

i

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

EVALUACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO, ANTIOXIDANTES Y REGULADORES DE
CRECIMIENTO EN LA MICROPROPAGACIÓN DEL PORTAINJERTO
NEMAGUARD (*Prunus spp.*)

TESIS

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

POR

JULIO ERNESTO BERDUO SANDOVAL

En el acto de investidura como

INGENIERO AGRÓNOMO

EN

SISTEMAS DE PRODUCCIÓN AGRÍCOLA

EN EL GRADO ACADEMICO DE

LICENCIADO

Guatemala, noviembre del 2005

PROPIEDAD DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
Biblioteca Central

DL
01
+(2116)

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. Walter Arnoldo Reyes Sanabria
Ing. Agr. Danilo Ernesto Dardón Ávila
Maestro Elmer Antonio Alvarez Castillo
Perito Miriam Eugenia Espinoza Padilla
Ing. Agr. Pedro Pelaez Reyes**

Guatemala, noviembre del 2005

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

Distinguidos miembros:

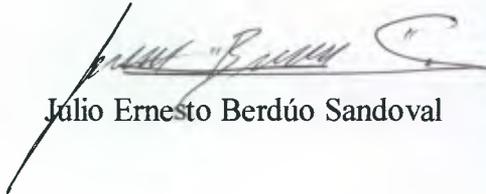
De conformidad con las normas establecidas en la Ley Orgánica de la Universidad de San Carlos de Guatemala, tengo el honor de someter a vuestra consideración, el trabajo de tesis titulado:

**EVALUACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO, ANTIOXIDANTES Y REGULADORES DE
CRECIMIENTO EN LA MICROPROPAGACIÓN DEL PORTAINJERTO
NEMAGUARD (*Prunus spp.*)**

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 de ustedes, como su atento y seguro servidor.

Atentamente,



Julio Ernesto Berdúo Sandoval

ACTO QUE DEDICO**A:****DIOS****MIS PADRES****Luis Ernesto Berdúo Rodríguez
Irma Aracely Sandoval de Berdúo****MIS HERMANAS****Roxanda Margarita
Mónica Dolores
Luisa Aracely****MI NOVIA****Mildred Eunice Tojin Rodríguez****MIS SOBRINOS****Mónica Margarita, Katheryn Roxanda, Boris Santiago,
Adriana, Samuel Omar, Pamela Isabel y Andrea Alejandra.****MIS AMIGOS****Carlos Federico Galdámez, Ramón Cajtí, Elder Hernández,
Luis Pérez, Juan Carlos Andrade, Oscar Monterroso, Jorge
Quinteros, Vinicio Yol, Rafael López, Alfredo Cabrera,
Horacio Gómez, Mak Milan Cruz, Luciano San Juan, Juan
Carlos Fuentes, Germán Gonzáles, Eduardo Garcia, Héctor
Palencia, Marlon Dávila, Jacobo Molina, Wuenseslao
Roblero, Eduardo Sunum.**

TESIS QUE DEDICO**A:****DIOS****MI PATRIA GUATEMALA****ANTIGUA GUATEMALA****UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA****FACULTAD DE AGRONOMIA****COOPERATIVA "CUNA DE LA PERA"****COLEGIO LA SALLE, ULTIMA PROMOCION DE BACHILLERES EN
CIENCIAS Y LETRAS 91-92.****COLEGIO MIXTO SANTIAGO DE LOS CABALLEROS****ESCUELA NACIONAL PARA VARONES LUIS MENA**

PROPIEDAD DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
Biblioteca Central

AGRADECIMIENTOS

A:

MIS ASESORES

Ing. Agr. Domingo Amador
Ing. Agr. Marco Antonio Nájera (Q.E.P.D)
Por su valiosa asesoría y colaboración para el desarrollo de esta tesis.

MAK MILÁN CRUZ:

Por su valiosa colaboración, orientación y amistad brindadas en la ejecución de la investigación.

REGINALDO DIAS, DAVID ASPUAC

Por haber colaborado en la investigación con la donación del material experimental. Y por participar en el engrandecimiento intelectual de mi persona.

INDICE GENERAL

	PÁGINA
INDICE GENERAL	vii
INDICE DE CUADROS	xii
INDICE DE FIGURAS	xiv
GLOSARIO DE ABREVIATURAS	xvi
RESUMEN	xviii
1. INTRODUCCION	1
2. DEFINICION DEL PROBLEMA	3
3. MARCO TEORICO	4
3.1 MARCO CONCEPTUAL	4
3.1.1 Generalidades del cultivo del melocotón	4
A. Aspectos botánicos	4
a. Clasificación botánica	4
b. Descripción botánica de <i>Prunus persica</i>	4
B. Orígenes del melocotón en Guatemala	5
C. Situación del cultivo del melocotón en Guatemala	5
a. Área sembrada	5
b. Crecimiento del cultivo	6
c. Producción	6
d. Competencia	7
e. Situación de la demanda y la oferta nacional	7
i. Oferta	7
ii. Demanda	7
f. Precios	8
g. Costos de Producción	9
3.1.2 Cultivo de tejidos	11
A. Aplicaciones del cultivo de tejidos	11
B. Ventajas y desventajas de la micropropagación	11
C. Factores limitantes en el cultivo de tejidos	12
a. Planta que dona el explante	12
b. Contaminación	13
c. Oxidación del tejido (fenolización del tejido)	13
d. Estabilidad genética	16
e. Vitrificación	17
D. Métodos de micropropagación	17
a. Estímulo de yemas axilares	17
b. Organogénesis directa	18
c. Organogénesis indirecta	18
d. Embriogénesis somática	18
E. Fases del cultivo de tejidos vegetales	19
a. Establecimiento del cultivo aséptico	19
b. Multiplicación	19
c. Enraizamiento de los brotes y preparación para su trasplante	20
d. Trasplante	20
F. Medios de cultivo	21

a.	Componentes del medio de cultivo	21
i.	Sales inorgánicas	21
ii.	Vitaminas	21
iii.	Carbohidratos	22
iv.	Agua	22
v.	Antioxidantes	22
vi.	Agentes solidificantes	23
b.	Cualidades físicas del medio de cultivo	23
i.	pH del medio de cultivo	23
ii.	Cantidad de medio de cultivo	24
G.	Reguladores del crecimiento	24
a.	Auxinas	24
i.	Ruta de biosíntesis	26
ii.	Modo de acción	26
b.	Citoquininas	26
i.	Ruta de biosíntesis	28
ii.	Modo de acción	29
c.	Giberelinas	29
i.	Ruta de biosíntesis	30
ii.	Mecanismo de acción	30
H.	Algunos estudios realizados en cultivo de tejidos	30
a.	Estudios realizados en el género <i>Prunus</i> utilizando la técnica del cultivo " <i>in vitro</i> "	30
i.	Propagación " <i>in vitro</i> " de "Nemaguard", Portainjerto de melocotón	30
ii.	Método modificado para el cultivo " <i>in vitro</i> " del portainjerto de melocotón, "Nemaguard"	31
iii.	Propagación " <i>in vitro</i> " de melocotón, <i>Prunus persica</i> (L.) Batsch a partir de yemas axilares	31
iv.	Obtención de plantas libres de virus y propagación " <i>in vitro</i> " de melocotón (<i>Prunus persica</i> (L.) Batsch), cv. DIAMANTE	32
v.	Cultivo " <i>in vitro</i> " de embriones de melocotón	33
vi.	Micropropagación de materiales de frutales deciduos tratados con radiación	33
vii.	Enraizamiento " <i>in vitro</i> " del portainjerto Colt (Híbrido entre <i>Prunus avium</i> y <i>Prunus pseudocerasus</i>)	34
b.	Micropropagación de manzana (<i>Malus pumila</i> Mill.)	34
3.2	MARCO REFERENCIAL	36
3.2.1	Ubicación del área experimental	36
3.2.2	Injertación y portainjertos	36
3.2.3	Origen del portainjerto <i>Nemaguard</i>	36
4.	OBJETIVOS	38
5.	HIPOTESIS	39
6.	MATERIALES Y METODOS	40
6.1	Materiales	40
6.1.1	Reactivos	40
6.1.2	Cristalería y equipo	40

