación por fenoles y a la contaminación por microorganismos, a todas las unidades experimentales de las fases de inducción de brotes e inducción de raíces en los brotes, incluyendo los testigos.
- j) Se aforó la solución.
- k) Se midió el pH el cual estuvo a 5.7 para ello se utilizó según fue necesario una solución de ácido clorhídrico o hidróxido de sodio 0.1 N.
- l) Se agregó agar (8.0 gr/l).
- m) Se calentó en horno microondas hasta disolver el agar.
- n) La solución se distribuyó en las unidades experimentales consistiendo en frascos de 100 ml de capacidad (25 ml de medio por frasco).
- ñ) Cada frasco se rotulo según tratamiento.
- o) Todas las unidades experimentales se esterilizaron en autoclave durante 25 minutos a una presión de 1.05 kg/cm cuadrado a una temperatura de 120 °C.
- p) Las unidades experimentales se colocaron en el cuarto de incubación hasta su utilización.

## 6.4 Fases de la investigación.

El estudio se desarrollo en las siguientes fases, la de sobrevivencia de explantes a la oxidación por fenoles y a la contaminación por microorganismos, fase de inducción de brotes en los explantes cultivados y la fase de inducción de raíces en los brotes obtenidos.

### 6.4.1 FASE DE SOBREVIVENCIA DE EXPLANTES A LA OXIDACIÓN POR FENOLES Y A LA CONTAMINACIÓN POR MICROORGANISMOS.

El aspecto principal de esta fase fue la de encontrar un antioxidante que en alguna dosis minimizara los niveles de oxidación de los explantes. Para ello se probaron tres antioxidantes para poder obtener el que mejor contrarrestara dicha oxidación. Así también se empleó una metodología para establecer el tiempo adecuado de exposición del material vegetal a soluciones desinfectantes para contrarrestar la contaminación por hongos y bacterias.

#### A. Control de la oxidación.

##### a. Descripción de los tratamientos para el control de la oxidación de los explantes.

Las unidades experimentales se distribuyeron en 10 tratamientos incluyendo un testigo absoluto al que no se le aplico ninguna dosis de antioxidante, estos tratamientos se repitieron 5 veces lo que hicieron 50 unidades experimentales por cada medio basal, en el cuadro 10 se describen las concentraciones de antioxidantes con la que se suplementaron los medios de cultivo para contrarrestar la oxidación por efectos de la liberación de fenoles de los explantes.

**Cuadro 10 Distribución de los tratamientos con antioxidantes**

MEDIOS NUTRITIVOS	ANTIOXIDANTES	DOSIS mg/l
		0.0
		5000.0
	Carbón activado	10000.0
		15000.0
		50.0
Almehdi y Parfitt	Ácido cítrico	100.0
		150.0
		100.0
	Polivinilpirrolidona	500.0
		900.0
		0.0
		5000.0
	Carbón activado	10000.0

		15000.0
Gamborg		50.0
	Ácido cítrico	100.0
		150.0
		100.0
	Polivinilpirrolidona	500.0
		900.0
		0
		5000.0
	Carbón activado	10000.0
		15000.0
Linsmaier y		50.0
Skoog	Ácido cítrico	100.0
		150.0
		100.0
	Polivinilpirrolidona	500.0
		900.0

**b. Descripción de la unidad experimental y condiciones de incubación.**

Se utilizaron como unidades experimentales frascos de 100 ml los cuales contenían 20 ml de medio de cultivo con los antioxidantes correspondientes y un explante con una yema axilar por unidad experimental. Estas fueron incubadas a una temperatura de 25 ° C +/- con una intensidad lumínica de 3000 lux proporcionada por lámparas fluorescentes de luz blanca y un fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas de oscuridad.

**c. Factores a evaluar.**

Los factores que se sometieron a evaluación fueron las dosis y diferentes antioxidantes, ver cuadro (11 ).

**Cuadro 11 Factores evaluados con los antioxidantes carbón activado ácido cítrico y polivinilpirrolidona**

ANTIOXIDANTE	DOSIS mg/l
	5000.0
Carbón activado	10000.0
	15000.0
	50.0
Ácido cítrico	100.0
	150.0
	100.0
Polivinilpirrolidona	500.0
	900.0

#### d. Variables de respuesta.

Presencia de fenoles, se obtuvo el porcentaje de explantes oxidados para ello se relacionó el número total de explantes iniciales con el número de explantes oxidados por cada tratamiento, observando para ello el cambio de coloración del explante de verde a un color que podía ser café o negro, la lectura se realizó a los 15 días después de sembrados los mismos.

#### B. Desinfección del material vegetal.

Se realizó la siguiente metodología para establecer el tiempo adecuado de exposición del material

vegetal para contrarrestar la contaminación por hongos y bacterias.

##### a. Descripción de los tratamientos.

En el cuadro 12 se describen las concentraciones de las soluciones de fungicidas - bactericidas y el tiempo de exposición a la que se sometió el material vegetal a utilizar en los medios de cultivo, estas soluciones también incluyeron antioxidantes preservantes para que dicho material no sufriera oxidación.

**Cuadro 12 Concentraciones de los desinfectantes utilizados para controlar las contaminaciones de los esplantes dentro del medio de cultivo.**

FUNGICIDAS	CONCENTRACIÓN mg/l	TIEMPO	
Benomyl	1000.0	24 hrs	12 hrs
Sulfato de cobre	1500.0	24 hrs	12 hrs
<b>BACTERICIDA</b>			
Estreptomina + Oxitetraciclina	1500.0	24 hrs	12 hrs
Cloranfenicol	500.0	24 hrs	12 hrs
Oxitetraciclina	200.0	24 hrs	12 hrs
<b>ANTIOXIDANTES</b>			
Ácido ascórbico	2000.0	24 hrs	12 hrs
Ácido cítrico	4000.0	24 hrs	12 hrs

##### b. Factores.

Entre los factores que se sometieron a evaluación para el tiempo de exposición a la preservación y desinfección del material vegetal fueron los fungicidas (benomyl a 1000.0 mg/l, sulfato de cobre pentahidratado a 1500.0 mg/l), bactericidas (estreptomina + oxitetraciclina 1500.0 mg/l, cloranfenicol 500.0 mg/l, oxitetraciclina 200.0 mg/l), antioxidantes (ácido

ascórbico 2000.0 mg/l, ácido cítrico 4000.0 mg/l) y el tiempo de exposición (24 y 12 horas) este material se conservó en refrigeradora a 2 grados centígrados.

### **c. Variables de respuesta.**

Presencia de hongos y bacterias, se determinó a los 15 días después de sembrados los Explantes obteniendo el porcentaje de unidades contaminadas, relacionando para ello las unidades experimentales contaminadas con el total de unidades experimentales iniciales por cada tratamiento observando para ello cada unidad experimental si poseía la presencia de hongos o bacterias.

### **d. Análisis de la información.**

Se utilizó un análisis descriptivo de la información, ya que no fue factible aplicar estadísticos paramétricos solo porcentajes de las variables de respuesta, para ello se detalló de forma precisa cada uno de los eventos realizados para poder cumplir con los objetivos de la investigación.

## **6.4.2 FASE DE INDUCCIÓN DE BROTES EN LOS EXPLANTES CULTIVADOS**

### **A. Material vegetal.**

Se utilizaron yemas axilares con crecimiento activo de la parte media de la copa del árbol provenientes de árboles sanos y vigorosos de un año de edad de la variedad de melocotón Salcajá, *Prunus persica* (L.) Batsch var. Salcajá injertados sobre durazno criollo. Los árboles fueron sometidos a un tratamiento contra bacterias, hongos, insectos, ácaros, programas de fertilización, y podas, estos dos últimos aspectos según el requerimiento del árbol para lo cual se siguieron las siguientes fases.

- a) A nivel de campo, se trataron los árboles a partir de la adquisición hasta el traslado al invernadero.
- b) A nivel de invernadero, los árboles se trasladaron 30 días antes de la siembra *in vitro*.

## **B. Preparación del material vegetal para cultivos.**

Las yemas axilares se obtuvieron de trozos de secciones nodales de 2.0 centímetros de longitud teniendo el cuidado de que las yemas fueran vegetativas y no de flor. Las secciones nodales provenían de la parte media de la copa del árbol los cuales tuvieron tratamiento fitosanitario según la descripción anterior. Se siguió la siguiente metodología de desinfección del material vegetal a nivel de campo y laboratorio.

## **C. Desinfección a nivel de campo y preservación del material.**

- a. Se cortaron trozos de ramas de 20 centímetros de longitud.
- b. Se lavaron con agua estéril, jabón y alcohol y se secaron con papel toalla.
- c. Estos se colocaron en una solución desinfectante de fungicidas - bactericidas para contrarrestar la contaminación del material vegetal, las cuales fueron; estreptomina + oxitetraciclina a 1500.0 mg/l, sulfato de cobre pentahidratado a 1500.0 mg/l, benomyl a 1000.0 mg/l, cloranfenicol a 500.0 mg/l, oxitetraciclina a 200.0 mg/l, ácido ascórbico a 2000.0 mg/l, ácido cítrico a 4000.0 mg/l, seguidamente se preservó en frío, en refrigeradora a 4 grados centígrados, previo a establecer el tiempo de exposición del material a la solución desinfectante. Los tiempos a evaluar fueron veinticuatro y doce horas.

## **D. Desinfección de explantes a nivel de laboratorio.**

- a. El material preservado en frío se hizo mas pequeño lo suficiente para que estos pudieran ser manipulados en una caja de petri, y se dejaron en remojo en agua esterilizada.
- b. Se trasladaron a un beacker conteniendo una solución de alcohol al 70% por dos minutos.
- c. Se trasladaron a un beacker conteniendo agua esterilizada para quitar el exceso de alcohol.
- d. Se trasladaron a un beacker conteniendo una solución de cloro al 5% v/v, por 5 minutos.
- e. El beacker conteniendo la solución de cloro con los trozos de explantes se traslado a la campana de flujo laminar debidamente esterilizada, realizando tres lavados o más con agua estéril dentro de la misma.
- f. Los explantes se colocaron en un recipiente conteniendo una solución de ácido cítrico a 150 mg/l debidamente esterilizada el recipiente conteniendo dicha solución estuvo cubierta con papel aluminio.

### **E. Inoculación de yemas axilares.**

Se procedió a la siembra de explantes de 2 centímetros de longitud con una yema axilar para cada unidad experimental. La inoculación de las yemas axilares en las unidades experimentales se realizaron en condiciones asépticas en la campana de flujo laminar la cual se encendió 30 minutos antes de empezar a trabajar en ella, utilizando los explantes preservados en la solución de ácido cítrico a 150 mg/l del paso anterior.

- a. En una caja de petri conteniendo 5 ml de una solución de ácido cítrico a 100 mg/l se colocó un trozo de tallo, el cual con la ayuda de un bisturí se procedió a cortar trozos mas pequeños los cuales tenían 2 cm de longitud procurando que la yema quedara en la parte central del mismo.
- b. Después de haber cortado el explante con una pinza debidamente esterilizada, se tomo y se inoculo dentro del medio de cultivo (frasco conteniendo 25 ml de medio) teniendo el cuidado que este quedara en la parte del centro del medio, se tapo cuidadosamente y se identifico debidamente.

### **F. Incubación de los tejidos.**

Después de haber hecho la inoculación de todos los explantes en sus respectivas unidades experimentales estas se trasladaron al cuarto de incubación las cuales estuvieron en condiciones propicias para el desarrollo de los mismos. El cuarto de incubación estuvo equipado con una fuente de luz proporcionado por lámparas fluorescentes de luz blanca de 1000 a 3000 lux de intensidad, la temperatura media del cuarto fue de 25 grados centígrados con un fotoperiodo programado de 16 horas luz.

### **G. Descripción de los tratamientos.**

A continuación se describen las concentraciones de bencil amino purina (BAP) y de ácido indolbutírico (IBA) que se evaluaron, a excepción de los testigos absolutos los cuales no se les agregó ninguna dosis de BAP ni de IBA, cuadro 13. Todas las unidades experimentales fueron suplementadas con 1 mg/l de ácido giberelico y con el mejor antioxidante que contrarrestó la oxidación en la fase de sobrevivencia de explantes a la oxidación por fenoles y a la contaminación por microorganismos.

**Cuadro 13 Descripción de los tratamientos utilizados en la inducción de brotación en cada medio de cultivo**

MEDIOS NUTRITIVOS	COMBINACIÓN HORMONAL	
	BAP mg/l	IBA mg/l
	0.0	0.0
	2.0	0.01
	2.0	0.1
	2.0	1.5
	4.0	0.01
	4.0	0.1
Almehdi y Parfitt	4.0	1.5
	6.0	0.01
	6.0	0.1
	6.0	1.5
	8.0	0.01
	8.0	0.1
	8.0	1.5
	0.0	0.0
	2.0	0.01
	2.0	0.1
	2.0	1.5
	4.0	0.01
	4.0	0.1
Gamborg	4.0	1.5
	6.0	0.01
	6.0	0.1
	6.0	1.5
	8.0	0.01
	8.0	0.1
	8.0	1.5
	0.0	0.0
	2.0	0.01
	2.0	0.1
	2.0	1.5
	4.0	0.01
	4.0	0.1
Linsmaier y Skoog	4.0	1.5
	6.0	0.01
	6.0	0.1
	6.0	1.5
	8.0	0.01
	8.0	0.1
	8.0	1.5

## H. Descripción de la unidad experimental.

Se utilizaron como unidades experimentales frascos de 100 ml de capacidad los cuales contenían 25 ml de medio de cultivo con los reguladores de crecimiento correspondientes y un explante con una yema axilar por unidad experimental.

## I. Factores a evaluar.

Los factores que se sometieron a evaluación fueron los reguladores de crecimiento BAP e IBA en 12 combinaciones, donde los testigos absolutos no tuvieron ninguna dosis de bencil amino purina ni de ácido indol butírico, cuadro 14.

**Cuadro 14 Factores y dosis que se evaluaron en el estudio de la respuesta de explantes de melocotón**

Reguladores del crecimiento	Dosis mg/l			
Bencil aminopurina	2.0	4.0	6.0	8.0
Ácido indol butírico	0.01	0.1	1.5	-----

## J. Variables de respuesta.

- a. Porcentaje de sobrevivencia de explantes a la oxidación y a los microorganismos contaminantes, se determino al inicio y al finalizar el experimento relacionando las unidades experimentales contaminadas con el total de unidades experimentales iniciales, observando para ello cada unidad experimental de igual forma se realizó para el porcentaje de explantes oxidados.
- b. Porcentaje de brotación de yemas, se tomó lectura a los 15, 30 y 60 días de sembrados los explantes observando cada unidad experimental, relacionando el número de explantes brotados con el número total por tratamiento.
- c. Número de brotes; se tomó lectura a los 30, 60 y 90 días después de realizada la siembra de las yemas axilares, realizando un conteo visual por cada unidad experimental.

## K. Análisis de la información.

Debido a las características de la investigación se realizó un análisis descriptivo ya que no fue factible aplicar estadísticos paramétricos sólo porcentajes de las variables de respuesta. Para ello se detalló en forma precisa cada evento realizado y los cambios que ocurrieron en dicho experimento, para así poder cumplir con los objetivos planteados en la investigación ya que se pretendió conocer la respuesta de la especie vegetal a diferentes medios de cultivo y a las

combinaciones de reguladores ácido indolbutírico y bencil amino purina que mejor favorezcan a la propagación *in vitro* de dicha especie.

### **6.4.3 FASE DE INDUCCIÓN DE RAÍCES EN LOS BROTES OBTENIDOS.**

#### **A. Materiales.**

Se utilizó el medio Murashige y Skoog (MS) en diferentes concentraciones 75, 50, y 25 %, los explantes a utilizar fueron los brotes obtenidos en la fase de inducción de brotes. Las unidades experimentales se suplementaron con la auxina ácido indolbutirico (IBA) en las concentraciones de 0.1, 0.5, 1.0 mg/l y con el antioxidante que mejor contraresto la oxidación en la fase de sobrevivencia de explantes a la oxidación por fenoles y a la contaminación por microorganismos.

#### **B. Inoculación.**

Con un bisturí debidamente esterilizado en autoclave se corto el brote, separándolo del explante de 2 cm, se tomó con las pinzas y se inoculó dentro del medio de cultivo (frasco de 100 ml de capacidad conteniendo 20 ml de medio de cultivo) teniendo el cuidado que este quedara en la parte del centro del medio, se tapo cuidadosamente y se identifico debidamente.

#### **C. Incubación de los tejidos.**

Después de haber realizado la inoculación de todos los brotes en sus respectivas unidades experimentales estas se trasladaron al cuarto de incubación las cuales estuvieron en condiciones propicias para el desarrollo de los mismos. El cuarto de incubación estuvo equipado con una fuente de luz proporcionado por lámparas fluorescentes de luz blanca de 1000 a 3000 lux de intensidad. La temperatura media del cuarto fue de 25 grados centígrados con un fotoperiodo programado de 16 horas de luz.

#### **D. Descripción de los tratamientos.**

A continuación se describen las concentraciones de ácido indol butírico y las concentraciones del medio basal Murashige y Skoog (MS) que se evaluaron en las unidades experimentales, a excepción del testigo absoluto que contenía cero auxinas y 100 % de concentración del medio basal Murashige y Skoog. Todas las unidades experimentales fueron suplementadas con el

mejor antioxidante que controló la oxidación, en la fase de sobrevivencia de explantes a la oxidación por fenoles y a la contaminación por microorganismos.

**Cuadro 15 Descripción de los tratamientos utilizados en la inducción de raíces en los brotes de melocotón *Prunus persica* (L.) Batsch var. Salcajá**

TRATAMIENTO	ACIDO INDOL BUTIRICO mg/l	CONCENTRACIÓN DEL MEDIO MURASHIGE Y SKOOG
T1	0.0	100 %
T2	0.1	75 %
T3	0.1	50 %
T4	0.1	25 %
T5	0.5	75 %
T6	0.5	50 %
T7	0.5	25 %
T8	1.0	75 %
T9	1.0	50 %
T10	1.0	25 %

#### E. Descripción de la unidad experimental.

Las unidades experimentales la constituyeron frascos de 100 ml de capacidad con un brote cada uno, a cada frasco se le agregó 25 ml de medio de cultivo.

#### F. Factores a evaluar.

Los factores que se sometieron a evaluación fueron las concentraciones del medio basal Murashige y Skoog ( 75 %, 50%, 25%) y concentraciones de ácido indol butírico 0.1 mg/l, 0.5 mg/l, 1.0 mg/l, cuadro 16.

**Cuadro 16. Concentraciones del medio basal Murashige & Skoog y del ácido indol butírico utilizados en la fase de enraizamiento de brotes.**

FACTORES	CONCENTRACION		
	%		
Murashige y Skoog	75	50	25
	mg/l		
Ácido indolbutírico	0.1	0.5	1.0

#### G. Variables de respuesta.

La toma de datos se realizó a los 30 días de haber inoculado los brotes para inducir raíz, las variables de respuesta que se tomaron en consideración para medir el efecto de los tratamientos fueron las siguientes.

- a. Porcentaje de brotes enraizados, se relacionó el número de brotes que emitieron raíz con el número de brotes totales.
- b. Número de raíces por brotes, se realizó el conteo de raíces por cada uno de los brotes que logró enraizar.
- c. Longitud de la raíz más larga, con la ayuda de regla graduada se midió la raíz más larga y la longitud se expresó en mm.

#### **H. Análisis de los resultados.**

Debido a las características de la investigación se realizó un análisis descriptivo ya que no fue factible aplicar estadísticos paramétricos, sólo porcentajes de las variables de respuesta. Para ello se detalló en forma precisa cada evento realizado y los cambios que ocurrieron en dicho experimento para así poder cumplir con los objetivos planteados en la investigación ya que únicamente se pretendió establecer la respuesta de la especie vegetal al enraizamiento, empleando dosis del regulador ácido indol butírico que mejor favoreciera al enraizamiento *in vitro* de dicha especie.

## 7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 7.1 FASE DE SOBREVIVENCIA DE EXPLANTES A LA OXIDACIÓN Y A LA CONTAMINACIÓN POR MICROORGANISMOS.

#### 7.1.1 Efecto de los antioxidantes en la fenolización de tejidos y su sobrevivencia.

Monsella mencionado por Altamirano Zapata (2) dice que, el durazno se considera una especie difícil de propagar por cultivo de tejidos debido a diversos factores que afectan la adaptación del explante en las condiciones *in vitro*, tales como las frecuentes dificultades de oxidación, presencia de inhibidores de crecimiento y sobre todo a la dificultad del enraizamiento. Mosella mencionado por Roca (27) menciona que entre las especies rebeldes recientemente llamadas recalcitrantes se encuentra el duraznero *Prunus persica* (L.) Batsch.

En lo que se refiere a la oxidación la variedad de melocotón Salcajá *Prunus persica* (L.) Batsch var. Salcajá no es la excepción ya que en las pruebas realizadas se observó la oxidación de los explantes en los cuales se manifestó el cambio de coloración en el tejido de verde a un color café oscuro, que inicio primeramente de las partes donde se les realizó los cortes para obtener el explante hasta terminar con una necrosis que se extendió a todo el explante.

Con lo cual fue necesario probar en la fase 1 antioxidantes para contrarrestar dicha reacción, ácido cítrico en las dosis de 50.0, 100.0, y 150.0 mg/l, carbón activado a 5000.0, 10000.0, y 15000.0 mg/l, polivinylpyrrolidona (PVP) a 100.0, 500.0 y 900.0 mg/l, de estos tres antioxidantes el ácido cítrico fue el que menos contrarresto la oxidación en los explantes (ver cuadro 17) ya que las dosis probadas en los medios revelan que los porcentajes no fueron superiores a las dosis de los otros antioxidantes probados, existiendo reacciones distintas en cada medio así por ejemplo se tiene que en el medio Almehdi y Parfitt el porcentaje de sobrevivencia a la oxidación fue del 20 % contra el 80 % de mortandad, en el medio Gamborg (B5) el porcentaje de oxidación fue de 33.33 % contra un 66.67 % de sobrevivencia, teniendo los mismos porcentajes en el medio Linsmaier y Skoog, siendo la dosis de 150 mg/l la que mejor controló la oxidación en los explantes.

Para el carbón activado los resultados reflejan que para el medio Almehdi y Parfitt se obtuvo un 33.34% de sobrevivencia y un 66.66% de oxidación, para el medio Gamborg un 66.67% de sobrevivencia contra un 33.33 de mortandad, y en el medio Linsmaier y Skoog un 80 % de sobrevivencia contra un 20 % de mortandad, lo cual refleja una gran diferencia en cada medio y la mejor dosis de carbón activado que controló la oxidación fue la de 5000.0 mg/l. El polivinylpyrrolidona (PVP) en el medio Almehdi y Parfitt presentó un 66.67% de sobrevivencia contra un 33.33% de mortandad por oxidación, en el medio de Gamborg un

73.33% de sobrevivencia y un 26.67% de muerte de explantes y en el medio Linsmaier y Skoog un 86.67% de sobrevivencia contra un 13.33% de mortandad, como los resultados lo demuestran existe gran diferencia de efectividad de las dosis de antioxidantes en los medios, por lo que las concentraciones basales combinadas con algunos antioxidantes en algunas dosis podrían afectar la sobrevivencia de dichos explantes. De acuerdo con lo anterior el antioxidante que más se ajusto a la necesidad de contrarrestar la oxidación de los explantes inoculados en los medios de cultivo fue el polivinylpyrrolidona, de las tres dosis probadas la que mayor porcentaje de explantes sobrevivientes presento en los tres medios basales utilizados correspondió a la dosis de 900.0 mg/l, la efectividad del polivinylpyrrolidona en esta especie se debe a que es una poliamida usada comúnmente en cultivo de tejidos como un absorbente de fenoles, estos son absorbidos directamente enlazando con el hidrógeno, previniendo por lo tanto la oxidación y polimerización del tejido (35). Por lo tanto el polivinylpyrrolidona es adicionado al medio para contrarrestar el ennegrecimiento de los explantes y/o la exudación de sustancias fenólicas dentro del medio (5).

Al analizar la efectividad del ácido cítrico esta fue mas limitada esto probablemente a que este es un antioxidante y actúa compitiendo por el oxígeno como proteína o lípidos evitando así la oxidación de estas sustancias complejas. Así mismo el carbón activado es un absorbente que inhibe la oxidación de los explantes absorbiendo el sustrato fenólico del medio, por lo cual actúa a manera de esponja (5).

Es importante señalar que la edad del explante a utilizar influyó grandemente en la liberación de fenoles es decir que tallos con menos edad en formación son menos propensos a la oxidación, Muhitch y Fletcher mencionados por Bolaños (5) dicen que tejidos jóvenes son con frecuencia menos propensos al encafecimiento sobre la excisión que otros más viejos esto lo demostraron en *Rosa pauls*. Duhem *et al* 1988 dice que explantes muy jóvenes de café son mas propensos a mostrar oxidación fenolica que aquellos tomadas de tejidos mas viejos, para el caso del melocotón Salcajá las pruebas demostraron que explantes provenientes de material joven son menos susceptibles a oxidarse en comparación con los de mayor tiempo de formación, los cuales se ven altamente afectados por las heridas ocasionadas al tejido con lo cual se favorece a la oxidación esto debido que al herir o romper los tejidos se estimula mucho la respiración (32) y además el material de más edad a la mencionada se encuentra altamente lignificado y al momento de realizar los cortes estos se vuelven un tanto difíciles debido a la dureza y al grosor que estos presentan, ocasionando heridas innecesarias como rasgaduras del tejido en el explante, además al utilizar material de mayor edad se corre el riesgo de que las yemas ya no se encuentren viables o que estas sean de flor y no vegetativas, por lo que se tuvo el cuidado de que el material seleccionado tuviera el mismo tiempo en haberse formado. En el siguiente cuadro se

muestra en porcentajes la sobrevivencia a la oxidación en los tres medios con lo cual se visualiza de una mejor manera el comportamiento de este factor.

**Cuadro 17 Resultados obtenidos en el control de la oxidación en explantes de melocotón *Prunus persica* (L.) Batsch var. Salcajá a los 15 días de inoculados los tejidos, utilizando diferentes antioxidantes y dosis de los mismos.**

MEDIOS NUTRITIVOS	ANTIOXIDANTE	DOSIS mg/l	% EXPLANTES OXIDADOS		% EXPLANTES VERDES	
			Explantes	%	Explantes	%
		50.0	4	80.0	1	20.0
	Ácido cítrico	100.0	4	80.0	1	20.0
		150.0	4	80.0	1	20.0
	<b>Total</b>		12	80.0	3	20.0
		5000.0	4	80.0	1	20.0
	Carbón activado	10000	3	60.0	2	40.0
Almehdi y Parfitt		15000.0	3	60.0	2	40.0
	<b>Total</b>		<b>10.0</b>	<b>66.66</b>		<b>33.34</b>
		100.0	2	40.0	3	60.0
	Polivinylpyrrolidone	500.0	2	40.0	3	60.0
		900.0	1	20.0	4	80.0
	<b>Total</b>		<b>5</b>	<b>33.33</b>	<b>10</b>	<b>66.67</b>
	TESTIGO	ninguna	5	100	0	0
		5000.0	0	0	5	100.0
	Carbón activado	10000.0	3	60.0	2	40.0
		15000.0	2	40.0	3	60.0
	<b>Total</b>		<b>5</b>	<b>33.33</b>	<b>10</b>	<b>66.67</b>
		50.0	0	0	5	33.33
	Ácido cítrico	100.0	3	60.0	2	40.0
Gamborg		150.0	2	40.0	3	60.0
	<b>Total</b>		<b>5</b>	<b>33.33</b>	<b>10</b>	<b>66.67</b>
		100.0	2	40.0	3	60.0
	Polivinylpyrrolidone	500.0	0	0	5	33.33
		900.0	2	40.0	3	60.0
	<b>Total</b>		<b>4</b>	<b>26.67</b>	<b>11</b>	<b>73.33</b>
	TESTIGO	ninguna	5	100	0	0
		5000.0	1	20.0	4	80.0

	Carbón activado	10000.0	1	20.0	4	80.0
		15000.0	1	20.0	4	80.0
	<b>Total</b>		<b>3</b>	<b>20.00</b>	<b>12</b>	<b>80.00</b>
		50.0	2	40.0	3	60.0
	Ácido cítrico	100.0	2	40.0	3	60.0
Linsmaier y Skoog		150.0l	1	20.0	4	80.0
	<b>Total</b>			<b>33.33</b>		<b>66.67</b>
		100.0	1	20.0	4	80.0
	Polivinylpyrrolidone	500.0	1	20.0	4	80.0
		900.0	0	0	5	100.0
	<b>Total</b>		<b>2</b>	<b>13.33</b>	<b>13</b>	<b>86.67</b>
	TESTIGO	ninguna	5	100	0	0

### 7.1.2 Efecto de los fungicidas y bactericidas en la desinfección del material vegetal en la presencia de microorganismos en los tejidos y su sobrevivencia.