6.2 Métodos	40
6.2.1 Medios de cultivo	40
A. Preparación de las soluciones madre	40
a. Preparación de la solución madre de macronutrientes del medio basal de Linsmaier y Skoog (LS)	41
b. Preparación de la solución madre de micronutrientes del medio basal de Linsmaier y Skoog (LS)	41
c. Preparación de la solución madre de hierro a una concentración de 200X, para el medio basal de Linsmaier y Skoog (LS)	42
d. Preparación de la solución madre de vitaminas a una concentración de 1000X, para el medio basal de Linsmaier y Skoog (LS)	43
e. Preparación de la solución madre de myo inositol a una concentración de 1000X, para el medio basal de Linsmaier y Skoog (LS)	43
f. Preparación de las soluciones madre de reguladores del crecimiento	43
B. Preparación de los medios de cultivo	44
6.2.2 Fases de la investigación	45
A. Fase I, control de la oxidación	45
a. Material vegetal	45
i. Preparación del material vegetal para cultivo	46
i.1 Desinfección a nivel de campo y preservación del material	46
i.2 Desinfección de explantes a nivel de laboratorio	46
b. Inoculación de yemas axilares	47
c. Incubación de los tejidos	47
d. Descripción de los tratamientos	47
e. Descripción de la unidad experimental	48
f. Variables de respuesta	49
g. Análisis de los resultados	50
B. Fase II, multiplicación de brotes	50
a. Material vegetal	50
i. Preparación del material vegetal para cultivo	50
i.1 Desinfección a nivel de campo y preservación del material	50
i.2 Desinfección de explantes a nivel de laboratorio	51
b. Inoculación de yemas axilares	51
c. Incubación de los tejidos	52
d. Descripción de los tratamientos	52
e. Descripción de la unidad experimental	53
f. Variables de respuesta	54
g. Análisis de los resultados	55
C. Fase III, inducción de raíces en brotes	55
a. Materiales	55
b. Inoculación	55
c. Incubación de los tejidos	56
d. Descripción de los tratamientos	56
e. Descripción de la unidad experimental	56
f. Variables de respuesta	57
g. Análisis de los resultados	57

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	58
7.1 Fase de control de la oxidación	58
7.1.1 Control de la oxidación en el medio basal de Almehti y Parfitt (AP)	58
7.1.2 Control de la oxidación en el medio basal de Gamborg (B5)	59
7.1.3 Control de la oxidación en el medio basal de Linsmaier y Skoog (LS)	61
7.2 Fase de multiplicación de brotes	62
7.2.1 Comportamiento de los explantes en el medio nutritivo de Almehti y Parfitt	62
A. Porcentaje de sobrevivencia de los explantes ante diversos factores	62
B. Porcentaje de brotación de yemas en el medio nutritivo de Almehti y Parfitt	65
a. Brotación de yemas a los 15 días	65
b. Brotación de yemas a los 30 días	65
c. Brotación de yemas a los 45 días	66
d. Brotación de yemas a los 60 días	66
C. Número de brotes	68
a. Número de brotes a los 15 días	68
b. Número de brotes a los 30 días	69
c. Número de brotes a los 45 días	69
d. Número de brotes a los 60 días	70
e. Explantes vivos sin respuesta	71
7.2.2 Comportamiento de los explantes en el medio nutritivo de Gamborg	71
A. Porcentaje de sobrevivencia de los explantes a diversos factores	71
B. Porcentaje de brotación de yemas en el medio nutritivo de Gamborg	73
a. Brotación de yemas a los 15 días	73
b. Brotación de yemas a los 30 días	74
c. Brotación de yemas a los 45 días	74
d. Brotación de yemas a los 60 días	74
C. Número de brotes	75
a. Número de brotes a los 15 días	75
b. Número de brotes a los 30 días	76
c. Número de brotes a los 45 días	76
d. Número de brotes a los 60 días	77
e. Explantes vivos sin respuesta	78
7.2.3 Comportamiento de los explantes en el medio nutritivo de Linsmaier y Skoog	78
A. Porcentaje de sobrevivencia de los explantes a diversos factores	78
B. Porcentaje de brotación de yemas en el medio nutritivo de Linsmaier y Skoog	80
a. Brotación de yemas a los 15 días	80
b. Brotación de yemas a los 30 días	81
c. Brotación de yemas a los 45 días	81
d. Brotación de yemas a los 60 días	82
C. Número de brotes	83
a. Número de brotes a los 15 días	83
b. Número de brotes a los 30 días	83
c. Número de brotes a los 45 días	84
d. Número de brotes a los 60 días	84
e. Explantes vivos sin respuesta	85
7.3 Fase de inducción de raíces en brotes	86
8. CONCLUSIONES	89
9. RECOMENDACIONES	90

10. BIBLIOGRAFIA	91
11. APÉNDICE	95
11.1 Concentración de los componentes de cada medio basal de cultivo	95
11.2 Concentración de los componentes para preparar 0.7 litros de solución madre de macronutrientes, para los diferentes medios basales de cultivo	96
11.3 Concentración para preparar la solución madre de cloruro de calcio, para los diferentes medios basales de cultivo	96
11.4 Concentración de los componentes para preparar las soluciones madre de micronutrientes, para los diferentes medios basales de cultivo	96
11.5 Concentración para preparar las soluciones madre de yoduro de potasio, de los diferentes medios basales de cultivo	97
11.6 Concentraciones para preparar las soluciones de hierro, de los diferentes medios de cultivo	97
11.7 Concentraciones para preparar las soluciones madre de vitaminas, de los diferentes medios de cultivo	97
11.8 Concentración de otros componentes de los medios basales de cultivo	97

ÍNDICE DE CUADROS

CUADRO 1.	Distribución del área, en hectáreas, sembradas de melocotón en Guatemala, hasta octubre de 2001	6
CUADRO 2.	Oferta de melocotón en fresco en TM de 1996 a 2001	8
CUADRO 3.	Precio de la TM de melocotón, en quetzales puesto en el centro de acopio para el año 2001	9
CUADRO 4.	Costo estimado de producción por manzana (en Quetzales), temporada 2002 / 2003, para un cultivo semitecnificado de melocotón	10
CUADRO 5.	Características que presenta el portainjerto <i>Nemaguard</i>	37
CUADRO 6.	Componentes de la solución madre de macronutrientes del medio basal de Linsmaier y Skoog (LS), a una concentración de 20X	41
CUADRO 7.	Componentes de las soluciones madre de micronutrientes del medio basal de Linsmaier y Skoog (LS).....	42
CUADRO 8.	Descripción de los tratamientos a utilizar en la fase I (control de la oxidación), para el medio basal de Almehdi y Parfitt (AP)	48
CUADRO 9.	Descripción de los tratamientos a utilizar en la fase I (control de la oxidación), para el medio basal de Gamborg (B5)	49
CUADRO 10.	Descripción de los tratamientos a utilizar en la fase I (control de la oxidación), para el medio basal de Linsmaier y Skoog (LS)	49
CUADRO 11.	Descripción de los tratamientos a utilizar en la fase de multiplicación para el medio basal de Almehdi y Parfitt (AP)	53
CUADRO 12.	Descripción de los tratamientos a utilizar en la fase de multiplicación para el medio basal de Gamborg (B5)	54
CUADRO 13.	Descripción de los tratamientos a utilizar en la fase de multiplicación para el medio basal de Linsmaier y Skoog (LS).....	54
CUADRO 14.	Descripción de los tratamientos a utilizar en la fase de enraizamiento	56
CUADRO 15.	Comportamiento de los explantes del portainjerto <i>Nemaguard</i> , en la fase de control de la oxidación, en el medio basal de Almehdi y Parfitt (AP)	58
CUADRO 16.	Comportamiento de los explantes del portainjerto <i>Nemaguard</i> , en la fase de control de la oxidación, en el medio basal de Gamborg (B5).....	60