La información que requerimos de los plaguicidas por lo regular suele ser incompleta y por lo tanto existe un cierto número de productos que se degradan en cuestión de horas si se mezclan con agua que contengan mucho calcio o un pH alcalino. Es por ello de la necesidad de realizar pruebas preliminares de desinfección que nos garanticen un éxito aceptable posterior para tener cultivos asépticos *in vitro*. Ramírez (26) no tuvo éxito en la regeneración de plantas ya que en el caso de Salcajá se tuvo un 100% de contaminación de los explantes con lo cual no hubo sobrevivencia.

De acuerdo a esto fue necesario realizar pruebas para establecer una metodología que brindara yemas axilares de melocotón libres de contaminantes, después de estas pruebas se logró obtener más de un 75% de material libre de contaminantes y un alto porcentaje de sobrevivencia de entre 75 y 85 % en los tiempos analizados. La sobrevivencia del material vegetativo expuesto a diferentes tiempos en la solución para la desinfección dependió del tipo, tamaño del explante y el tiempo de formación de las yemas por el árbol, tal como lo menciona Orozco (20), el uso de explantes más largos es deseable ya que son mas fáciles de disectar y tienen una mayor posibilidad de sobrevivir y crecer que explantes pequeños pero por otro lado a mayor largo del explante es mas difícil la descontaminación en algunas especies de plantas.

Se evidencio que las soluciones de fungicidas-bactericidas con la dosis y los tiempos de exposición respectivos permitieron contrarrestar los organismos contaminantes de los explantes como son las bacterias y hongos, Bolaños (5) a este respecto dice, los explantes pueden llevar contaminadores en su superficie (microorganismos exógenos) o en su interior (microorganismos

endógenos) o en ambas partes. Los mas difíciles de erradicar de un explante para cultivo de tejidos *in vitro* son las bacterias y hongos endógenos.

Los tratamientos de la fase 1 evidenciaron que de los dos tiempos utilizados para la exposición a la desinfección del material vegetal el que mejor contrarresto sin dañar los explantes fue el de 24 horas ya que de las 50 unidades experimentales para el medio Almehdi y Parfitt solamente en el tratamiento testigo y en los tratamientos con las dosis de 5000.0 mg/l de carbón activado y 500.0 mg/l de polivinylpyrrolidona resultaron contaminados, de estos 2 tratamientos fueron contaminados por bacterias y 2 por hongos lo cual representa un 8 % de contaminación contra un 92% de explantes que no presentaron microorganismos contaminantes, mientras que para el tiempo de 12 horas se obtuvo un 28% de contaminación y de estas un 16% correspondió a contaminación por bacterias por lo que el porcentaje de sobrevivencia correspondió a un 72%.

La contaminación en el medio Gamborg (B5) fue de un 12% para el tiempo de 24 horas, observándose en algunas repeticiones de los siguientes tratamientos, testigo, 5000.0 y 10000.0 mg/l de carbón activado, 50 mg/l de ácido cítrico y 900.0 mg/l de polivinylpyrrolidona, de estas 4 unidades experimentales fueron contaminadas por bacterias y el resto por hongos por lo que representa un 88 % de sobrevivencia a la contaminación. Para el tiempo de 12 horas se obtuvo un 26% de contaminación lo que nos hacen 13 unidades experimentales contaminadas, de las cuales un 14% (7 unidades experimentales) fueron contaminadas por bacterias y el resto por hongos.

Para el medio Linsmaier y Skoog (LS) en el tiempo de 24 horas se obtuvo un 10 % de contaminación del total de unidades experimentales, de las cuales un 6 % correspondió a bacterias y el resto a hongos mientras que para el tiempo de 12 horas se obtuvo un 22 % de contaminación (11 unidades experimentales) de estas el 12% corresponde por bacterias, por lo que se obtuvo un 78% de sobrevivencia de explantes sin microorganismos contaminantes.

La contaminación se observó en el lapso de los primeros 15 días después de sembrados los explantes, detectándose en algunas repeticiones a los 2 días debido a que la contaminación de los explantes se encontraba en gran cantidad, esto se observó principalmente en el tiempo de 12 horas. Es también relevante el hecho de que las bacterias fueron más difíciles de erradicar de los explantes en comparación con los hongos. Esto probablemente a la acción efectiva que poseen los funguicidas como es el caso del Benomyl el cual es un curativo erradicante sistémico, no así para los bactericidas los cuales se ven limitados en su acción y no existen una gran gama de productos erradicantes que favorezcan con dicho objetivo.

En el cuadro 8 se puede observar que en el tiempo en donde más contaminación de explantes se presentó fue el de 12 horas, esto probablemente se debió a la severidad en que las

bacterias se encontraban presentes en el material madre, también se debe tomar en cuenta que al momento de la manipulación del material existe un grado de contaminación debido a que este se encuentra al aire libre y como es sabido en el ambiente existe una gran diversidad de esporas tanto de hongos como de bacterias. También es importante mencionar que el tiempo en que los explantes se toman influye en la cantidad de microorganismos presentes en los órganos de una planta, así tenemos que en tiempo de invierno existirán más en comparación con el verano. En contraparte el tiempo de 24 horas fue el que menos contaminación presento en los tres medios el cual presento una superioridad evidente de sobrevivencia por parte de los explantes a la contaminación.

Es importante tomar en cuenta que la contaminación se presenta más en plantas con crecimiento leñosos y principalmente las que presentan vello y pubescencia en las puntas meristematicas y hojas así mismo el tamaño del explante influye grandemente en la desinfección del material a explantes pequeños serán más fáciles de descontaminar en relación a explantes grandes (27)

**Cuadro 18 Resultados de la sobrevivencia de explantes de melocotón *Prunus persica* (L.) Batsch var. Salcajá a la contaminación por microorganismos en tiempos de 12 y 24 horas de exposición a soluciones desinfectantes y preservantes, benomyl, sulfato de cobre, estreptomycin, cloranfenicol, oxitetraciclina, ácido ascórbico y cítrico, a los 15 días de inoculados los explantes.**

Medios nutritivos	Tiempo en horas		explantes contaminados	% bacterias	% hongos	% contaminación	Explantes no contaminados	% sobrevivencia
Almehdi y Parfitt	24		4	2	2	8	46	92
		12	14	16	12	28	36	72
Gamborg	24		6	8	4	12	44	88
		12	13	14	12	26	37	74
Linsmaier y Skoog	24		5	6	4	10	45	90
		12	11	12	10	22	39	78

## 7.2 FASE DE INDUCCIÓN DE BROTES EN LOS EXPLANTES CULTIVADOS.

### 7.2.1 Comportamiento de los explantes en el medio nutritivo de Almehdi y Parfitt (18).

#### A. Porcentaje de sobrevivencia de explantes a la oxidación y contaminación.

De acuerdo a los resultados obtenidos en la fase de sobrevivencia de explantes a la oxidación y a la contaminación por microorganismos, se logró determinar que la adición del antioxidante polivinylpyrrolidona en la dosis de 900.0 mg/l al medio de cultivo contrarresta la oxidación de los explantes.

De acuerdo con esto se empleó para todas las unidades experimentales en los tres medios probados y como fue establecido anteriormente las lecturas se tomaron al inicio y al finalizar el experimento, tomando en cuenta que la oxidación del tejido en los explantes se manifestó en forma progresiva, el cual inicio donde se había producido heridas en el material hasta abarcar todo el explante manifestándose con un cambio de coloración del tejido, de verde se torno a café oscuro, sin embargo la cantidad de fenoles liberados por el explante no logro teñir el medio de cultivo con lo cual fue mas fácil de controlar dicha exudación. Esto en comparación con especies altamente susceptibles a la oxidación, Meira y Halevy mencionado por Calderón (6) estudiaron la respuesta de *Strelitzia reginae* a la micropropagacion *in vitro* y observaron que la capacidad de esta especie presenta una respuesta baja a la propagación debido al proceso oxidativo catalogado como el factor limitante. Calderón (6) concluye que los explantes de especies leñosas como el aguacate son muy susceptibles a la oxidación fenolica lo que incide en forma negativa en el desarrollo y crecimiento de los brotes.

#### **a. Oxidación de explantes en el medio nutritivo de Almehdi y Parfitt.**

Los porcentajes más altos de oxidación se presentaron en los tratamientos que presentaron 2.0 mg/l de BAP + 0.01 mg/l de IBA y 6.0 mg/l de BAP + 1.5 mg/l de IBA ambos con un 20%, en contraparte los tratamientos que no presentaron ningún explante oxidado correspondió a los tratamientos con 4.0 mg/l de BAP + 0.1 mg/l de IBA, 4.0 mg/l de BAP + 1.5 mg/l de IBA, 6.0 mg/l de BAP + 0.01 mg/l de IBA, 6.0 mg/l de BAP + 0.1 mg/l de IBA, 8.0 mg/l de BAP + 0.01 mg/l de IBA y 8.0 mg/l de BAP + 0.1 mg/l de IBA. El resto de tratamientos se caracterizó por presentar solo un 10 % de oxidación.

La oxidación se aprecio a las 24 horas de haber sembrado el material vegetal y a los 15 días se observó a plenitud en todos los tratamientos que presentaron explantes oxidados presentándose únicamente en este lapso de tiempo y esto pudo deberse a la calidad del material vegetal utilizado. Como pudo observarse en los resultados obtenidos en la fase de sobrevivencia de explantes a la oxidación y a la contaminación por microorganismos que el material joven es menos susceptible a la oxidación no así el material recién formado que es altamente susceptible a la oxidación, así mismo la concentración de los componentes del medio de cultivo pudieron haber influido en la oxidación de los mismos. En el siguiente cuadro se muestra de forma detallada los porcentajes por tratamiento que sufrieron oxidación.

**Cuadro 19 Resultados de porcentajes de sobrevivencia a la oxidación de explantes de melocotón *Prunus persica* (L.) Batsch var. Salcajá utilizando 900.0 mg/l de polivinylpyrrolidone a los 15 días de inoculados los explantes en el medio nutritivo de Almehdi y Parfitt**

Tratamientos	Combinación de reguladores mg/lt	explantes oxidados	Porcentaje de oxidación	explantes verdes	Porcentaje de sobrevivencia
1	0.0 BAP + 0 IBA	1	10	9	90
2	2.0 BAP + 0.01IBA	2	<b>20</b>	8	<b>80</b>
3	2.0 BAP + 0.1 IBA	1	10	9	90
4	2.0 BAP + 1.5 IBA	1	10	9	90
5	4.0 BAP + 0.01IBA	1	10	9	90
6	4.0 BAP + 0.1 IBA	0	0	10	100
7	4.0 BAP + 1.5 IBA	0	0	10	100
8	6.0 BAP + 0.01IBA	0	0	10	100
9	6.0 BAP + 0.1 IBA	0	0	10	100
10	6.0 BAP + 1.5 IBA	2	<b>20</b>	8	<b>80</b>
11	8.0 BAP + 0.01IBA	0	0	10	100
12	8.0 BAP + 0.1 IBA	0	0	10	100
13	8.0 BAP + 1.5 IBA	1	10	9	90
<b>TOTAL</b>		<b>9</b>	<b>7%</b>	<b>121</b>	<b>93%</b>

BAP = Bencil amino purina

IBA = Ácido indol buritirico

#### **b. Contaminación por microorganismos en el medio nutritivo de Almehdi y Parfitt.**

De acuerdo a los resultados obtenidos en la fase de sobrevivencia de explantes a la oxidación y a la contaminación por microorganismos se siguió la metodología más adecuada que contrarrestará la contaminación y esta correspondió para el tiempo de 24 horas a la exposición de los explantes de melocotón a la solución desinfectante preservante la cual incluyo benomyl, sulfato de cobre pentahidratado, estreptomycin, cloranfenicol, oxitetraciclina, ácido ascórbico y cítrico .

Sin embargo los resultados reflejan que las bacterias endógenas fueron las mas difíciles de erradicar en comparación con los hongos, esto probablemente se debió a que existe una gran gama de fungicidas de acción sistémica y de contacto por lo que puede existir una rotación de materias activas al momento de la aplicación en los cultivos, no así para el control de las bacterias ya que la existencia de materias activas sistémicas para el control de las mismas es muy limitado por lo que el control de las mismas se ve muy limitado y al momento de inocular los explantes en los medios de cultivo estos organismos se desarrollan a plenitud debido a las condiciones favorables para su desarrollo. El porcentaje de sobrevivencia de los explantes a microorganismos contaminantes correspondió al 79 % contra el 21 % de contaminación, esta contaminación se presentó de forma gradual en los primeros 15 días después de haber inoculado los explantes, después de este lapso de tiempo no se observó ninguna otra unidad experimental afectada por dicho factor. En el siguiente cuadro se muestra los porcentajes de contaminación

por tratamiento en el cual los tratamientos 5 (4.0 mg/l de BAP + 0.01 mg/l de IBA) y 8 (6.0 mg/l de BAP + 0.01 mg/l de IBA) presentaron la mayor contaminación cada una con cuatro repeticiones, y donde no existió contaminación fue en los tratamientos 2 (2.0 mg/l de BAP + 0.01 mg/l de IBA) y 12 (8.0 mg/l de BAP + 0.1 mg/l de IBA). Estas diferencias en cuanto a la contaminación de explantes en los tratamientos se debió probablemente a la efectividad de contacto de las soluciones con las superficies y partes internas del tejido ya que los microorganismos endógenos son los más difíciles de controlar. Hammerschlag (14) controló la contaminación en yemas dormantes de las variedades Sunhigh y Compact Redhaven de un 100% de contaminación la redujo a un 3% usando como tratamiento de desinfección las siguientes soluciones; 70% de etahnol por 5 minutos, cloro al 10% (0.5% de hipoclorito de sodio) por 15 minutos, 100 mg/l de amphotericina B por 15 minutos, y un tratamiento con penicilina estreptomicina.