CUADRO 17.	Comportamiento de los explantes del portainjerto Nemaguard, en la fase de control de la oxidación, en el medio basal Linsmaier y Skoog (LS)	61
CUADRO 18.	Cuadro resumen de los mejores tratamientos de cada medio de cultivo para la fase de control de la oxidación	62
CUADRO 19.	Sobrevivencia de explantes del portainjerto Nemaguard, en la fase de multiplicación, en el medio basal de Almehdi y Parfitt (AP)	63
CUADRO 20.	Porcentaje de brotación de las yemas axilares del portainjerto Nemaguard, en el medio basal de Almehdi y Parfitt (AP)	66
CUADRO 21.	Número de brotes a los 15, 30, 45 y 60 días después de inoculados los explantes del portainjerto Nemaguard, en el medio basal de Almehdi y Parfitt (AP)	68
CUADRO 22.	Sobrevivencia de explantes del portainjerto Nemaguard en la fase de multiplicación, en el medio basal de Gamborg (B5)	72
CUADRO 23.	Porcentaje de brotación de las yemas axilares del portainjerto Nemaguard, en el medio basal de Gamborg (B5)	74
CUADRO 24.	Número de brotes a los 15, 30, 45 y 60 días después de inoculados los explantes del portainjerto Nemaguard, en el medio basal de Gamborg (B5)	76
CUADRO 25.	Sobrevivencia de los explantes del portainjerto Nemaguard, en la fase de multiplicación, en el medio basal de Linsmaier y Skoog (LS)	78
CUADRO 26.	Porcentaje de brotación de las yemas axilares del portainjerto Nemaguard, en el medio basal de Linsmaier y Skoog (LS)	81
CUADRO 27.	Número de brotes a los 15, 30, 45 y 60 días después de inoculados los explantes del portainjerto Nemaguard, en el medio basal de Linsmaier y Skoog (LS)	83
CUADRO 28.	Cuadro resumen de los mejores tratamientos en los diferentes medios de cultivo, en la fase de multiplicación de brotes	86
CUADRO 29.	Porcentaje de enraizamiento de brotes, en el medio de Gamborg (B5)	87
CUADRO 30A.	Concentración de los componentes de los diferentes medios basales de cultivo	95
CUADRO 31A.	Solución madre de macronutrientes a una concentración de 20X, para los diferentes medios basales de cultivo	96
CUADRO 32A.	Solución madre de cloruro de calcio, para los diferentes medios basales de cultivo	96
CUADRO 33A.	Solución madre de micronutrientes, para los diferentes medios basales de cultivo	96

CUADRO 34A.	Solución madre de yoduro de potasio a una concentración de 1,000X, para los diferentes medios basales de cultivo	97
CUADRO 35A.	Solución madre de hierro a una concentración de 200X, para los diferentes medios basales de cultivo	97
CUADRO 36A.	Solución madre de vitaminas a una concentración de 1,000X, para los diferentes medios basales de cultivo	97
CUADRO 37A.	Otros componentes de los diferentes medios basales de cultivo	97

INDICE DE FIGURAS

FIGURA 1.	Efecto de antioxidantes en el control de la oxidación, en el medio de Almehdi y Parfitt (AP)	59
FIGURA 2.	Efecto de antioxidantes en el control de la oxidación, en el medio de Gamborg (B5)	60
FIGURA 3.	Efecto de antioxidantes en el control de la oxidación, en el medio de Linsmaier y Skoog (B5)	61
FIGURA 4.	Explante que presentó sobrevivencia en el medio de Almehdi y Parfitt (AP)	63
FIGURA 5.	Sobrevivencia de los explantes a los 30 días, en la fase de multiplicación de brotes, en el medio basal de Almehdi y Parfitt	64
FIGURA 6.	Efecto de la concentración de Bencilaminopurina (BAP) y Ácido Indolbutírico, en el porcentaje de brotación de yemas a los 60 días, en el medio basal de Almehdi y Parfitt (AP)	67
FIGURA 7.	Fotografía que muestra la formación de brotes, en el medio basal de Almehdi y Parfitt	68
FIGURA 8.	Efecto de la concentración de Bencilaminopurina (BAP) y Ácido Indolbutírico (IBA), En la formación de brotes a los 45 días, en el medio basal de Almehdi y Parfitt (AP)	70
FIGURA 9.	Sobrevivencia de los explantes a los 30 días, en la fase de multiplicación de brotes, en el medio basal de Gamborg (B5)	73

FIGURA 10.	Efecto de la concentración de Bencilaminopurina (BAP) y Ácido Indolbutírico, en el porcentaje de brotación de yemas a los 60 días, en el medio basal de Gamborg (B5)	75
FIGURA 11.	Efecto de la concentración de Bencilaminopurina (BAP) y Ácido Indolbutírico (IBA), En la formación de brotes a los 45 días, en el medio basal de Gamborg (B5)	77
FIGURA 12.	Sobrevivencia de los explantes en la fase de multiplicación de brotes a los 30 días, el medio basal de Linsmaier y Skoog (LS)	80
FIGURA 13.	Efecto de la concentración de Bencilaminopurina (BAP) y Ácido Indolbutírico, en el porcentaje de brotación de yemas a los 60 días, en el medio basal de Linsmaier y Skoog (LS)	82
FIGURA 14.	Efecto de la concentración de Bencilaminopurina (BAP) y Ácido Indolbutírico (IBA), En la formación de brotes a los 45 días, en el medio basal de Linsmaier y Skoog (LS)	85

GLOSARIO DE ABREVIATURAS

AC	Ácido cítrico
ANAPDE	Asociación Nacional de Productores de Deciduos
AP	medio basal de Almehdi y Parfitt
B5	medio basal de Gamborg
BA	6-Benciladenina
BAP	6-Bencilaminopurina
°C	grados Centígrados
CA	Carbón activado
cm	centímetro
cv	cultivar
CaCl ₂ . 2H ₂ O	Cloruro de calcio dihidratado
CoCl ₂ . 6H ₂ O	Cloruro de cobalto hexahidratado
CuSO ₄ . 5H ₂ O	Sulfato de cobre pentahidratado
FeSO ₄ . 7H ₂ O	Sulfato de hierro heptahidratado
GA ₃	Ácido giberélico
g	gramo
HCl	Ácido clorhídrico
H ₃ BO ₃	Ácido bórico
IAA	Ácido indolacético
IBA	Ácido indolbutírico
ICTA	Instituto de Ciencia y Tecnología Agrícolas
Kg	Kilogramo
KH ₂ PO ₄	Dihidrogenofosfato de potasio
KI	Yoduro de potasio
KNO ₃	Nitrato de potasio
KOH	Hidróxido de potasio
l	litro
LS	medio basal de Linsmaier y Skoog
m	metro
mg	miligramo
ml	mililitro
MgSO ₄ . 7H ₂ O	Sulfato de magnesio
mm	milímetro
MnSO ₄ . 7H ₂ O	Sulfato de manganeso
MS	medio basal de Murashige y Skoog
msnm	metros sobre el nivel del mar
N	Normal
NAA ó ANA	Ácido naftalenacético
Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ O	Molibdato de sodio dihidratado
NaH ₂ PO ₄ . H ₂ O	Dihidrogenofosfato de sodio monohidratado
NaOH	Hidróxido de sodio
NH ₄ NO ₃	Nitrato de amonio
(NH ₄) ₂ SO ₄	Sulfato de amonio
Q	quetzales
pH	potencial de hidrógeno

ppm	Partes por millón
Profruta	Proyecto de Desarrollo de la Fruticultura y Agroindustria
PVP	Polyvinylpyrrolidone
TM	Tonelada métrica
U.S.D.A.	United States Department of Agriculture
var	variedad
v/v	volumen sobre volumen
ZnSO ₄ . 7H ₂ O	Sulfato de cinc heptahidratado

PROPIEDAD DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
Biblioteca Central

**EVALUACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO, ANTIOXIDANTES Y REGULADORES DE
CRECIMIENTO EN LA MICROPROPAGACIÓN DEL PORTAINJERTO
NEMAGUARD (*Prunus spp.*)**

**EVALUATION OF MEDIUMS OF CULTIVATION, ANTIOXIDANTS AND REGULATORS OF
GROWTH IN THE MICROPROPAGATION OF ROOTSTOCK NEMAGUARD (*Prunus spp.*)**

RESUMEN

El melocotón (*Prunus persica*), es una especie caducifolia de clima templado, de la familia de las rosáceas. A nivel mundial el tercer lugar en importancia después de la manzana (*Malus pumila* Mill.) y la pera (*Pyrus comunis*). Guatemala es el único país de Centro América y el Caribe que produce melocotón a nivel comercial, esto se debe principalmente, a que cuenta con una diversidad de condiciones climáticas, en especial por las diferentes altitudes que tiene el país, lo que hace que el mercado potencial para el melocotón producido en Guatemala, sean dichos países.

El portainjerto *Nemaguard*, es mundialmente reconocido por sus características de resistencia a nematodos y vigorosidad entre otras; y en Guatemala, específicamente en el municipio de San Bartolomé Milpas Altas, se cuenta con una cantidad limitada de árboles de este portainjerto, por lo que la técnica del cultivo de tejidos vegetales sería una buena opción para propagar de forma masiva en el menor tiempo y espacio posible dicho material. Por lo que se hace necesario una exploración de la respuesta de yemas axilares del citado portainjerto, a diferentes medios de cultivo, antioxidantes y combinaciones de reguladores del crecimiento.

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 cual se encuentra equipado con una fuente de luz proporcionada por lámparas fluorescentes de luz blanca de 1,000 a 3,000 lux de intensidad; La temperatura media del cuarto es de 25 °C; con un fotoperíodo programado de 16 horas de luz y 8 de oscuridad.