**Cuadro 20 Comportamiento de la sobrevivencia de explantes de melocotón *Prunus Persica* (L.) Batsch var. Salcajá a la contaminación, a los 15 días de inoculados los explantes utilizando como desinfectantes y preservantes, benomyl, sulfato de cobre pentahidratado, estreptomicina, cloranfenicol, oxitetraciclina, ácido ascórbico y cítrico .**

Tratamiento	Combinación de reguladores mg/l	Contaminación	Porcentaje de contaminación	No contaminados	Porcentaje sin contaminación
1	0.0 BAP + 0 IBA	3	30	7	70
2	2.0 BAP + 0.01 IBA	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>10</b>	<b>100</b>
3	2.0 BAP + 0.1 IBA	2	20	8	80
4	2.0 BAP + 1.5 IBA	1	10	9	90
5	4.0 BAP + 0.01 IBA	<b>4</b>	<b>40</b>	<b>6</b>	<b>60</b>
6	4.0 BAP + 0.1 IBA	2	20	8	80
7	4.0 BAP + 1.5 IBA	3	30	7	70
8	6.0 BAP + 0.01 IBA	<b>4</b>	<b>40</b>	<b>6</b>	<b>60</b>
9	6.0 BAP + 0.1 IBA	2	20	8	80
10	6.0 BAP + 1.5 IBA	2	20	8	80
11	8.0 BAP + 0.01 IBA	2	20	8	80
12	8.0 BAP + 0.1 IBA	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>10</b>	<b>100</b>
13	8.0 BAP + 1.5 IBA	2	20	8	80
<b>TOTAL</b>		<b>27</b>	<b>21%</b>	<b>103</b>	<b>79%</b>

BAP = Bencil amino purina

IBA = Ácido indol bunitirico

## **B. Porcentajes de brotación de yemas en el medio nutritivo de Almehdi y Parfitt.**

### **B.1 Brotación de yemas a los 15 días.**

En lo que respecta al porcentaje de brotación se obtuvo un 22 % y esto se observó conforme el tiempo transcurrió. A los 15 días se pudo observar en el tratamiento 5 (4 BAP + 0.01 IBA) con un 10%.

## B.2 Brotación de yemas a los 30 días.

A los 30 días se observó que los tratamientos 7 (4.0 mg/l BAP + 1.5 mg/l IBA), 8 (6.0 mg/l BAP + 0.01 mg/l IBA), 9 (6.0 BAP + 0.1 IBA) sobresalieron porque presentaron más de una unidad experimental, todas con un 20% de brotación aunque estas repeticiones presentaron un único brote.

**Cuadro 21 Porcentaje de brotación en explantes de melocotón *Prunus persica* (L.) Batsch var. Salcajá a los 30 días de sembrados los explantes.**

Tratamiento	Combinación de reguladores mg/l	Explantes con brotación	Porcentajes de explantes con brotación	Explantes sin brotación	Porcentaje explantes sin brotación
1	0 BAP + 0 IBA	0	0	10	100
2	2.0 BAP + 0.01 IBA	1	10	9	90
3	2.0 BAP + 0.1 IBA	1	10	9	90
4	2.0 BAP + 1.5 IBA	1	10	9	90
5	4.0 BAP + 0.01 IBA	1	10	9	90
6	4.0 BAP + 0.1 IBA	0	0	10	100
7	4.0 BAP + 1.5 IBA	2	20	8	80
8	6.0 BAP + 0.01 IBA	2	20	8	80
9	6.0 BAP + 0.1 IBA	2	20	8	80
10	8.0 BAP + 0.01 IBA	0	0	10	100
11	8.0 BAP + 0.1 IBA	0	0	10	100
12	8.0 BAP + 0.1 IBA	1	10	9	90
13	8.0 BAP + 1.5 IBA	0	0	10	100
TOTAL		11	8 %	119	92 %

BAP = Bencil amino purina

IBA = Ácido indol bunitirico

## B.3 Brotación de yemas a los 60 días.

A los 60 días de sembrados los explantes el tratamiento que más sobresalió en porcentaje de brotación fue el tratamiento 5 con un 50% de brotación, al cual le siguió los tratamientos 4 (2.0 mg/l BAP + 1.5 mg/l IBA) y 9 (6 mg/l BAP + 0.1 mg/l IBA) ambos con un 30 %. De acuerdo a los resultados obtenidos existió una brotación muy limitada e irregular de las yemas axilares. Altamirano (2) al respecto de la irregularidad en cuanto a la brotación dice, la mayoría de las huertas se caracterizan por tener una amplia variabilidad genética, con brotación y floración irregular y esto se debe a que la temperatura a nivel del campo no se puede controlar por lo que este es un factor que incide directamente en la brotación de las yemas a nivel del campo y laboratorio. En el cuadro 22 se presenta el porcentaje de la brotación de dichas yemas, además los resultados reflejan que en cuanto a la combinación de los reguladores para el medio Almehdi y Parfitt la que más porcentaje de brotación presento fue la combinación de 4 mg/l de BAP + 0.01 mg/l de ácido indol acético lo que sugiere que bajas concentraciones de auxinas y

citocininas promueven la brotación de las yemas de melocotón. No así en los tratamientos donde la citocinina se adicionó en una gran cantidad, donde la brotación fue escasa o no se presentó como en el tratamiento 13 (8.0 mg/l BAP + 1.5 mg/l IBA) el cual presentó 0 % de brotación. Hammershlag mencionado por Altamirano (2) dice que los niveles altos de BAP inducen necrosis del tallo en yemas de durazno.

**Cuadro 22 Comportamiento de la brotación a los 60 días de sembrados los explantes de melocotón *Prunus persica* (L.) Batsch var. Salcajá**

Tratamiento	Combinación de reguladores mg/l	Explantes con brotación	Porcentajes de explantes con brotación	Explantes sin respuesta	Porcentaje explantes sin respuesta
1	0.0 BAP + 0 IBA	0	0	10	100
2	2.0 BAP + 0.01 IBA	2	20	8	80
3	2.0 BAP + 0.1 IBA	1	10	9	90
4	2.0 BAP + 1.5 IBA	3	30	7	70
5	4.0 BAP + 0.01 IBA	5	50	5	50
6	4.0 BAP + 0.1 IBA	2	20	8	80
7	4.0 BAP + 1.5 IBA	2	20	8	80
8	6.0 BAP + 0.01 IBA	2	20	8	80
9	6.0 BAP + 0.1 IBA	3	30	7	70
10	6.0 BAP + 1.5 IBA	0	0	10	100
11	8.0 BAP + 0.01 IBA	1	10	9	90
12	8.0 BAP + 0.1 IBA	1	10	9	90
13	8.0 BAP + 1.5 IBA	0	0	10	100
TOTAL		22	17	108	83%

BAP = Bencil amino purina

IBA = Ácido indol butírico

### C. Número de brotes.

#### C.1 Número de brotes a los 30 días.

Para la variable número de brotes la lectura realizada a los 30 días después de haber inoculado las unidades experimentales mostró un brote para las siguientes unidades experimentales de los tratamientos 2 (2.0 mg/l BAP + 0.01 mg/l IBA), 3 (2.0 mg/l BAP + 0.1 mg/l IBA), 4 (2.0 mg/l BAP + 1.5 mg/l IBA), 5 (4.0 mg/l BAP + 0.01 mg/l IBA), 7 (4.0 mg/l BAP + 1.5 mg/l IBA), 8 (6.0 mg/l BAP + 0.01 mg/l IBA) y 9 (6.0 mg/l BAP + 0.1 mg/l IBA) en el cual se observó únicamente la yema original brotada sobresaliendo los brotes de los tratamientos 4 y 5 por su vigorosidad y desarrollo, alcanzando 2 centímetros de longitud en relación a los otros brotes los cuales el desarrollo fue escaso y su longitud no sobrepasó el centímetro de longitud.

## **C.2 Número de brotes a los 60 días.**

La lectura efectuada a los 60 días de sembrados los explantes nos mostró los mismos brotes de la lectura realizada a los 30 días en los siguientes tratamientos 2, 3, 4, 7, 8 y 9, de estos tratamientos el que más sobresalió fue el tratamiento 5 ya que fue el que mas unidades experimentales presentó y a la vez los que más brotes formaron.

## **C.3 Número de brotes a los 90 días.**

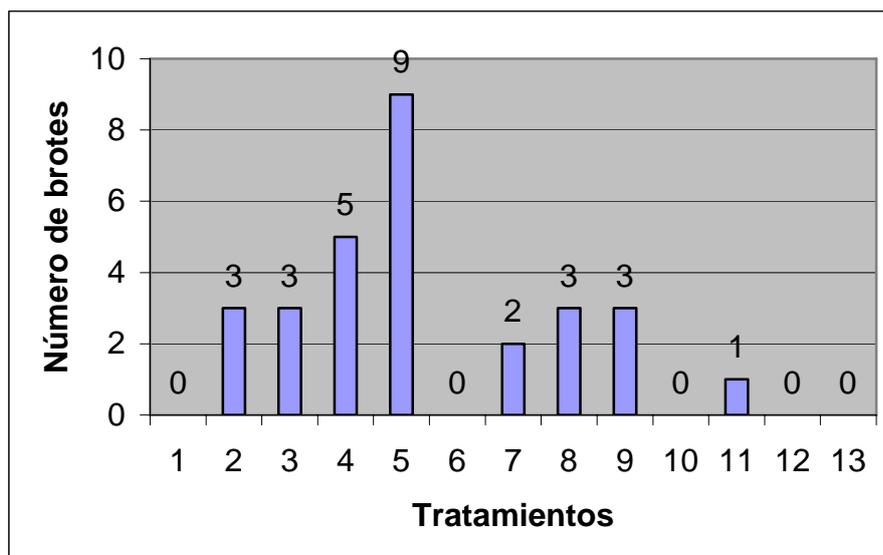
Observando el cuadro 23 se nota que el mayor número de brotes se alcanzó a los 90 días después de haber inoculado los explantes, las repeticiones que no mostraron más de un brote correspondió a los tratamiento 9 y 11 y el tratamiento que más brotes formados en mas repeticiones correspondió al tratamiento 5 (4.0 mg/l BAP mg/l + 0.01 mg/l IBA) además los brotes de este tratamientos fueron los que más vigorosidad y longitud presentaron con brotes de 1.5 a 2 cm de longitud, a este tratamiento le siguió el 4 (2.0 mg/l BAP + 1.5 mg/l IBA), ya que fue el segundo que mas brotes presento. Con lo cual se evidencia que el mayor grado de multiplicación de brotes se alcanzó con la combinación 4 mg/l de BAP + 0.01 mg/l de IBA, resultados que coinciden con trabajos efectuados por Altamirano (2) en dos selecciones de *Prunus* S-66 y la S-50, además Hurtado mencionado por Ortega (21) dice, las citocininas en concentraciones de 1 a 5 mg/l inducen brotes, pero si se agrega ácido giberelico en concentraciones de 0.3 a 1 mg/l se puede incrementar considerablemente el número de brotes formados esto debido a que las citocininas promueven la expansión de las células y el ácido giberelico estimula la división celular. Con esto se puede dar validez a los datos que se muestran en el siguiente cuadro ya que a partir de la combinación 6 mg/l de BAP + 0.01 mg/l de IBA el número de brotes declino presentando en algunos casos únicamente el brote de la yema original. Norton y Boe mencionados por Altamirano (2) dicen que la multiplicación depende de la especie y cultivar con que se trabaje y su requerimiento de BAP va a estar en función de estas. Así mismo se han observado diferencias de requerimientos de BAP exógeno en otros cultivares, tal como lo informo Scorza (29).

**Cuadro 23 Número de brotes a los 90 días de inoculados los explantes de melocotón  
*Prunus persica* (L.) Batsch var. Salcajá en el medio nutritivo de  
 Almehdi y Parfitt.**

Tratamiento	Combinación Hormonal mg/l	Número de brotes a 60 días		Número de brotes a 90 días	
		Repeticiones Con respuesta	Número de brotes	Repeticiones Con respuesta	Número de brotes
1	0.0 BAP + 0 IBA	No formó brotes		No formó brotes	
2	2.0 BAP + 0.01 IBA	1	1	1	1
		2	1	2	2
3	2.0 BAP + 0.1 IBA	1	1	1	1
		-----	-----	2	2
4	2.0 BAP + 1.5 IBA	1	1	1	1
		2	1	2	2
		3	2	3	2
5	<b>4.0 BAP + 0.01 IBA</b>	1	1	1	2
		2	1	2	1
		<b>3</b>	<b>1</b>	<b>3</b>	<b>3</b>
		4	1	4	1
		5	1	5	2
6	4.0 BAP + 0.1 IBA	No formó brotes		No formó brotes	
7	4.0 BAP + 1.5 IBA	1	1	1	1
		2	1	2	1
8	6.0 BAP + 0.01 IBA	1	1	1	2
		2	1	2	1
9	6.0 BAP + 0.1 IBA	1	1	1	1
		2	1	2	1
		3	1	3	1
10	6.0 BAP + 1.5 IBA	No formó brotes		No formó brotes	
11	8.0 BAP + 0.01 IBA	1	1	1	1
12	8.0 BAP + 0.1 IBA	2	1	Formó callo	
13	8.0 BAP + 1.5 IBA	No formó brotes		No formó brotes	
<b>TOTAL DE BROTES</b>		21		29	

BAP = Bencil amino purina

IBA = Ácido indol butírico



**Figura 1. Efecto de la concentración de Citocininas y auxinas en la formación de brotes en el medio nutritivo de Almehdi y Parfitt.**

Referencia: **T1** (0.0 mg/l BAP + 0 mg/l IBA), **T2** (2.0 mg/l BAP + 0.01 mg/l IBA), **T3** (2.0 mg/l BAP + 0.1 mg/l IBA), **T4** (2.0 mg/l BAP + 1.5 mg/l IBA), **T5** (4.0 mg/l BAP + 0.01 mg/l IBA), **T6** (4.0 mg/l BAP + 0.1 mg/l IBA), **T7** (4.0 mg/l BAP + 1.5 mg/l IBA), **T8** (6.0 mg/l BAP + 0.01 mg/l IBA), **T9** (6.0 mg/l BAP + 0.1 mg/l IBA), **T10** (6.0 mg/l BAP + 1.5 mg/l IBA), **T11** (8.0 mg/l BAP + 0.01 mg/l IBA), **T12** (8.0 mg/l BAP + 0.1 mg/l IBA), **T13** (8.0 mg/l BAP + 1.5 mg/l IBA).

Según la figura 1 existe diferencias entre los tratamientos siendo la combinación de 4.0 mg/l BAP + 0.01 mg/l IBA la que más brotes produjo, no así en los tratamientos donde la cantidad de bencil amino purina se incremento donde la respuesta fue escasa o nula.

#### **C.4 Tratamientos sin respuesta a la brotación.**

En este grupo se incluye al tratamiento testigo ya que los explantes no presentaron ningún indicio de brotación y después de transcurridos 60 días de sembrados se empezó a notar la muerte del tejido que inicio en la parte superior del mismo hasta abarcar todo el explante, de igual forma se observó para los tratamiento 6, 10, 11, 12, y 13, de estos los tratamientos 12 y 13 se caracterizaron por la formación de callo de un color verde pálido que se presento en el extremo superior del explante y en algunos casos en la base de la yema lo cual provoco la caída de la misma para dar paso al desarrollo del callo, sufriendo la muerte transcurridos los 90 días después de haber realizado la siembra. Según Bidwell mencionado por Ortega (21), dice que el balance auxina-citocinina es un factor muy importante en la regulación del crecimiento por alargamiento o por división celular.

## 7.2.2 Comportamiento de los explantes en el medio nutritivo de Gamborg (9).

### A. Porcentajes de sobrevivencia a la oxidación y contaminación.

#### a. Oxidación de explantes en el medio nutritivo de Gamborg.

La oxidación de los explantes en el medio de Gamborg no tuvo gran incidencia y se manifestó en los tratamientos 9 (6.0 mg/l BAP + 0.1 mg/l IBA), 11 (8.0 mg/l BAP + 0.01 mg/l IBA) esto ocurrió a los diez días de haber inoculado los explantes, esta oxidación se manifestó inicialmente en el extremo superior del explante para ello se observó un cambio de coloración en el tejido, de verde se torno a café.

Al mes de sembrado los explantes se observó también en el tratamiento 1 (0.0 mg/l BAP + 0.0 mg/l IBA) y 10 (6.0 mg/l BAP + 1.5 mg/l IBA), siendo en estos únicos explantes que se vieron afectados por la oxidación. Como puede verse la oxidación en este medio no causo mayor limitante en la sobrevivencia de dichos explantes, el cuadro 24 nos muestra con detalle los tratamientos que sufrieron oxidación.

**Cuadro 24 Comportamiento de la sobrevivencia a la oxidación de explantes de melocotón *Prunus persica* (L.) Batsch var. Salcajá utilizando 900.0 mg/l de polivinylpyrrolidone a los 30 días de inoculados los explantes en el medio nutritivo de Gamborg.**

Tratamiento	Combinación de reguladores mg/l	explantes oxidados	Porcentaje de oxidación	explantes verdes	Porcentaje de sobrevivencia
1	0.0 BAP + 0.0 IBA	2	20	8	80
2	2.0 BAP + 0.01 IBA	0	0	10	100
3	2.0 BAP + 0.1 IBA	0	0	10	100
4	2.0 BAP + 1.5 IBA	0	0	10	100
5	4 BAP + 0.01 IBA	0	0	10	100
6	4 BAP + 0.1 IBA	0	0	10	100
7	4 BAP + 1.5 IBA	0	0	10	100
8	6 BAP + 0.01 IBA	0	0	10	100
9	6 BAP + 0.1 IBA	1	10	9	90
10	6 BAP + 1.5 IBA	2	20	8	80
11	8 BAP + 0.01 IBA	1	10	9	90
12	8 BAP + 0.1 IBA	0	0	10	100
13	8 BAP + 1.5 IBA	0	0	10	100
<b>TOTAL</b>		<b>6</b>	<b>5%</b>	<b>124</b>	<b>95%</b>

BAP = Bencil amino purina

IBA = Ácido indol bunitirico

Como puede observarse la oxidación de dichos explantes pudo deberse a la calidad del material en cuanto al tiempo de formación como se evidencio en los tratamientos de la fase 1, además se observó que el ennegrecimiento del tejido en comparación con el medio Almehdi y Parfitt se presentó muy lentamente por lo que el estado de lignificación del material jugo un papel importante ya que de esta manera se puede disminuir el porcentaje de oxidación del tejido.

Además la concentración de los elementos del medio puede influir en el desarrollo y crecimiento del explante o al contrario puede causar alguna toxicidad por algún elemento presente en el mismo el cual puede evidenciarse con el cambio de coloración por parte del tejido de un verde normal a colores oscuros o con el necrosamiento del tejido. De acuerdo con lo anterior el medio B5 (Gamborg 1968) es un medio que presenta bajos contenidos de amonio y el cual se utiliza generalmente para el cultivo de células (20). No así los otros medios nutritivos utilizados los cuales el nivel de amonio es superior.

#### **b. Contaminación por microorganismos en el medio nutritivo Gamborg (9).**

La contaminación de los explantes por hongos y bacterias se observó únicamente en los primeros 15 días después de haber inoculados los explantes y correspondió a un 25% de contaminación, contra un 75% de sobrevivencia estos resultados fueron obtenidos después de haber aplicado la metodología y el tiempo de desinfección que mejor contrarrestó la contaminación descrita en la fase 1, sin embargo existen muchos factores que pueden incidir en la contaminación del material vegetal como lo es la manipulación del material vegetal en el momento de la desinfección, el estado de sanidad de los árboles donde es tomado el material vegetal, o el tiempo en el cual se tomó el material era favorable para el desarrollo de hongos y bacterias. Estos son algunos factores que pudieron haber influido en la eficiencia de la solución desinfectante utilizada, esto porque de los tres medios utilizados el medio de Gamborg fue el que más contaminación presentó. En el siguiente cuadro (25) se da a conocer los tratamientos que presentaron contaminación en el cual el tratamiento 12 (8 mg/l BAP + 0.1 mg/l IBA) es el que más unidades experimentales perdió por contaminación teniendo un 50 %, seguido de los tratamientos 3 (2.0 mg/l BAP + 0.1 mg/l IBA), 6 (4.0 mg/l BAP + 0.1 mg/l IBA) y 13 (8.0 mg/l BAP + 1.5 mg/l IBA) en los cuales se presentó un 40 % de contaminación en cada uno así mismo el tratamiento 2 (2.0 mg/l BAP + 0.01 mg/l IBA) y 8 (6.0 mg/l BAP + 0.01 mg/l IBA) presentó un 30%, también es de hacer notar que en contraparte los tratamientos 9 (6 mg/l BAP + 0.1 mg/l IBA) y 11 (8.0 mg/l BAP + 0.01 mg/l IBA) no se presentó ningún tipo de contaminación por lo que la forma en que se manipuló el material en el momento de la desinfección fue un factor determinante que provocó tanta diferencia de contaminación entre tratamientos. Peñalosa (24) desinfectó varetas de *Prunus persica* (L.) Batsch var. Diamante manteniéndolas en refrigeración durante 72 horas y desinfectando con cloro 10% (6% de hipoclorito de sodio) y tween 20.

**Cuadro 25 comportamiento de la sobrevivencia de explantes de melocotón *Prunus persica* (L.) Batsch var. Salcajá a la contaminación, a los 15 días de inoculados los explantes utilizando como desinfectantes y preservantes, benomyl, sulfato de cobre pentahidratado, estreptomicina, cloranfenicol, oxitetraciclina, ácido ascórbico y cítrico .**

Tratamiento	Combinación de reguladores mg/l	Contaminación	Porcentaje de contaminación	No contaminados	Porcentaje sin contaminación
1	0 BAP + 0 IBA	2	20	8	70
2	2 BAP + 0.01 IBA	3	30	7	70
3	2 BAP + 0.1 IBA	4	40	6	60
4	2 BAP + 1.5 IBA	2	20	8	80
5	4 BAP + 0.01 IBA	2	20	8	80
6	4 BAP + 0.1 IBA	4	40	6	60
7	4 BAP + 1.5 IBA	1	10	9	90
8	6 BAP + 0.01 IBA	3	30	7	70
<b>9</b>	<b>6 BAP + 0.1 IBA</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>10</b>	<b>100</b>
10	6 BAP + 1.5 IBA	2	20	8	80
11	8 BAP + 0.01 IBA	0	0	10	100
<b>12</b>	<b>8 BAP + 0.1 IBA</b>	<b>5</b>	<b>50</b>	<b>5</b>	<b>50</b>
13	8 BAP + 1.5 IBA	4	40	6	60
<b>TOTAL</b>		<b>32</b>	<b>25%</b>	<b>98</b>	<b>75%</b>

BAP = Bencil amino purina

IBA = Ácido indol bunitirico

## **B. Porcentaje de brotación de yemas en el medio nutritivo de Gamborg.**

### **B.1. Brotación de yemas a los 15 días.**

Los resultados reflejan que el tratamiento 4 (1.5 mg/l de IBA + 2.0 mg/l de BAP) fue el tratamiento en el cual las yemas brotaron primero y esto se manifestó a los diez días de haber inoculado las unidades experimentales, la lectura efectuada a los 15 días refleja que en este mismo tratamiento la brotación se observó en dos unidades experimentales y además la brotación también fue evidente en el tratamiento 11 (0.01 mg/l de IBA + 8.0 mg/l de BAP) aunque solo en una repetición.

### **B.2. Brotación de yemas a los 30 días.**

Después de 30 días también se observó que el tratamiento 4 (2.0 mg/l BAP + 1.5 mg/l IBA) fue el que más brotación presento con un 60%, le siguió el tratamiento 3 (2.0 mg/l BAP + 0.1 mg/l IBA) con un 30% y el 2 (2.0 mg/l BAP + 0.01 mg/l IBA) con un 20%. Como puede observarse la brotación se observa en mayor cantidad donde las dosis de regulador son bajas tanto de auxina como de citosininas.

**Cuadro 26 Comportamiento de la brotación a los 30 días de sembrados los explantes de melocotón *Prunus persica* (L.) Batsch var. Salcajá**

Tratamiento	Combinación de reguladores mg/l	Explantes con brotación	Porcentajes de explantes con brotación	Explantes sin respuesta	Porcentaje de explantes sin respuesta
1	0 BAP + 0 IBA	0	0	10	100
2	2 BAP + 0.01 IBA	2	20	8	80
3	2 BAP + 0.1 IBA	3	30	7	70
4	2 BAP + 1.5 IBA	6	60	4	40
5	4 BAP + 0.01 IBA	0	0	10	100
6	4 BAP + 0.1 IBA	0	0	10	100
7	4 BAP + 1.5 IBA	0	0	10	100
8	6 BAP + 0.01 IBA	1	10	9	90
9	6 BAP + 0.1 IBA	0	0	10	100
10	6 BAP + 1.5 IBA	1	10	9	90
11	8 BAP + 0.01 IBA	0	0	10	100
12	8 BAP + 0.1 IBA	0	0	10	100
13	8 BAP + 1.5 IBA	0	0	10	100
<b>TOTAL</b>		<b>13</b>	<b>10%</b>	<b>117</b>	<b>90%</b>

BAP = Bencil amino purina  
 IBA = Ácido indol bunitirico

### **B.3. Brotación de yemas a los 60 días.**

La tercera lectura realizada a los 60 días de sembrados los explantes refleja que el mejor tratamiento en cuanto al porcentaje de brotación corresponde al 4 (1.5 mg/l de IBA + 2 mg/l de BAP) ya que de las 10 repeticiones, 8 se observaron brotadas y las dos restantes se perdieron debido a la contaminación por microorganismos. Le siguió el tratamiento 3 (0.1 mg/l de IBA + 2.0 mg/l de BAP) con 3 repeticiones, los tratamientos 11 y 2 no presentaron aumento en cuanto a brotación no así los tratamientos 8 y 10 en los cuales se incremento en una repetición cada una y los nuevos tratamientos que brotaron en este lapso de tiempo correspondieron a los tratamientos 5 (0.01 mg/l de IBA + 4.0 mg/l de BAP) 6 (0.1 mg/l + 4.0 mg/l de BAP) y 7 (1.5 mg/l de IBA + 4 mg/l de BAP). Después de este lapso de tiempo ya no se observó brotación de ninguna yema axilar presentando tejido muerto por parte de los explantes. Es de hacer notar que en los tratamientos 1 (0.0 mg/l BAP + 0.0 mg/l IBA), 9 ( 6.0 mg/l BAP + 0.1 mg/l IBA) y 13 (8.0 mg/l BAP + 1.5 mg/l IBA) no se presento ninguna brotación y al final los explantes murieron. Peñalosa (25) obtuvo buena respuesta de brotación y crecimiento de yemas axilares y ápices de *Prunus persica* (L.) Batsch var. Diamante utilizando 100% de sales de MS y 1.5 mg/l de BAP, factores que solo se toman como referencia en el presente estudio.

**Cuadro 27 Comportamiento de la brotación a los 60 días de sembrados los explantes de melocotón *Prunus persica* (L.) Batsch var. Salcajá**

Tratamiento	Combinación de reguladores mg/l	Explantos con brotación	Porcentajes de explantes con brotación	Explantos sin respuesta	Porcentaje de explantes sin respuesta
1	0 BAP + 0 IBA	0	0	10	100
2	2 BAP + 0.01 IBA	2	20	8	80
3	2 BAP + 0.1 IBA	3	30	7	70
4	2 BAP + 1.5 IBA	<b>8</b>	<b>80</b>	2	20
5	4 BAP + 0.01 IBA	1	10	9	90
6	4 BAP + 0.1 IBA	2	20	8	80
7	4 BAP + 1.5 IBA	1	10	9	90
8	6 BAP + 0.01 IBA	2	20	8	80
9	6 BAP + 0.1 IBA	0	0	10	100
10	6 BAP + 1.5 IBA	2	20	8	80
11	8 BAP + 0.01 IBA	2	20	8	80
12	8 BAP + 0.1 IBA	2	20	8	80
13	8 BAP + 1.5 IBA	0	0	10	100
<b>TOTAL</b>		<b>25</b>	<b>19%</b>	<b>105</b>	<b>81%</b>

BAP = Bencil amino purina

IBA = Ácido indol bunitirico

### C. Número de brotes.

#### C.1. Número de brotes a los 30 días.

A los 30 días se observó que el tratamiento 4 (2 mg/l BAP + 1.5 mg/l IBA) fue el que inicialmente presentó la formación de brotes.