La investigación se dividió en tres fases, las cuales fueron: Fase I, denominada Control de la Oxidación en ésta se evaluaron tres antioxidantes que fueron: Ácido Cítrico (AC), Carbón Activado (CA) y Polivinilpirrolidona (PVP) con tres dosis cada uno; en tres medios de cultivo, que fueron: Almehdi y Parfitt (AP), Gamborg (B5) y Linsmaier y Skoog (LS), de lo cual se obtuvo que el antioxidante que controló en

mayor grado la oxidación fue el polivinilpirrolidona en la dosis de 900 mg/l en los tres medios de cultivo, para el caso de los medios de Almehti y Parfitt y de Gamborg la controló en un 100% y en el medio de Linsmaier y Skoog en un 60 %. Fase II, Multiplicación de Brotes, la cual consistió en la evaluación de diferentes combinaciones de Ácido Indolbutírico (IBA) con tres dosis y Bencilaminopurina (BAP) con cuatro dosis, en los mismos medios de cultivo utilizados en la fase anterior, de lo cual se obtuvo: un 90% de brotación de las yemas axilares en el medio basal de Almehti y Parfitt en la combinación de 2.0 mg/l de BAP + 0.1 mg/l de IBA, en el medio basal de Gamborg se obtuvo un 100% de brotación en la combinación de 2.0 mg/l de BAP + 1.5 mg/l de IBA y en el medio basal de Linsmaier y Skoog con un 80% de brotación en la combinación de 2.0 mg/l de BAP + 0.1 mg/l de IBA; en cuanto a la variable número de brotes se obtuvo: para el medio basal de Almehti y Parfitt la combinación de reguladores que produjo el mayor número de brotes fue la de 2.0 mg/l de BAP + 0.1 mg/l de IBA con 19 brotes en 9 explantes vivos, en el medio basal de Gamborg la combinación de 2.0 mg/l de BAP + 0.1 mg/l de IBA con 14 brotes en 9 explantes vivos y en el medio basal de Linsmaier y Skoog la combinación de 4.0 mg/l de BAP + 0.1 mg/l de IBA con un total de 9 brotes en 5 explantes vivos. Y la Fase III, Enraizamiento de Brotes, en la cual se utilizaron brotes obtenidos en la fase anterior y se evaluaron diferentes concentraciones del Medio Basal de Gamborg (B5) y tres dosis de Ácido Indolbutírico (IBA), pero los resultados en esta fase no fueron muy satisfactorios ya que únicamente se logró enraizar un brote y esto fue en el tratamiento 75% de sales del medio de Gamborg y 0.5 mg/l de IBA.

1. INTRODUCCION

El melocotón (*Prunus persica* (L.) Batsch) pertenece a la familia de las rosáceas, es un frutal de clima templado. A nivel mundial ocupa el tercer lugar en importancia después de la manzana (*Malus pumila* Mill.) y la pera (*Pyrus comunis*) (24).

Guatemala es el único país de Centro América y el Caribe que produce melocotón a nivel comercial, esto se debe principalmente, a que cuenta con una diversidad de condiciones climáticas, en especial por las diferentes altitudes que tiene el país (siendo el rango óptimo de altitud para el melocotón de 1,800 a 2,200 msnm) (31).

En Guatemala hasta el año 2001, había 1,080 hectáreas cultivadas con melocotón, distribuidas en trece departamentos del país, concentrándose la mayor cantidad en la zona del altiplano central y occidental; con un incremento de 416 hectáreas del año 1994 al año 2001. La producción nacional hasta el año 2001 se estima en 4,608 TM, observándose un incremento de 1,655 TM del año 1996 al año 2001, la cual ha aumentado año con año; con un rendimiento promedio nacional de 9 TM por hectárea. El potencial mercado del melocotón producido en Guatemala es: Centro América, el Caribe y la parte sudoeste de México (31).

Actualmente en Guatemala se importa fruta procedente de Estados Unidos y Chile y en menor escala u ocasionalmente de México y Francia. En los últimos años la importación ha ido en aumento, lo que indica que hay una mayor demanda de esta fruta (31).

Los portainjertos de melocotón en Guatemala, generalmente son obtenidos a partir de semillas de melocotones criollos y sobre éstos se injertan las variedades productoras. En el mundo los portainjertos más usados son: del grupo GF en Europa, Halford, Nemaguard, Lovell e Indian Peach en EE.UU (9). En muchas comunidades del área rural guatemalteca, donde se produce melocotón es muy difícil que los productores tengan acceso a portainjertos tan especializados, como los mencionados anteriormente, los cuales podrían contribuir a mejorar el rendimiento y la calidad de su producción. En esta investigación se utilizó el portainjerto Nemaguard, ya que en el municipio de San Bartolomé Milpas Altas se cuenta con unos pocos árboles del mismo, por lo tanto se trata de reproducirlos para aprovechar este material (de los demás portainjertos mencionados no se tiene material y el costo de importar un árbol de estos es muy elevado).

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. Lo que se pretendió con esta investigación, fue observar el comportamiento del portainjerto Nemaguard, a la propagación vegetativa *in vitro*; para lo cual se realizaron tres fases: a) La primera fase consistió en la evaluación de tres antioxidantes que fueron: Carbón Activado (CA), Ácido Cítrico (AC) y Polivinilpirrolidona (PVP), en tres medios de cultivo que fueron: Almehdí y Parfitt (AP), Gamborg (B5) y Linsmaier y Skoog (LS), con lo cual se buscaba contrarrestar la oxidación de los explantes para así permitir una mayor sobrevivencia de los mismos, de lo cual se obtuvo que el antioxidante que controló en mayor grado la oxidación fue el polivinilpirrolidona en la dosis de 900 mg/l en los tres medios de cultivo, para el caso de los medios de Almehdí y Parfitt y de Gamborg la controló en un 100% y en el medio LS en un 60 %; b) La segunda fase consistió en la evaluación de diferentes combinaciones de Ácido Indolbutírico (IBA) y Bencilaminopurina (BAP) en los tres medios de cultivo utilizados en la primera fase, el fin de ésta fue observar el comportamiento de la brotación de los explantes en los medios de cultivo y combinaciones de reguladores del crecimiento, de lo cual se obtuvo: un 90% de brotación de las yemas axilares en el medio basal de Almehdí y Parfitt en la combinación de 2.0 mg/l de BAP + 0.1 mg/l de IBA, en el medio basal de Gamborg se obtuvo un 100% de brotación en la combinación de 2.0 mg/l de BAP + 1.5 mg/l de IBA y en el medio basal de Linsmaier y Skoog con un 80% de brotación en la combinación de 2.0 mg/l de BAP + 0.1 mg/l de IBA; en cuanto a la variable número de brotes se obtuvo: para el medio basal de Almehdí y Parfitt la combinación de reguladores que produjo el mayor número de brotes fue la de 2.0 mg/l de BAP + 0.1 mg/l de IBA con 19 brotes en 9 explantes vivos, en el medio basal de Gamborg la combinación de 2.0 mg/l de BAP + 0.1 mg/l de IBA con 14 brotes en 9 explantes vivos y en el medio basal de Linsmaier y Skoog la combinación de 4.0 mg/l de BAP + 0.1 mg/l de IBA con un total de 9 brotes en 5 explantes vivos; y c) En la tercera fase se evaluó la inducción de raíces de brotes obtenidos en la segunda fase, para lo cual se utilizó una auxina que fue el Ácido Indolbutírico (IBA) a diferentes dosis, en el medio de cultivo de Gamborg (B5), pero los resultados en esta fase no fueron muy satisfactorios ya que solamente se logró enraizar un brote y esto fue en el tratamiento 75% de sales del medio basal de Gamborg y 0.5 mg/l de IBA.

2. DEFINICIÓN DEL PROBLEMA

La homogeneidad en cuanto a vigor, longevidad, rendimiento, época de floración y resistencia a plagas y enfermedades en una plantación de melocotón depende de algunos factores fundamentales entre los que se puede mencionar el portainjerto sobre el que se asiente la plantación.

En algunas zonas del país se han introducido algunos ejemplares de portainjertos, mundialmente reconocidos como excelentes portadores de características genéticas que aseguran una homogeneidad de la producción en cuanto a época, cantidad y calidad del producto. Sin embargo, dado al poco material con que se cuenta y a la reproducción de los mismos, que se realiza por medio de semillas, no ha permitido diseminar portainjertos con las características básicas de la planta madre, que son: longevidad, vigor y resistencia a plagas y enfermedades entre otras, lo cual a la postre, no ha permitido mejorar significativamente el rendimiento y la calidad de la producción, en las zonas productoras, donde se han hecho las introducciones del material original.