#### C.2. Número de brotes a los 60 días.

A los 60 días el tratamiento 4 fue el que más brotes formó y en el que más unidades experimentales se presentó siendo un total de 8, de estas 4 repeticiones presentaron más de un brote y el resto solamente con un brote le siguió el tratamiento 3 (2 BAP + 0.1 IBA) presentando un solo brote por cada unidad también se observó la formación de brotes en los tratamientos 2 (2 mg/l BAP + 0.01 mg/l IBA), 6 (4.0 mg/l BAP + 0.1 mg/l IBA), 8 (6.0 mg/l BAP + 0.01 mg/l IBA), 10 (6.0 mg/l BAP + 1.5 mg/l IBA), 11 (8.0 BAP mg/l + 0.01 mg/l IBA), 12 (8.0 mg/l BAP + 0.1 mg/l IBA), es de hacer notar que el tratamiento que menos repeticiones presentó en cuanto a la brotación fue el tratamiento 7 (4 mg/l BAP + 1.5 mg/l IBA) con una sola.

#### C.3. Número de brotes a los 90 días.

La tercera lectura efectuada mostró que el tratamiento 4 fue el único donde se incrementó la formación de brotes, de las ocho unidades experimentales en cuatro se observaron

3 brotes, en una dos brotes y en el resto solo un brote no así en el resto de tratamientos 3, 6, 8, 11, y 12 en los cuales no se observó ningún incremento en cuanto a los brotes. En el siguiente cuadro se muestra por tratamiento el número de brotes formados.

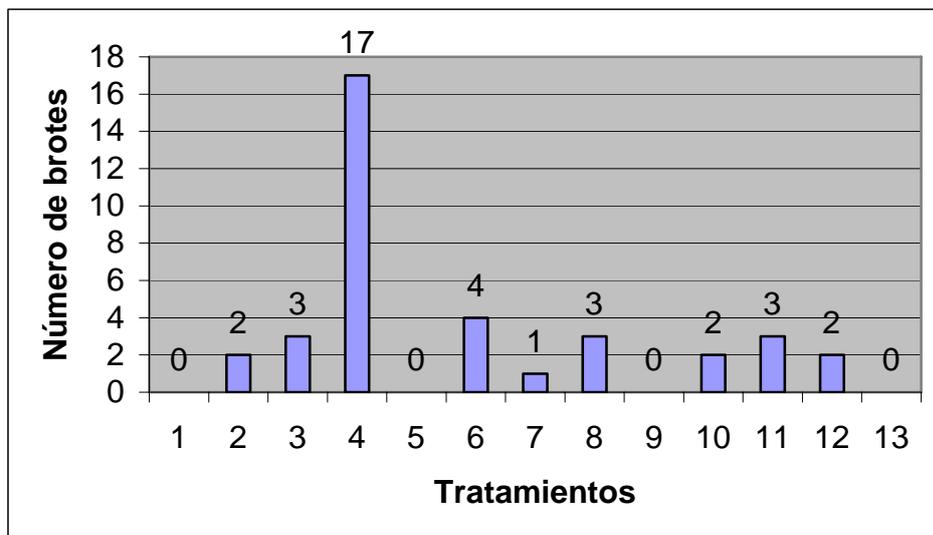
**Cuadro 28 Número de brotes a los 90 días de inoculados los explantes de melocotón *Prunus persica* (L.) Batsch var. Salcajá en el medio nutritivo de Gamborg .**

Tratamiento	Combinación Hormonal mg/l	Número de brotes a los 60 días		Número de brotes a los 90 días	
		Repeticiones con respuesta	Número de brotes	Repeticiones con respuesta	Número de brotes
1	0 BAP + 0 IBA	No formó brotes		No formó brotes	
2	2 BAP + 0.01IBA	1	1	1	1
		2	1	2	1
3	2 BAP + 0.1 IBA	1	1	1	1
		2	1	2	1
		3	1	3	1
4	2 BAP + 1.5 IBA	1	1	1	2
		2	2	2	3
		3	2	3	3
		4	1	4	1
		5	2	5	3
		6	1	6	1
		7	2	7	3
		8	1	8	1
5	4 BAP + 0.01IBA	No formó brotes		No formó brotes	
6		1	2	1	2
		2	2	2	2
7	4 BAP + 1.5 IBA	1	1	1	1
8	6 BAP + 0.01IBA	1	2	1	2
		2	1	2	1
9	6 BAP + 0.1 IBA	No formó brotes		No formó brotes	
10	6 BAP + 1.5 IBA	1	1	1	1
		2	1	2	1
11	8 BAP + 0.01IBA	1	1	1	1
		2	2	2	2
12	8 BAP + 0.1 IBA	1	1	1	1
		2	1	2	1
13	8 BAP + 1.5 IBA	No formó brotes		No formó brotes	
TOTAL DE BROTES			32		37

BAP = Bencil amino purina  
IBA = Ácido indol bunitirico

Como se aprecia en el cuadro 28 existió una respuesta en cuanto al número de unidades experimentales brotadas y a la vez en la formación de brotes y esto fue evidente en el tratamiento 4 ya que de los trece tratamientos fue al primero que respondió a la brotación y además fue el único que presentó el mayor número de brotes además presentó los brotes mas

vigorosos y de mayor longitud con brotes de 1.5 centímetro de longitud, en comparación con los otros tratamientos. Peñalosa (23) determino que las mejores respuestas para la multiplicación y crecimiento de brotes de *Prunus persica* (L.) Batsch, var. Diamante se presentaron con 75 o 100% del medio básico de MS (1962) y 2.0 mg/l de BAP dosis que coincide con la mejor respuesta obtenida en el presente trabajo. Así mismo Rodríguez (1982) mencionados por Peñalosa (23) estimulo la formación *in vitro* de brotes de durazno utilizando 6 benzil – amino purina (BA) 2 mg/l.



**Figura 2. Efecto de la concentración de Citocininas y Auxinas en la formación de brotes en el medio nutritivo de Gamborg**

Referencia: **T1** (0.0 mg/l BAP + 0 mg/l IBA), **T2** (2.0 mg/l BAP + 0.01 mg/l IBA), **T3** (2.0 mg/l BAP + 0.1 mg/l IBA), **T4** (2.0 mg/l BAP + 1.5 mg/l IBA), **T5** (4.0 mg/l BAP + 0.01 mg/l IBA), **T6** (4.0 mg/l BAP + 0.1 mg/l IBA), **T7** (4.0 mg/l BAP + 1.5 mg/l IBA), **T8** (6.0 mg/l BAP + 0.01 mg/l IBA), **T9** (6.0 mg/l BAP + 0.1 mg/l IBA), **T10** (6.0 mg/l BAP + 1.5 mg/l IBA), **T11** (8.0 mg/l BAP + 0.01 mg/l IBA), **T12** (8.0 mg/l BAP + 0.1 mg/l IBA), **T13** (8.0 mg/l BAP + 1.5 mg/l IBA).

En la figura 2 se observa que la combinación citosinina – auxina que mejor favoreció a la formación de brotes fue la de 2.0 mg/l BAP + 1.5 mg/l IBA con un total de 17 brotes, no así en las otras combinaciones donde la respuesta fue muy baja, esto presumiblemente a la combinación de regulador no fueron las optimas.

#### **C.4. Tratamientos sin respuesta a la brotación.**

Después de realizadas las lecturas fue evidente que en los tratamientos 1 (0 mg/l BAP + 0 mg/l IBA), 5 (4.0 mg/l BAP + 0.01 mg/l IBA), 9 (6.0 mg/l BAP + 0.1 mg/l IBA) y 13 (8.0 mg/l

BAP + 1.5 mg/l IBA) no hubo respuesta en cuanto a la brotación y así mismo en la formación de brotes adventicios, sin embargo si se observó la formación de callo esto fue evidente en el tratamiento 13, sin embargo esto no fue motivo de interés para este caso ya que el objetivo principal era la de observar la formación de brotes adventicios. En los otros tratamientos simplemente no se observó ninguna manifestación de respuesta favorable para el desarrollo de los explantes, al transcurrir los 60 días se observó que los mismos empezaron a declinar en cuanto al cambio de coloración por parte del tejido, observando un tejido café oscuro que al final abarco todo el explante.

### 7.2.3 Comportamiento de los explantes en el medio nutritivo de Linsmaier y Skoog (9).

#### A. Porcentajes de sobrevivencia a la oxidación y contaminación.

##### a. Oxidación de explantes en el medio nutritivo de Linsmaier y Skoog.

La oxidación en el medio Linsmaier y Skoog no se presentó en gran porcentaje al igual que en los otros dos medios a los nueve días de sembrados los explantes fue evidente la oxidación en el tratamiento 1 (0.0 mg/l BAP + 0.0 mg/l IBA),

Esta se incremento en el mismo tratamiento a los 13 días de sembrados los explantes y se observó en una unidad más, y a los 47 días se observó en 4 repeticiones más. Siendo en el único tratamiento donde se observó dicho cambio de coloración por liberación de fenoles, este comportamiento en cuanto al bajo porcentaje de la oxidación de los explantes probablemente se deba a que la composición y concentración de los componentes del medio difieren en relación a los otros medios probados.

**Cuadro 29 Comportamiento de la sobrevivencia a la oxidación de explantes de melocotón *Prunus persica* (L.) Batsch var. Salcajá utilizando 900.0 mg/l de polivinylpyrrolidone a los 47 días de inoculados los explantes en el medio nutritivo de Linsmaier y Skoog .**

Tratamiento	Combinación de reguladores mg/lt	Explantes oxidados	Porcentaje de oxidación	Explantes verdes	Porcentaje de sobrevivencia
1	0 BAP + 0 IBA	6	60	4	40
2	2 BAP + 0.01IBA	0	0	10	100
3	2 BAP + 0.1 IBA	0	0	10	100
4	2 BAP + 1.5 IBA	0	0	10	100
5	4 BAP + 0.01IBA	0	0	10	100
6	4 BAP + 0.1 IBA	0	0	10	100
7	4 BAP + 1.5 IBA	0	0	10	100
8	6 BAP + 0.01IBA	0	0	10	100
9	6 BAP + 0.1 IBA	0	0	10	100
10	6 BAP + 1.5 IBA	0	0	10	100

11	8 BAP + 0.01IBA	0	0	10	100
12	8 BAP + 0.1 IBA	0	0	10	100
13	8 BAP + 1.5 IBA	0	0	10	100
<b>TOTAL</b>		<b>6</b>	<b>5%</b>	<b>124</b>	<b>95%</b>

BAP = Bencil amino purina

IBA = Ácido indol bunitirico

#### **b. Contaminación por microorganismos en el medio Linsmaier y Skoog.**

Los tratamientos que más porcentaje de contaminación presentaron fueron el 7 (4.0 mg/l BAP + 1.5 mg/l IBA), 12 (8.0 mg/l BAP + 0.1 mg/l IBA) y el 13 (8.0 mg/l BAP + 1.5 mg/l IBA) a estos les siguieron los tratamientos 2 (2.0 mg/l BAP + 0.01 mg/l IBA) y 5 (4.0 mg/l BAP + 0.01 mg/l IBA), esta contaminación se presentó en los primeros 20 días después de haber inoculados los explantes, el resto de tratamientos se caracterizó porque no se presentó ninguna unidad experimental contaminada.

#### **Cuadro 30 comportamiento de la sobrevivencia de explantes de melocotón *Prunus persica* (L.) Batsch var. Salcajá a la contaminación, a los 20 días de inoculados los explantes utilizando como desinfectantes y preservantes, benomyl, sulfato de cobre pentahidratado, estreptomicina, cloranfenicol, oxitetraciclina, ácido ascórbico y cítrico.**

Tratamiento	Combinación de reguladores mg/l	Contaminación	Porcentaje de contaminación	No contaminados	Porcentaje sin contaminación
1	0 BAP + 0 IBA	0	0	10	100
2	2 BAP + 0.01IBA	1	10	9	90
3	2 BAP + 0.1 IBA	0	0	10	100
4	2 BAP + 1.5 IBA	0	0	10	100
5	4 BAP + 0.01IBA	1	10	9	90
6	4 BAP + 0.1 IBA	0	0	10	100
7	4 BAP + 1.5 IBA	2	20	8	80
8	6 BAP + 0.01IBA	0	0	10	100
9	6 BAP + 0.1 IBA	0	0	10	100
10	6 BAP + 1.5 IBA	0	0	10	100
11	8 BAP + 0.01IBA	0	0	10	100
12	8 BAP + 0.1 IBA	2	20	8	80
13	8 BAP + 1.5 IBA	2	20	8	80
<b>TOTAL</b>		<b>8</b>	<b>6 %</b>	<b>122</b>	<b>94 %</b>

BAP = Bencil amino purina

IBA = Ácido indol bunitirico

Como puede observarse el control de la contaminación en este medio se redujo en un alto porcentaje y la que ocurrió pudo deberse a la calidad en cuanto a la sanidad que presentó el explante.

## B. Porcentaje de brotación de yemas medio nutritivo Linsmaier y Skoog.

### B.1 Brotación de yemas a los 15 días.

La brotación a los 15 días se observó únicamente en los tratamientos 2 (2.0 mg/l BAP + 0.01 mg/l IBA) y 5 (4.0 mg/l BAP + 0.01 mg/l IBA) ambas con una repetición.

### B.2 Brotación de yemas a los 30 días.

A los 30 días también se observó en los tratamientos 3 (2.0 mg/l BAP + 0.1 mg/l IBA), 4 (2.0 mg/l BAP + 1.5 mg/l IBA), 6 (4.0 mg/l BAP + 0.1 mg/l IBA) y 11 (8.0 mg/l BAP + 0.01 mg/l IBA) de estos el único que presento más de una repetición fue el tratamiento 3, el resto de tratamientos solo con una.

### B.3 Brotación de yemas a los 60 días.

A los 60 días la combinación de reguladores que presentó el mayor porcentaje de brotación fue el tratamiento 3 con un 30%, de igual forma el tratamiento 6 (4.0 mg/l de BAP + 0.1 mg/l de IBA) con un 30 % y fue el tratamiento que respondió en un mayor lapso de tiempo en relación con los otros tratamientos. Es de hacer notar que el resto de tratamientos se caracterizó porque presento un 10% de brotación. El resto de tratamientos no presento ningún tipo de respuesta a la brotación y al cabo de 60 días el tejido de los explantes cambio de coloración de verde a café lo que indico la muerte de los explantes.

**Cuadro 31 Comportamiento de la brotación a los 60 días de sembrados los explantes de melocotón *Prunus persica* (L.) Batsch var. Salcájá.**

Tratamiento	Combinación de reguladores mg/l	Explantos con brotación	Porcentajes de explantes con brotación	Explantos sin respuesta	Porcentaje de explantes sin respuesta
1	0 BAP + 0 IBA	0	0	10	100
2	2 BAP + 0.01 IBA	1	10	9	90
<b>3</b>	<b>2 BAP + 0.1 IBA</b>	<b>3</b>	<b>30</b>	<b>7</b>	<b>70</b>
4	2 BAP + 1.5 IBA	1	10	9	90
5	4 BAP + 0.01 IBA	1	10	9	90
<b>6</b>	<b>4 BAP + 0.1 IBA</b>	<b>3</b>	<b>30</b>	<b>7</b>	<b>70</b>
7	4 BAP + 1.5 IBA	0	0	10	100
8	6 BAP + 0.01 IBA	0	0	10	100
9	6 BAP + 0.1 IBA	1	10	9	90
10	6 BAP + 1.5 IBA	0	0	10	100
11	8 BAP + 0.01 IBA	1	10	9	90
12	8 BAP + 0.1 IBA	0	0	10	100
13	8 BAP + 1.5 IBA	0	0	10	100
<b>TOTAL</b>		<b>11</b>	<b>8 %</b>	<b>119</b>	<b>92 %</b>

BAP = Bencil amino purina

IBA = Ácido indol bunitirico

Como lo demuestran los resultados la respuesta del material vegetal fue muy limitado, por lo que con fines de propagación este medio no favorece a la brotación de las yemas axilares

esto debido a la concentración de los elementos que lo conforman. Altamirano (2) obtuvo resultados muy limitados en la brotación de la variedades de durazno S-66 y la S-50 en el medio Linsmaier y Skoog, no así en los medios Almehdi y Parfitt y Gamborg donde los resultados fueron satisfactorios.

### C. Número de brotes.

#### C.1 Número de brotes a los 30 días.

A los 30 días los explantes de los tratamientos 2 (2.0 mg/l BAP + 0.01 mg/l IBA), 3 (2.0 mg/l BAP + 0.1 mg/l IBA), 4 (2.0 mg/l BAP + 1.5 mg/l IBA), 5 (4.0 mg/l BAP + 0.01 mg/l IBA), 6 (4.0 mg/l BAP + 0.1 mg/l IBA), y 11 (8.0 mg/l BAP + 0.01 mg/l IBA) no presentaron más de un brote, observándose únicamente la formación del brote de la yema original.

#### C.2 Número de brotes a los 60 días.

A los 60 días el tratamiento que sobresalió porque formó más de un brote fue el 6 y además el tratamiento 9 (6.0 mg/l BAP + 0.1 mg/l IBA) se sumo a los tratamientos anteriores ya que este también presento la formación de un brote.

#### C.3 Número de brotes a los 90 días.

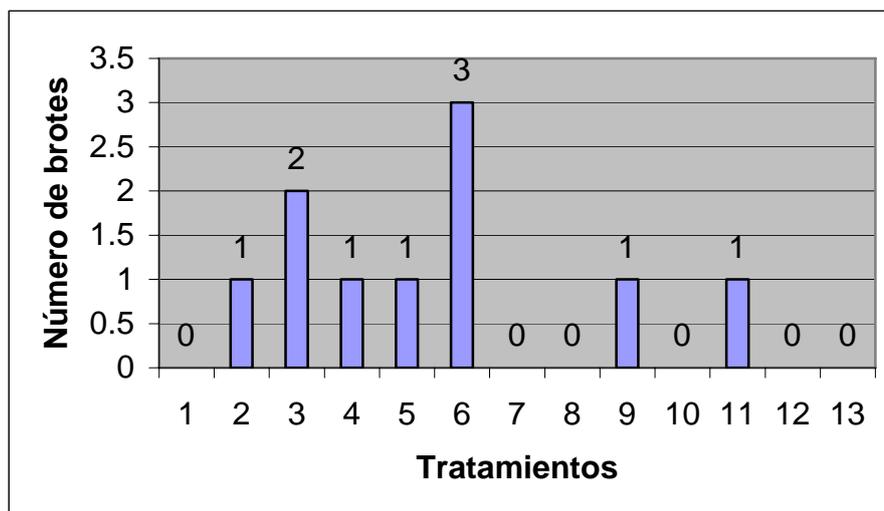
A los 90 días el tratamiento 6 fue el que presento más brotes y los que presentaron los brotes con mayor vigorosidad y longitud alcanzando 1.5 centímetros de largo y lo relevante fue observar que los brotes formados en los tratamientos 5 y 9 no alcanzaron un desarrollo normal en cuanto a la proporción hojas / tallo observando un tallo débil de aproximadamente 0.8 mm de longitud con hojas amarillentas sufriendo un cambio de coloración del tejido de verde a café que al final provocó la muerte del brote, esto también se observó en algunos explantes de otros tratamientos por lo que la cantidad de explantes se vio reducido.

**Cuadro 32 Número de brotes a los 90 días de inoculados los explantes de melocotón *Prunus persica* (L.) Batsch var. Salcajá en el medio nutritivo de Linsmaier y Skoog .**

Tratamiento	Combinación Hormonal mg/l	Número de brotes a 60 días		Numero de brotes a 90 días	
		Repeticiones con respuesta	Número de brotes	Repeticiones con respuesta	Número de brotes
1	0 BAP + 0 IBA	No formó brotes		No formó brotes	
2	2 BAP + 0.01IBA	1	1	1	1
3	2 BAP + 0.1 IBA	2	1	2	2
4	2 BAP + 1.5 IBA	1	1	1	1
5	4 BAP + 0.01IBA	1	1	1	1
<b>6</b>	<b>4 BAP + 0.1 IBA</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>3</b>
7	4 BAP + 1.5 IBA	No formó brotes		No formó brotes	
8	6 BAP + 0.01IBA	No formó brotes		No formó brotes	

9	6 BAP + 0.1 IBA	1	1	1	1
10	6 BAP + 1.5 IBA	No formó brotes		No formó brotes	
11	8 BAP + 0.01 IBA	1	1	1	1
12	8 BAP + 0.1 IBA	No formó brotes		No formó brotes	
13	8 BAP + 1.5 IBA	No formó brotes		No formó brotes	
TOTAL DE BROTES		8	9	8	10

BAP = Bencil amino purina  
 IBA = Ácido indol buritirico



**Figura 3. Efecto de la concentración de Citocininas y Auxinas en la formación de brotes en el medio nutritivo de Linsmaier y Skoog**

Referencia: **T1** (0.0 mg/l BAP + 0 mg/l IBA), **T2** (2.0 mg/l BAP + 0.01 mg/l IBA), **T3** (2.0 mg/l BAP + 0.1 mg/l IBA), **T4** (2.0 mg/l BAP + 1.5 mg/l IBA), **T5** (4.0 mg/l BAP + 0.01 mg/l IBA), **T6** (4.0 mg/l BAP + 0.1 mg/l IBA), **T7** (4.0 mg/l BAP + 1.5 mg/l IBA), **T8** (6.0 mg/l BAP + 0.01 mg/l IBA), **T9** (6.0 mg/l BAP + 0.1 mg/l IBA), **T10** (6.0 mg/l BAP + 1.5 mg/l IBA), **T11** (8.0 mg/l BAP + 0.01 mg/l IBA), **T12** (8.0 mg/l BAP + 0.1 mg/l IBA), **T13** (8.0 mg/l BAP + 1.5 mg/l IBA).

La figura 3 demuestra que la formación de brotes en este medio nutritivo no fue favorecida, y la concentración de regulador que formó más de dos brotes correspondió a la de 4.0 mg/l BAP + 0.1 mg/l IBA, sin embargo esta respuesta no es la idónea ya que los otros medios nutritivos probados favorecieron en mayor cantidad la formación de dichos brotes y por lo tanto con fines de propagación masiva este medio tendría sus limitantes esto debido a la concentración en cuanto a los nitratos ya que es superior a otros medios probados por lo que este factor pudo afectar directamente al desarrollo de los explantes.

### 7.3 FASE DE INDUCCIÓN DE RAÍCES EN LOS BROTES OBTENIDOS.

Para la fase de enraizamiento se utilizó el medio basal Murashige y Skoog en cuatro concentraciones de sales 100, 75, 50 y 25 % y la dosis del regulador IBA en tres concentraciones 0.1, 0.5, y 1.0 mg/l, el cambio de medio se debió básicamente a que la transferencia de medios favorece grandemente la estimulación en la formación y elongación radicular, tal como lo demostró Mosella mencionado por Roca (27) quien logro resultados satisfactorios en la estimulación de la elongación radicular y el desarrollo de la parte aérea de plántulas de *Prunus persica* var. GF 305 partiendo del cultivo de ápices. Los resultados producto de las lecturas reflejan que los tratamientos 1 (0 mg/l IBA y 100%), 4 (0.1 mg/l IBA y 25%), 7 (0.5 mg/l IBA y 25%), 9 (1.0 mg/l IBA Y 50%), y 10 (1.0 mg/l IBA y 25 %) se caracterizaron porque a los 5 días de haber inoculados los brotes estos se murieron, para ello presentaron cambios de coloración en los tejidos, de verde a café, este cambio se presentó muy rápido observándose a los 5 días, teniendo como resultado la muerte del tejido y por ende la del brote, con lo cual se demuestra que estas concentraciones de medio basal no favorecieron a la sobrevivencia de dichos brotes. Sin embargo el tratamiento en el cual la concentración fue del 75% fue el que mejor respondió en cuanto a las características de vigorosidad y sobrevivencia de los brotes, esto durante el periodo de duración de la fase de enraizamiento.

Pero a los 30 días en el cual se tomó la lectura en los brotes sobreviviente se notó que ningún tratamiento estimuló la formación de raíces. Esto presumiblemente se debió a que las concentraciones estudiadas en la presente fase no favorecieron a la formación de raíces en dichos brotes, ya que en trabajos realizados con otras variedades de *Prunus persica* como lo son la S-50 y la S-66 lograron enraizar los explantes, tal como lo indica Altamirano (2), quien logro enraizar la S-66 en la dosis de 4.06 y 8.12 mg/l de IBA, así mismo en la dosis de 1.86 mg/l de ácido indolbutírico pero en este caso solo en la variedad S-50. Skirvin y Chu mencionados por Miller (19) multiplicaron brotes de melocotón *in vitro* del portainjerto de melocotón Nemaguar, pero obtuvieron resultados limitados en los sucesos de enraizamiento. Tabachnik y Koster reportaron también enraizamientos limitados con algunos híbridos de melocotón. Miller (19) logro enraizamientos de brotes adventicios de la variedad Nemaguar esto con la concentración de 0.1 mg/l de ácido indolbutírico no así con la presencia de BA, también menciona que el enraizamiento fue reducido de un 90% a 25% cuando la vitamina Staba se encontraba presente y se vio inhibido el enraizamiento con la presencia de la riboflavina. Welkerlin (34) enraizó brotes provenientes del sexto y séptimo subcultivo *in vitro*, del portainjerto Colt *Prunus avium x Prunus pseudocerasus* con la presencia de 0.5 mg/l de ANA ya que esta no inhibió el crecimiento de las raíces ni de los brotes.

Como se observa las concentraciones evaluadas no favorecieron al estímulo de dichas raíces ya que como lo menciona Hammerschlag (13) que entre especies y cultivares existen diferencias en requerimientos exógenos de hormonas durante el enraizamiento *in vitro* además menciona que el enraizamiento está posiblemente influenciado bajo algún grado de regularización por los genes que controlan el tiempo de maduración del fruto y así los niveles de reguladores exógenos de crecimiento son necesarios para un enraizamiento óptimo.

## 8. CONCLUSIONES

1. El antioxidante que fue más efectivo en contrarrestar la oxidación y que presentó más porcentaje de sobrevivencia de los explantes fue el polivinylpyrrolidona en la dosis de 900.0 mg/l, teniendo un 93% en el medio Almehdi y Parfitt, 95%, en el medio Gamborg y 95% en el medio Linsmaier y Skoog.
2. La aplicación de soluciones bactericidas desinfectantes, estreptomycin + oxitetraciclina 1500.0 mg/l cloranfenicol 500 mg/l, oxitetraciclina 200 mg/l, sulfato de cobre pentahidratado 1500.0 mg/l a explantes de melocotón *Prunus persica* (L.) Batsch var. Salcajá por 24 horas fueron efectivas para contrarrestar la contaminación por bacterias tanto endógenas como exógenas.
3. La aplicación de soluciones fungicidas desinfectantes, benomyl 1000.0 mg/l, sulfato de cobre pentahidratado 1500.0 mg/l, fueron efectivas para contrarrestar la contaminación por hongos y aumentaron el porcentaje de sobrevivencia, permitiendo un 79% en el medio nutritivo Almehdi y Parfitt, 75% en el medio Gamborg y un 94% en el medio Linsmaier y Skoog.
4. La combinación de bencil amino purina y ácido indol butírico que más porcentaje de yemas axilares brotadas presentó en el medio Almehdi y Parfitt fue en la dosis de 4.0 mg/l de bencil amino purina + 0.01 mg/l de ácido indolbutírico con un 50 % de brotación. En el medio Gamborg fue en la combinación de 2.0 mg/l de bencil amino purina + 1.5 mg/l de ácido indolbutírico con un 80 % de brotación y en el medio Linsmaier y Skoog en las dosis de 2.0 mg/l de bencil amino purina + 0.1 mg/l de ácido indolbutírico y 4.0 mg/l de bencil amino purina + 0.1 mg/l de ácido indol butírico ambas con un 30 % de brotación.
5. Las combinaciones hormonales que produjeron los mayores números de brotes a los 90 días de sembrados los explantes en los medio nutritivos fueron las siguientes:
  - b. Almehdi y Parfitt, 4.0 mg/l de BAP + 0.01 mg/l de IBA con un promedio de 1.8 brotes por explante y con una longitud del brote más largo de 2 centímetros.

- c. En el medio Gamborg en 2.0 mg/l de BAP + 1.5 mg/l de IBA con 2.12 brotes promedio por explantes y con brotes de 1.5 a 2 cm de longitud.
  - d. En el medio Linsmaier y Skoog en la dosis de 4.0 mg/l de BAP + 0.1mg/l de IBA con tres brotes y con una longitud de 1.5 centímetros de largo.
6. La concentración al 75 % de sales en el medio Murashige y Skoog favoreció a la sobrevivencia de los brotes en la fase de enraizamiento, no así en las concentraciones al 100% 50% y 25% en las cuales los brotes murieron a los cinco días de haberlos inoculado en los medios de cultivo.
7. Las dosis evaluadas de ácido indol butírico 0.1 mg/l, 0.5 mg/l y 1.0 mg/l no indujeron la formación de raíces en los brotes de melocotón, *Prunus persica* (L.) Batsch var. Salcájá durante los 30 días que duró la fase del enraizamiento.