Cada día los mercados se vuelven más exigentes en cuanto a la calidad del producto, lo que hace pensar a los productores y profesionales en revisar las técnicas del cultivo, por lo tanto una de estas sería la propagación vegetativa "*in vitro*" la cual constituye una técnica que permite asegurar la transmisión de las características genéticas de una planta madre a sus descendientes, en el menor tiempo y espacio posible. Esta técnica consiste esencialmente en el aislamiento de un explante (parte separada de un vegetal, ya sea: protoplasto, célula, tejido, órgano, etc), que se cultiva asépticamente en un medio de composición química definida y se incuba en condiciones ambientales controladas para que las células expresen su potencial intrínseco o inducido.

Dado a que la propagación vegetativa "*in vitro*" exige distintos procedimientos y condiciones según el material que se desea propagar, es necesario explorar los procedimientos y condiciones óptimas para la propagación del portainjerto *Nemaguard*. Para el efecto se exploró la respuesta de yemas axilares del citado portainjerto, a diferentes medios de cultivo, antioxidantes y combinaciones hormonales.

3. MARCO TEORICO

3.1 MARCO CONCEPTUAL

3.1.1 Generalidades del cultivo del melocotón

El melocotón fue domesticado inicialmente en China hacia el año 4000 a. J. C. Fue introducido a Europa durante la era del Imperio Romano y al continente Americano con la llegada de Colón y a Guatemala en particular con la consecuente conquista española (9).

A. Aspectos botánicos

a. Clasificación botánica

Taxonómicamente el melocotón se clasifica de la siguiente manera:

▪ Reino	Plantae
▪ Subreino	Embryobionta
▪ División	Magnoliophyta
▪ Clase	Magnoliopsida
▪ Subclase	Rosidae
▪ Orden	Rosales
▪ Familia	Rosaceae
▪ Género	Prunus
▪ Especie	<i>Prunus persica</i> (L) Batsch
▪ Nombre común	(melocotón o durazno)

b. Descripción botánica de *Prunus persica*

Físicamente el melocotonero es un pequeño árbol caducifolio que puede alcanzar aproximadamente 6 m de altura, aunque a veces no pasa de talla arbustiva. Su corteza es lisa y cenicienta y se desprende en láminas. Posee ramillas lisas, lampiñas, de color verde en el lado expuesto al sol (9).

Las hojas del melocotonero son simples, lanceoladas, de 7.5 a 15 cm de longitud y 2 a 3.5 cm de ancho, largamente acuminadas, con el margen finamente aserrado, de color verde brillante, lampiñas por ambas caras y con peciolo de 1 a 1.5 cm de longitud, con 2 a 4 glándulas cerca del limbo (9).

Las flores, simples, perfectas, completas, por lo general se encuentran solitarias, a veces en parejas, casi sentadas, de color rosa a rojo y 2 a 3.5 cm de diámetro, aparecen en el árbol antes que las hojas (9).

El fruto corresponde a una drupa, es globoso y alcanza unos 5 a 7.5 cm de diámetro. Su piel es amarillenta con tonalidades rojizas en la parte expuesta al sol y un surco longitudinal más o menos marcado. Posee hueso ahoyado, muy duro y con surcos sinuosos (9).

Las yemas laterales se encuentran asociadas generalmente en grupos de tres: una vegetativa central rodeada de dos florales simples. La yema terminal es siempre vegetativa. Las yemas florales se ubican en forma lateral sobre ramillas. Empiezan a hincharse a mediados del invierno, y lo hacen hasta fines de invierno y durante la primavera, momento en el que florecen. Esta etapa es muy delicada pues es fuertemente afectada por lluvias, heladas y otras condiciones atmosféricas desfavorables. Los frutos cuajan y se van formando hasta la madurez, la cual ocurre entre diciembre en las variedades más tempranas y marzo las tardías (9).

B. Orígenes del melocotón en Guatemala

En la época colonial, los religiosos iniciaron el proceso de introducción de especies vegetativas procedentes de España. Dentro de las cuales se cree que vinieron algunos tipos de melocotón. Éstos iniciaron un proceso de adaptación en la nueva región, muchos murieron y otros que sobrevivieron fueron los orígenes de los que aún se encuentran diseminados en todo el altiplano guatemalteco y que hoy conocemos como melocotones criollos (31).

C. Situación del cultivo del melocotón en Guatemala

a. Área sembrada

En Guatemala, 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 los departamentos de Quetzaltenango con 400 hectáreas y Chimaltenango con 206 hectáreas, ver cuadro 1 (31).

Cuadro 1. Distribución del área (en hectáreas), sembrada de melocotón en Guatemala, hasta octubre de 2001

DEPARTAMENTO	HECTAREAS
Quetzaltenango	400
Chimaltenango	206
Jalapa	136
San Marcos	78
Sacatepéquez	70
Quiché	50
Huehuetenango	43
Totonicapán	42
Guatemala	23
Sololá	19
El progreso	8
Chiquimula	3
Jutiapa	2
TOTAL	1,080

Fuente: Ruano (31)

b. Crecimiento del cultivo

El cultivo del melocotón en Guatemala creció 416 hectáreas (de 420 a 836 hectáreas) de los años 1994 a 2001. Aunque la tendencia de crecimiento del cultivo es a aumentar, 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 (31).

c. Producción

Para el año 2001 se estimó una producción de 4,608 toneladas métricas (TM), producto de 512 hectáreas en edad productiva, y un rendimiento promedio nacional de 9 TM por hectárea (31).

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 a nuestro historial de comercialización desde hace más de dos décadas se ha venido exportando melocotones hacia Centroamérica y surtiendo el mercado nacional, no obstante cada día los mercados se vuelven más exigentes en cuanto a 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 (38).

d. Competencia

En el mundo los países productores de melocotones se encuentran en las regiones del sur y del norte, los cuales están a grandes distancias de nuestro país. Debido a ello la comercialización debe realizarse en forma marítima, lo que hace que el producto tarde más de 20 días en llegar al país e iniciar el proceso de distribución hasta el consumidor final y en muchos de los casos, no llega con la calidad adecuada para la venta (31).

Actualmente a Guatemala llega fruta procedente de Estados Unidos y Chile; y en menor escala u ocasionalmente de México y Francia. En los años de 1994 al año 2001, la importación fue en aumento, lo que indica que hay un mayor consumo de esta fruta. El total de melocotón que ingresó al país en el año 2000 fue de 963,479 kilos (31).

e. Situación de la demanda y la oferta nacional

i. Oferta

La producción nacional hasta el año 2001 se estimó en 4,608 TM, lo que representa un incremento de 1,655 TM del año 1996 al año 2001, la cual ha aumentado año con año. 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 (31).

En la actualidad se ha determinado que se ofrece melocotón en el mercado nacional desde el mes de febrero hasta principios de octubre, pero la mayor producción se concentra en los meses de julio a septiembre(31).

ii. Demanda

Guatemala es el único país de Centro América y el Caribe que produce melocotón a nivel comercial, debido, principalmente, a las condiciones climáticas con que dispone, dadas, en especial por las diferentes

altitudes que tiene el país. Esta ventaja natural con que dispone Guatemala, hace que toda esta región se convierta en el mercado potencial para los productores de melocotón del país (31).

Adicionalmente hay que remarcar que la parte sudoeste de México, que comprende los estados de Chiapas, Campeche y Tabasco demandan también fruta decidua de Guatemala, ya que las zonas productoras de Guatemala están a tan sólo 100 kilómetros de la frontera (31).

El consumo per cápita de melocotones en el ámbito de Guatemala, se ve incrementado año con año, así para 1996 la producción nacional fue de 2,736 TM y las importaciones de 396 TM, para el año 2000 la producción nacional fue de 3,986 TM y las importaciones subieron a 963 TM, también las exportaciones han ido en aumento, en 1996 se exportaron 276 TM y en el año 2000 se exportaron 460 TM, ver cuadro 2, lo que indica que este tipo de fruta está siendo demandada tanto a nivel nacional como de Centro América (38).

Cuadro 2. Oferta de melocotón en fresco en TM de 1996 a 2001

Año	Producción nacional	Exportaciones	Importaciones	Oferta 1/
1996	2,736	276	396	2,856
1997	2,953	461	1,008	3,500
1998	3,460	102	741	4,099
1999	3,570	289	1,245	4,526
2000	3,986	390	963	4,559

Fuente: Banguat, Profruta

1/ oferta igual producción nacional menos exportaciones más importaciones

f. 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 intervención de los intermediarios (38).