## 9. RECOMENDACIONES

1. Los resultados reflejan que existe una dosis de Polivinylpyrrolidona que controla al 100% la oxidación por lo que en estudios futuros deberán realizarse pruebas con otras dosis cercanas a la de 900.0 mg/l
2. Los resultados obtenidos para contrarrestar la contaminación por bacterias y hongos sugieren aplicar antibióticos y fungicidas (estreptomina + oxytetraciclina, sulfato de cobre pentahidratado, benomyl) a las plantas madres de donde se obtiene el material vegetal por un período de un mes, así también a nivel de laboratorio y además probar con otros antibióticos como la anfotericina B en la dosis de 100 mg/l..
3. Efectuar otras investigaciones en la especie *Prunus persica* (L) Batsch var. Salcajá a nivel *in vitro* para establecer una dosis que incremente el número de brotes, realizando para ello una exploración cerca de la dosis 2.0 mg/l de BAP + 1.5 mg/l de IBA en la cual fue la que más brotes produjo usando para ello el medio Gamborg.
4. Realizar otros estudios para la fase de enraizamiento de brotes de melocotón *Prunus persica* (L). Batsch var. Salcajá utilizando para ello reguladores como el ácido naftalenacético en el rango de 2.0 a 4.0 mg/l y ácido indol butírico en el rango de 4.0 mg/l a 8.0 mg/l.

## 10. IBLIOGRAFÍA

1. Agrios, GN. 1999. Fitopatología. Trad. Manuel Guzmán Ortiz. 2 ed. México, Limusa-Uteha. 838 p.
2. Altamirano Zapata, RJ; Cedillo Nava, A; Morales A. 1993. Propagación *in vitro* de durazno, *Prunus persica* (L.) Batsch, a partir de yemas axilares. Agricultura Técnica de México 19(1,2):37-50.
3. Arana López, GA. 1986. Diagnóstico del cultivo del melocotón *Prunus persica* (L.) Batsch en la aldea San Juan Argueta municipio y departamento de Solola. Diagnostico EPSA. Guatemala, USAC. 22 p.
4. Biocity, ES. 2002. Hormonas vegetales (en línea). España. Consultado 12 May. 2003. Disponible en [biocity.iespana.es/biocity/Fisveg/fv8.htm](http://biocity.iespana.es/biocity/Fisveg/fv8.htm).
5. Bolaños Lorenzana, JC. 2002. Respuesta del ave del paraíso *Strelitzia reginae* a la micropropagación. Tesis Ing. Agr. Guatemala, USAC. 95 p.
6. Calderon Estrada, JR. 2000. Respuesta de dos cultivares de aguacate *Persea americana* Mill. var. Guatemalensis var. Hass y var. Americana var. Booth-8 al cultivo de tejidos *in vitro*. Tesis Ing. Agr. Guatemala USAC. 69 p.
7. Cestmir, B. 1993. Enciclopedia de la jardinería. 3 ed. Madrid, España, Susaeta. 440 p.
8. Closal, LM; Cueva Baldovino, RM. 1998. Cultivo *in vitro* (en línea). España, Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agrícola de Lleida, Departamento de Horticultura, Botánica y Jardinería, Unidad de Fisiología Vegetal. Consultado 14 de May. 2002. Disponible en [www.etsea.udl.es/invitro/indice/htm](http://www.etsea.udl.es/invitro/indice/htm).
9. Conger, BV. 1982. Cloning agricultural plants, vía *in vitro* techniques. 2 ed. Florida, United States, s.e. 273 p.
10. Congreso Hispano Luso de Fisiología Vegetal, Ecofisiología del Cultivo *in vitro* (6., 1999, España). 2000. Trabajos presentados. Ed. por Sánchez Tamez, R. Oviedo. España, Universidad de Oviedo. 4 p.
11. Cruz Sic, M. 2000. Informe de servicios realizados en el Centro Guatemalteco de Investigación y Capacitación de la Caña de Azúcar, Cengicaña. Informe EPSA. Guatemala, USAC. 42 p.
12. Curso de cultivo de tejidos (2., 1987, CR); Curso regional sobre el cultivo de tejidos en café (2., 1987, CR). Cultivo de tejidos. Turrialba, Costa Rica, IICA. p. 22-80.
13. Hammerschlag, F. 1982. Factors affecting establishment and growth of peach shoots *in vitro*. Hortsciencie 17(1):85-86.
14. Hartmann, H; Kester, DE. 1980. Propagación de plantas, principios y prácticas. Trad. Antonio Marino Ambrosio. 2 ed. México, CECSA. 814 p.

15. INIA (Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria, ES). 2002. Laboratorio de cultivo de tejidos; cultivo de tejidos (en línea). Consultado 15 May. 2002. Disponible en [http:// www.inia.org.uy/investigacion/biotecnologia/cultivos.htm](http://www.inia.org.uy/investigacion/biotecnologia/cultivos.htm).
16. Kanji, U. 1995. Cultivo de embriones de melocotón *in vitro*; informe final de las actividades realizadas desde mayo 1994, hasta septiembre 1996. Guatemala, ICTA. p. 24-35.
17. Kanji, U. *et al.* 1996. Principio básico de cultivo de tejidos, manual sobre cultivo de tejidos. Guatemala, ICTA-JOCV. 166 p.
18. Kyle, L; Kley, J. 1996. Plants from test tubes an introduction to micro propagation. 3 ed. Hong Kong, Timber Press. 240 p.
19. Miller, GA. *et al.* 1982. *In vitro* propagation of Nemaguard peach rootstock. Hortsciencie 17(2):194.
20. Orozco Castillo, C. 1996. Cultivo de tejidos vegetales y su aplicación en agricultura. *In* Simposio nacional sobre cultivo de tejidos vegetales (1., 1996, Guatemala). 1996. Trabajos presentados. Ed. Carlos Orozco Castillo. Guatemala, USAC. p. 1-9.
21. Ortega Orellana, EA. 2001. Prueba preliminar de propagación *in vitro* de shate (*Chamaedorea elegans* Martius) mediante embriones cigóticos. Tesis Ing. Agr. Guatemala, USAC. 40 p.
22. Pelczar, M; Reid, D; Chan, ECS. 1982. Microbiología. 4 ed. México, Mc GrawHill. 826 p.
23. Peñalosa, RP. s.f. Obtención de plantas libres de virus y propagación *in vitro* de durazno (*Prunus persica* Batsch var. Diamante) (en línea). México Escuela de Agronomía, Universidad Popular autónoma de Puebla, México. Consultado 20 May. 2002. Disponible en <http://siza.gemtel.commx/libros/delaros/p1.htm>.
24. Rainforest, US. 2002 Medios de cultivo para tejidos vegetales *in vitro* (en línea). US. Consultado 15 May. Disponible en [geocities.com/rainforest/andes/3026/medios.htm](http://geocities.com/rainforest/andes/3026/medios.htm).
25. Ramírez, E. 1994. Micropropagación de manzana *Malus pumila* Mill; informe final de actividades 1996. Labor Ovalle Quetzaltenango, Guatemala, ICTA p. 34-40.
26. Ramírez, E. 1996. Micropropagación de materiales de frutales deciduos tratados con radiación. Informe final de actividades 1996. Labor Ovalle Quetzaltenango, Guatemala, ICTA. P. 29-37.
27. Roca, MW; Mroginski AL. 1991. Cultivo de tejidos en la agricultura, fundamentos y aplicaciones. Cali, Colombia, Editores Técnicos. 969 p.
28. Ruano, AJ. 2002. El cultivo del melocotón (*Prunus persica*) en los departamentos de Chimaltenango y Sacatepéquez y sus perspectivas de desarrollo. Tesis Ing. Agr. Guatemala, USAC. 59 p.
29. Scorza, S. *et al.* 1989. Differential sensitivity of compact red haven and red haven peach; shoot tips to BA *in vitro*. Hortsciencie 24(2):334-336.

30. SEGEPLAN (Secretaria General de Planificación Económica, GT); PNUD, GT. 1991. Frutales deciduos, proyecto apoyo a la planificación del desarrollo regional. Guatemala. p. 7-8.
31. Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Humanidades. 1999. Problemas sociales y económicos de Guatemala. p. 36-39.
32. Villancinda M, RW. 1994. Respuesta de la especie tres puntas (*Neurolaena lobata* L) a la propagación *in vitro*. Tesis Ing. Agr. Guatemala, USAC. 93 p.
33. Weibel, AM. *et al.* 2000. Respuesta de nueve porta injertos al replante en duraznero *Prunus persica* (L.) Batsch . Consultado 10 May. 2002. Disponible en <http://www.e-campo.com/media/news/nl/altfruticultura27.htm>
34. Welkerling, T. *et al.* . 1990. Enraizamiento *in vitro* del portainjerto Colt (*Prunus avium x Prunus pseudocerasus*). Turrialba 40(1):82-87.
35. Ziv, M; Halevy, AH. 1983. Control de oxidative browning and *in vitro* *Strelitzia reginae*. Hortscience 18(4):434-436.

## 11. APÉNDICE

### 11.1 Concentración para preparar soluciones madres.

**Cuadro 33 Concentraciones de los componentes de los medios de cultivo utilizados en el estudio**

COMPONENTES	MEDIOS DE CULTIVO mg/l			
	Almehdi y Parfitt	Gamborg	Linsmaier y Skoog	Murashige y Skoog
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	-----	-----	1650	1650
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	270	134	-----	-----
KNO <sub>3</sub>	2500	2500	1900	1900
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	150	150	440	440
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	190	250	370	370
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	-----	-----	170	170
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	150	150	-----	-----
Na <sub>2</sub> EDTA	37.3	37.3	37.3	37.3
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	27.85	27.85	27.85	27.85
MnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	20	10	22.3	22.3
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	2.0	2.0	8.6	8.6
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	4.5	3.0	6.2	6.2
KI	0.75	0.75	0.83	0.83
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0.06	0.25	0.25	0.25
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0.05	0.025	0.025	0.025
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0.03	0.025	0.025	0.025
Vitaminas				
Thiamina-HCl	5.0	10.0	0.4	0.10
Nicotinamida	0.5	1.0	----	0.50
Pyridoxina HCl	1.0	1.0	----	0.50
Otros				
(iso-) o myo Inositol	25	100	100	100
glicina	-----	-----	-----	2
Sucrosa	20000	20000	30000	30000
Agar	0.8 %	0.8%	0.8%	0.8%
pH	5.7	5.5	5.7	5.7

### 11.2 Concentraciones para preparar 0.7 l de soluciones madre.

**Cuadro 34 Componentes de macronutrientes a concentración 20X en los medios de cultivo utilizados**

Sustancia	Medio de cultivo			
	AP grs	B5 grs	LS grs	MS grs
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	-----	-----	23.1	23.1
KNO <sub>3</sub>	35	35	26.6	26.6
MgSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	2.66	3.5	5.18	5.18
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	-----	-----	2.38	2.38
NH <sub>4</sub> SO <sub>4</sub>	3.78	1.876	-----	-----
(NaH <sub>2</sub> P) <sub>4</sub> . H <sub>2</sub> O	2.1	2.1	-----	-----

### 11.3 Concentración de cloruro de calcio.

**Cuadro 35 Cloruro de calcio a diferentes concentraciones por cada medio de cultivo**

Sustancia	Medio de cultivo			
	AP 40X	B5 40X	LS 30X	MS 30X
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	4.2 grm/ 0.7 l	4.2 grm/ 0.7 l	6.60 grm/ 0.5 l	6.60 grm/ 0.5 l

### 11.4 Concentración de micronutrientes.

**Cuadro 36 Concentraciones de micronutrientes en los medios de cultivo utilizados**

Sustancia	Medio de cultivo			
	1000X	1000X	1000X	1000X
MnSO <sub>4</sub> (4H <sub>2</sub> O)	2	0.5	2.23	2.23
ZnSO <sub>4</sub> (7H <sub>2</sub> O)	0.2	0.1	0.86	0.86
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0.45	0.15	0.62	0.62
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> . 2H <sub>2</sub> O	0.006	0.0125	0.025	0.025
Micro B	2000X	5000 X	5000 X	5000 X
CoCl <sub>2</sub> . 2H <sub>2</sub> O	0.015 grm/0.25 l	0.0125gr/0.1 l	0.0125	0.0125
CuSO <sub>4</sub> . 5H <sub>2</sub> O	0.025 grm/0.25 l	0.0125gr/0.1 l	0.0125	0.0125

### 11.5 Concentración de yoduro de potasio.

**Cuadro 37 Yoduro de potasio a concentracion1000 X**

Sustancia	Medio de cultivo			
	AP gr/0.1 l	B5 gr/0.1l	LS gr/ 0.05 l	MS gr/ 0.05 l
KI	0.075	0.075	0.0415	0.0415

### 11.6 Concentración de hierros.

**Cuadro 38 Hierros a concentración 200X por cada medio medio basal**

Sustancia	Medio de cultivo			
	AP gr/ 0.25 l	B5 gr/0.25 l	LS gr/0.25 l	MS gr/0.25 l
Na EDTA	1.865	1.865	1.865	1.865
Fe SO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	1.3925	1.3925	1.3925	1.3925

### 11.7 Concentración de vitaminas.

**Cuadro 39 Vitaminas a concentración 1000X por cada medio medio basal**

Sustancia	Medio de cultivo			
	AP gr/0.05 l	B5 gr/0.05 l	LS gr/0.05 l	MS gr/0.05 l
Tiamina-HCl	0.25	0.5	0.02	0.005
Ácido nicotínico	0.025	0.05	-----	-----
Pyridoxina-HCl	0.05	0.05	-----	0.025

## 11.8 Concentración de otros componentes de los medios.

**Cuadro 40 Otros componentes a concentración 1000X**

Sustancia	Medio de cultivo			
	AP gm/ 0.05 l	B5 gm/0.05 l	LS gm /0.1 l	MS gm /0.1 l
Myo Inositol	1.25	1.5	1.5	-----
Sucrosa	20 gm/l de medio	20 gm/l de medio	30 gm/l de medio	30 gm/l de medio
Agar	0.8%	0.8%	0.8%	0.8%
Glicina	-----	-----	-----	0.2