Los precios de la fruta dependen de la categoría a la que pertenece y éstos alcanzan desde Q 4,400.00 hasta Q13,200.00 la TM. La norma establecida clasifica la fruta en: extra, grande, primera, segunda, tercera, y pepita. Ver cuadro 3 (31).

Cuadro 3. Precio de la TM de melocotón, en quetzales puesto en el centro de acopio para el año 2001.

CATEGORIA	PRECIO Q/TM
Extra	Q 13,200.00
Grande	Q 9,900.00
Primera	Q 7,700.00
Segunda	Q 5,500.00
Tercera	Q 3,300.00
Pepita	Q 2,200.00

Fuente: Ruano (31)

En Guatemala los precios que alcanza el melocotón nacional oscilan entre Q 13.20 y Q 24.20 el kilogramo, mientras que el melocotón importado maneja precios entre Q 12.10 y 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 supermercados, de un melocotón grande, están 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 (31).

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 la ampliación de mercados a través de implementación de estrategias de mercado (31).

g. Costos de Producción

Los costos de producción para cada productor pueden variar dependiendo del grado de tecnología aplicado, la extensión del área cultivada y la ubicación geográfica de la plantación. Para el caso de un cultivo Semitecnificado de melocotón para la temporada 2002 a 2003, el costo total de producción por manzana, se estimó en Q 12,203.22 para una producción de 95 quintales por manzana. Estimando un costo unitario de Q 128.45 por quintal de melocotón.

Esto hace que el cultivo del melocotón sea bastante atractivo para muchos productores, ya que el costo para producir un quintal es de Q128.45, mientras que los precios a la venta de un quintal, pueden varían entre Q 200.00 y Q 600.00 dependiendo de la calidad del producto. En el cuadro 4 se presentan los costos de producción para un cultivo semitecnificado de melocotón.

Cuadro 4. Costo estimado de producción por manzana (en Quetzales), temporada 2002 / 2003, para un cultivo semitecnificado de melocotón.

CONCEPTO	UNIDAD DE MEDIDA	CANTIDAD	PRECIO UNITARIO	TOTAL
I. COSTO DIRECTO				9,573.05
1 RENTA DE LA TIERRA				350.00
2 COSTO DE ESTABLECIMIENTO 1/				335.48
3 MANO DE OBRA				6,902.13
a) Limpias y plateos	Jornal	25.00	37.28	932.00
b) Podas	Jornal	22.00	37.28	820.16
c) Fertilización	Jornal	12.00	37.28	447.36
d) Control fitosanitario	Jornal	8.00	37.28	298.24
e) Aplicación de broza	Jornal	8.00	37.28	298.24
f) Cosecha	Jornal	75.00	37.28	2,796.00
g) Clasificación	Jornal	12.00	37.28	447.36
h) Séptimos días				862.77
4 DEPRECIACIÓN MAQUINARIA Y EQUIPO 2/				648.35
a) Asperjadora mecánica	Hr. Bomba	20.00	8.88	177.57
b) Camión	Hora	6.00	78.46	470.77
5 INSUMOS				1,337.09
a) Combustibles y lubricantes	Galón	8.00	15.65	125.21
b) Fertilizantes				
- Nitrogenados	Quintal	2.50	79.66	199.15
- Completos	Quintal	5.50	92.00	506.00
c) Insecticidas				
- Contacto	Litro	1.20	60.00	72.00
- Sistémicos	Litro	1.50	25.00	37.50
d) Funguicidas sistémicos	Libra	3.40	34.39	116.93
e) Broza	Quintal	8.00	35.04	280.29
II. COSTO INDIRECTO				2,630.18
1 Administración (5 % s/C.D.)				478.65
2 Cuota del I.G.S.S. (6 % s/M.O.)				414.13
3 Financieros (17% s/C.D. 12 M.)				1,627.42
4 Imprevistos (1 % s/C.D.)				95.73
5 Impuesto municipal (Q.0.15/quintal)				14.25
III. COSTO TOTAL POR MANZANA (Para una producción de 95 quintales)				12,203.22
IV. COSTO UNITARIO				128.45

Fuente: Banguat, Departamento de Estadísticas Económicas, Sección de Cuentas Nacionales.

1/ Se estima que la plantación tiene una vida útil de 15 años, por lo que cada año se carga 1/15 de ese costo.

2/ Se refiere al coeficiente de depreciación del equipo por cada hora de uso.

3.1.2 Cultivo de tejidos

El cultivo de tejidos consiste esencialmente en el aislamiento de un explante (parte separada de un vegetal: protoplasto, célula, tejido, órgano, etc.), que se cultiva asépticamente en un medio de composición química definida y se incuba en condiciones ambientales controladas para que las células expresen su potencial intrínseco o inducido. La interacción de los distintos factores que intervienen en el cultivo de tejidos (explante, normas de asepsia, medios de cultivo y condiciones ambientales), determinará las respuestas que se obtengan "*in vitro*" (21, 22).

El origen del cultivo de tejidos se da, con el intento de Haberlandt (1902), de cultivar células aisladas de plantas, postulando así el principio de la totipotencia vegetal (que es la capacidad o el potencial que tiene una célula no embrionaria de diferenciarse en una célula embrionaria y después desarrollar y convertirse en una planta nueva y completa si las condiciones ambientales son favorables), que es la base teórica sobre la que se sustentan todas las técnicas del cultivo "*in vitro*" (5).

A. Aplicaciones del cultivo de tejidos

Las aplicaciones del cultivo de tejidos son numerosas y diferentes, las posibilidades en agricultura podrían resumirse en los siguientes aspectos: propagación masiva de plantas (micropropagación), obtención de plantas libres de patógenos, mejoramiento genético de los cultivos, conservación e intercambio de germoplasma y la producción de metabolitos secundarios. (16, 29, 40)

Según Vázquez, Carrillo y Mejía, (41), en Guatemala cuyo sustento económico es la actividad agrícola, es de esperarse que la biotecnología alcance una gran aplicación, sustentado principalmente en el mejoramiento genético de cultivos de exportación, basándose principalmente en las técnicas más sencillas y de menores volúmenes de inversión como el cultivo "*in vitro*" de puntas meristemáticas, yemas axilares y hojas.

B. Ventajas y desventajas de la micropropagación

En la actualidad, la micropropagación se practica con éxito en especies hortícolas (Murashige, 1978), ornamentales (Hughes, 1981) y más recientemente en especies leñosas (Torpe, 1983). En algunas especies,

esta metodología ha mostrado importantes ventajas en comparación con los sistemas convencionales de propagación, las más importantes son:

- a) Incremento acelerado del número de plantas derivadas por genotipo
- b) Reducción del tiempo de multiplicación
- c) Posibilidad de multiplicar grandes cantidades de plantas en una superficie reducida, a bajos costos y en tiempos económicamente costeables
- d) Mayor control sobre la sanidad del material que se propaga
- e) Facilidad para transportar el material "*in vitro*" de un país a otro con menos restricciones aduaneras
- f) Posibilidad de multiplicar rápidamente una variedad de la cual sólo existen pocos individuos
- g) Se puede propagar en cualquier época del año y/o medio ambiente (externo al laboratorio)
- h) Permite planificar la producción de acuerdo con la demanda (22, 29, 37, 40)

Según Vázquez, Carrillo y Mejía (41), las desventajas de la micropropagación son las siguientes:

- a) No todas las especies vegetales pueden propagarse por este método
- b) Las plantas obtenidas por esta técnica tienen una estrecha base genética, por lo que si son atacadas por alguna plaga o enfermedad, pueden ser afectadas todas ellas
- c) La inestabilidad genética que se obtiene donde se han utilizado altas concentraciones de hormonas.

C. Factores limitantes en el cultivo de tejidos

a. Planta que dona el explante

Según Roca (29), el estado fisiológico de la planta que dona el explante (planta madre), influye significativamente en su capacidad morfogénica. Se ha encontrado, que los requerimientos nutricionales y hormonales difieren cuando los tejidos provienen de plantas en diferentes edades fisiológicas. Además, se ha observado que la edad fisiológica del explante tiene gran influencia en la morfogénesis. Se sabe que mientras más joven y menos diferenciado esté el tejido (explante) que se va a sembrar, mejor será la respuesta "*in vitro*". A este respecto, los meristemas apicales y axilares han sido empleados con éxito en una amplia gama de especies (29).

La posición relativa de las yemas es otro factor importante. Se ha observado que yemas axilares de rosa, obtenidas de la parte media del tallo, se desarrollan más rápidamente que aquellas obtenidas de la base o la porción apical (29).

b. Contaminación

Un continuo problema en las plantas con crecimiento leñoso 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), continúa siendo un verdadero problema. Quizá la parte más importante es el hecho de que en estas plantas la contaminación por bacterias pasa inadvertida la mayor parte del tiempo hasta las fases finales del cultivo (7, 10, 27).

Dado que la desinfección o esterilización del tejido influye no sólo en la contaminación o no del mismo, sino que también, en su capacidad de regenerarse en el medio de cultivo. La técnica de desinfección utilizada debe de estar orientada a lograr un mínimo de contaminación y oxidación prematura del explante por efectos de plasmólisis (29).

La superficie del material vegetal, puede ser desinfectada mediante diferentes soluciones tales como: alcohol etílico al 70%, hipoclorito de sodio entre el 1% y el 5%, hipoclorito de calcio a una concentración entre 3.6% y 7.1%, etc. Muchas veces resulta de gran utilidad la aplicación de un agente tensoactivo, que disminuya la tensión superficial del agua y permita una mayor penetración del agente desinfectante, como por ejemplo Tween 20 a razón de 4 a 10 gotas por litro (35, 40).

c. Oxidación del tejido (fenolización del tejido)

Vuyksteke (43), 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, luego son atrapados por el agar y acumulados, formando un área negra alrededor del explante. Ésta puede interferir con la absorción de nutrientes, resultando una inhibición del crecimiento.

Bidwell (3), menciona que al herir o romper los tejidos, se estimula mucho la respiración por tres razones:

- i) La rápida oxidación de los compuestos fenólicos, que tiene lugar cuando la organización que mantiene a estos sustratos separados de sus oxidasas se rompe
- ii) Los procesos normales de glicólisis o catabolismo oxidativo, que aumentan conforme la disrupción de la célula o células, causan una mayor accesibilidad de los sustratos a la maquinaria enzimática de la respiración
- iii) 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.

En la actividad metabólica de respiración se libera energía para las actividades de la planta mediante la oxidación de algunos compuestos de carbono; y la síntesis de varios tipos, tales como la producción de alimentos complejos a partir de azúcares simples, o la síntesis de otras sustancias y del protoplasma mismo.

Se conocen varias enzimas que oxidan 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 quinonas. El color café en la herida (por ejemplo, cuando a un tubérculo de papa, o, a 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 el sustrato (los cuales parecen ser solubles), deben haber estado apartados uno del otro en la célula normal, aprisionados en diferentes compartimentos celulares (3).

Las labores siguientes son necesarias para mantener vivo el material en el cultivo (43):

- i) Pretratamiento de los explantes con un antioxidante por inmersión en una solución estéril de cisteína, ácido ascórbico o ácido cítrico (solos o en combinación), antes de la inoculación en el medio.
- ii) Incluir antioxidantes en el medio de cultivo. La adición de carbón activado tiene también el propósito de prevenir el ennegrecimiento.

- iii) Transferir frecuentemente los cultivos a un medio fresco. Cuando el ennegrecimiento es severo, el cultivo podría ser transferido semanalmente, si éste, 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 citocinina son aumentados para estimular la proliferación del brote.

i. Las causas de oscurecimiento

El ennegrecimiento del tejido ocurre a través de la acción de las enzimas oxidasas del contenido de cobre (Catecol oxidasa), con frecuencia llamadas polifenol oxidasas, fenolasa y tirosinasa (monofenol oxidasa), las cuales son liberadas, sintetizadas o presentadas con sustratos apropiados y condiciones oxidativas cuando los tejidos son cortados. Los sustratos para estas enzimas, los que varían en diferentes tejidos son comúnmente tirosina u o-hidroxifenoles tales como ácido clorogénico. Las enzimas, normalmente latentes en las membranas de la célula y sustratos retenidos dentro de las vacuolas de la célula, vienen juntas cuando las células son lastimadas o se vuelven moribundas (12).

La característica del oscurecimiento (usualmente café o negro) producida por las plantas, casi nunca se ha definido con claridad aunque se conoce que generalmente son mezclas de sustancias fenólicas complejas. La toxicidad está definida que cuando ocurre, los fenoles son agregados al revés a proteínas que se juntan con el hidrógeno y por su oxidación a quinonas siendo muy activas y que se cambian en forma cíclica a polimerasas y/o proteínas oxidasas para formar compuestos que se incrementan a compuestos melánicos, que a veces se llaman polifenoles en literatura. Las quinonas también pueden ser producidas de fenoles por la acción de enzimas peroxidasas que pueden catalizar su oxidación en la presencia de peróxido (12).

El ennegrecimiento de corte de muchos explantes comienza a ocurrir justo después de la excisión. Los explantes, o partes de ellos, frecuentemente continúan oscureciendo cuando son introducidos dentro del medio de cultivo, donde pueden también exudar sustancias coloreadas oscuras hacia el medio. Este tipo de ennegrecimiento es asociado con la cortadura. No todos los compuestos producidos son inhibitorios, pero con frecuencia se ha encontrado que una vez ocurre el oscurecimiento, el crecimiento es inhibido y los tejidos pueden morir a menos que se tomen medidas para remediarlo (12).

Los explantes pueden también producir pigmentos (rosado, rojo, café, café-rojizo, negro o azul) algunas veces después de la excisión, los cultivos pueden brotar durante el crecimiento subsecuente. En algunos casos, la formación en esta etapa es debido al daño o vejez de algunas células, causado por un ambiente de cultivo no apropiado (12).

El daño resultante de la producción de pigmentos oscuros es usualmente más severo durante las etapas iniciales de un cultivo y disminuye el problema cuando los explantes han comenzado el crecimiento (12).

El grado de ennegrecimiento e inhibición del crecimiento que ocurre en cultivos es muy dependiente del genotipo, siendo especialmente severo en géneros que naturalmente contienen altos niveles de taninos u otros hidroxifenoles, tales como: *Castanea*, *Hamamelis*, *Juglans*, *Quercus*, *Paeonia*, *Rhododendron* y muchas coníferas.

ii. Prevención de la oxidación

Si la exudación de explantes está acompañada por un crecimiento satisfactorio o morfogénesis, no hay necesidad de tomar precauciones. Estas se deben tomar sólo cuando la oxidación de tejidos y el medio son asociados con pobre establecimiento (y esto es la situación más usual), es necesario tratar de prevenirlo. Las labores siguientes se pueden realizar para prevenir la oxidación:

- Minimizar el daño causado al explante
- Remover los compuestos fenólicos producidos
- Modificar el ambiente redox
- Reduciendo la actividad fenolasa y sustrato disponible
- Modificar el ambiente físico
- Alterando la composición del medio y los reguladores de crecimiento usados
- Con el uso de antioxidantes

d. Estabilidad genética

Debido a que esta variable se origina a nivel celular, la estabilidad genética de las plantaciones micropropagadas, puede ser un factor fundamental para el desarrollo de plantaciones comerciales a gran

escala. La variación genética y epigenética que se da en los explantes y propágulos, puede dar como resultado un aspecto y comportamiento diferentes a los que se producen por métodos de propagación tradicionales. Se ha demostrado que la propagación por medio de puntas meristemáticas y yemas axilares provocan un mínimo de variabilidad mientras que por otro lado la formación y regeneración de callo es desventajosa para la formación de clones fieles al tipo (16, 27).

e. Vitrificación

La vitrificación 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 en apariencia 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 vitrificación, también puede ser minimizada por la reducción de amonio y de los niveles de reguladores del crecimiento, principalmente citocininas en el medio de cultivo, aunque a la vez se reduce el número de brotes producidos. También puede ser reducida, limitando la absorción de agua por el explante, aumentando la concentración de agar o usando otro tipo de sostén como el Gel-Rite (29).

D. Métodos de micropropagación

a. Estímulo de yemas axilares

En este caso, las condiciones "*in vitro*" estimulan el desarrollo de las yemas axilares permitiendo la formación de una planta por cada yema. La eficiencia de este sistema estriba en que el número de plantas obtenidas está determinado por el número de yemas axilares preexistentes en el inóculo (29).

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 (22).

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 (22).

b. Organogénesis directa

Durante muchos años se han conocido sistemas mediante los cuales, tallos y raíces son regenerados directamente del tejido puesto en cultivo, sin pasar por la formación previa de callo, ejemplos de esto son: la propagación de la Violeta Africana (*Saintpaulia spp.*), a partir de explantes del peciolo o de la base foliar, o la propagación de ciertas Begonias a partir de explantes foliares. Los órganos o partes de plantas que contienen rudimentos de yemas o que tienen un potencial para la producción de meristemos adventicios llevan rápidamente a este enfoque (15, 29).

c. Organogénesis indirecta

En este caso se da una proliferación celular rápida que conlleva la formación de callo. Si se mantiene el callo en un medio de rápida proliferación celular y es transferido regularmente, se impide su desdiferenciación. Pero bajo ciertas modificaciones fisiológicas y del medio, se puede inducir la formación de estructuras organizadas que regeneran plantas (15).

Para una multiplicación de plantas de una manera estrictamente clonal, la organogénesis indirecta no es la ruta más favorable, ya que ciertas evidencias sugieren que la formación de callo en estos sistemas constituye a menudo la base para obtener variación genética e inestabilidad (29).

d. Embriogénesis somática

La embriogénesis somática consiste en la formación de embriones a partir de células somáticas que se desarrollan sobre las zonas de corte del explante (embriogénesis directa) o mediante la formación y regeneración de callo (embriogénesis indirecta). Hasta el momento pocas plantas leñosas han sido propagadas por este método, sin embargo, se ha estado desarrollando y perfeccionando principalmente en coníferas como *Pinus Oocarpa Schiede* y *C. Lucitanica L.* (7, 10, 27)

Roca y otros autores (10, 29), indican que la producción de embriones somáticos está ligada a la adición de auxinas como el ANA, IBA y el 2-4 D, sin embargo, en algunos casos como en los que se usan embriones, se hace necesario la aplicación de una citocinina al medio en bajas concentraciones.

E. Fases del cultivo de tejidos vegetales

a. Establecimiento del cultivo aséptico

Es el primer paso en el cual se realiza la selección, la desinfección y el cultivo inicial del material vegetal que se quiere multiplicar (15).

La selección del explante debe estar orientada al tipo de técnica que se va a utilizar, en base al tipo de respuesta que se desee y el fin de la propagación. Por ejemplo, para la formación de clones en plantas con crecimiento secundario, la inducción y regeneración de callo no es aconsejable por la variabilidad genética que el mismo provoca (7, 10, 34).

Una vez seleccionado el mejor explante se requiere desinfectarlo superficialmente, la razón de esto es que en el medio de cultivo pueden crecer microorganismos, principalmente bacterias y hongos, que competirán ventajosamente con el explante. Hay una vasta gama de compuestos químicos que se pueden utilizar como desinfectantes para los explantes, pero en la actualidad es casi generalizado el empleo de etanol al 70% v/v y de hipoclorito de sodio (NaOCl) del 1% al 3% contenido en productos de uso doméstico. Con menor frecuencia se usan el hipoclorito de calcio (CaOCl_2) del 6% al 12% y el cloruro de mercurio (HgCl_2) del 0.1% al 1.5%. Es interesante observar que, si bien en ocasiones se emplea sólo etanol, o solamente NaOCl, lo más frecuente es la utilización de ambos, es decir, una inmersión en etanol al 70%, seguida de una en NaOCl y de varios lavados con agua estéril (29).

Con relación al medio de cultivo y a las condiciones del mismo para el crecimiento, Hartmann (16), afirma que los elementos del medio de cultivo están condicionados por la clase de respuesta que se necesite, siendo de mayor importancia la regulación hormonal de los mismos. Afirma también que la luz y la temperatura no constituyen un factor crítico dentro de esta fase y que por lo común se utiliza una temperatura promedio entre 20 y 25 grados centígrados, y un fotoperíodo de 16 horas con una intensidad lumínica de 1000 lux.

b. Multiplicación

La función de esta etapa es el incremento del número de propágulos para su posterior enraizamiento y la formación de plantas.

A partir de los explantes, o callos producidos durante la primera fase, se cortan y se siembran los explantes en un nuevo medio, o bien se regenera el callo producido en medios de regeneración (7, 16).

La tasa de multiplicación puede variar de 5 a 50 dependiendo de la especie y del método de propagación. También debe tomarse en cuenta en esta fase, la frecuencia de transferencia, ya que ésta influye en el desarrollo de las plantas posteriores y en el período de recuperación (16).

c. Enraizamiento de los brotes y preparación para su trasplante

El proceso de enraizamiento en los brotes propagados "*in vitro*" requiere generalmente del trasplante a un medio de cultivo con menor concentración de sales. Asimismo, se requiere cambiar el balance hormonal, esto es, disminuir las citocininas y aumentar la provisión de auxinas exógenas (16, 29).

Las plantas enraizadas "*in vitro*" no se pueden trasplantar directamente a las condiciones de invernadero sin una paulatina adaptación a las condiciones del suelo. A este período de adaptación se le ha denominado período de endurecimiento, en el cual, las plantas obtenidas "*in vitro*" se deben lavar cuidadosamente para eliminar todos los residuos de agar que pueden ser una fuente de contaminación. Posteriormente, se trasplantan a recipientes con suelo estéril y se cubren con bolsas de polietileno, que se van perforando gradualmente hasta que queden eliminadas completamente en un período de 15 a 20 días, esto se hace con el objeto de adaptar paulatinamente las plantas a las condiciones del invernadero. Durante esta fase de endurecimiento, las plantas se riegan preferentemente con medio de cultivo diluido al 50% y posteriormente se sustituye esta fórmula de riego por soluciones nutritivas menos complejas (29).

d. Trasplante

La fase de trasplante abarca la transferencia de las plantas del medio aséptico de cultivo sintético, a su medio natural. El objetivo primordial, consiste en lograr una adecuada aclimatación de la planta, por tanto deben pasar a su condición de autótrofas y tener un sistema radicular bien desarrollado (7, 10, 16).

Tres elementos son importantes para el desarrollo con éxito de esta fase: a) una humedad relativa alta para evitar el desecamiento de la planta; b) dar a la planta un medio de crecimiento adecuado con relación al contenido de arena, limo y arcilla, que le permita un adecuado desarrollo de las raíces, con un buen drenaje; y

c) el control de plagas y enfermedades mediante una adecuada desinfección del suelo y un constante monitoreo y control de las mismas durante el crecimiento (10, 16).

F. Medios de cultivo

El medio de cultivo además de proveer el sostén y los elementos para el desarrollo de la planta, como el suelo lo haría en condiciones naturales, contiene también sustancias orgánicas que regulan el crecimiento, desarrollo y diferenciación del explante; y que hacen posible el desarrollo de la planta en condiciones asépticas. Dichos elementos varían según el tipo de planta y técnica de cultivo que se esté utilizando (7, 10, 16).

a. Componentes del medio de cultivo

Hurtado y Merino (18), indican que el éxito del cultivo de tejidos vegetales, está influenciado por la composición química de los medios de cultivo. Se ha determinado que utilizando las sustancias químicas necesarias y las condiciones apropiadas de nutrientes, así como su forma química adecuada, ha permitido establecer cultivos para casi todas las partes de una planta en diversas especies vegetales.

i. Sales inorgánicas

Estas sustancias proporcionan los macroelementos (N, P, K, Ca, Mg y S) y los microelementos (Fe, B, Zn, Mn, Cu, Mo, Co y Cl) que la planta necesita para un desarrollo normal, cuyos elementos son los esenciales para la planta en el campo, dichas sustancias pueden ser preparadas en soluciones concentradas y guardadas en refrigeración (10, 15, 16, 29).

ii. Vitaminas

Las plantas verdes se consideran normalmente autótrofas para las vitaminas, pero puede ser necesario añadir al medio algunas de ellas, hasta cuando los cultivos crezcan o se hayan vuelto verdes (29).

De todas las empleadas, sólo las vitaminas del complejo B (tiamina, ácido nicotínico, piridoxina-HCl) son necesarias y de éstas, sólo la tiamina es indispensable en el medio (15, 29).

El myo-Inositol, aunque es una sustancia de tipo carbohidrato, con frecuencia se le considera como una vitamina. No es indispensable, pero cuando se agrega estimula el crecimiento (15).

iii. Carbohidratos

La mayoría de los cultivos "*in vitro*" son heterótrofos y requieren de una fuente de carbohidratos para obtener la energía necesaria para su desarrollo y crecimiento. La sacarosa en concentraciones del 2 al 5% es el azúcar 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 (15, 29).

Los azúcares están involucrados en los procesos de diferenciación celular favoreciendo la formación de elementos vasculares y de la clorofila en los cultivos (15).

Además, tienen una influencia sobre la Organogénesis: una disminución de la concentración de azúcares en el medio favorece la restauración de la capacidad organogénica de los cultivos (15).

iv. Agua

La calidad del agua es muy importante en cultivo de tejidos, ya que éste es el componente que se encuentra en mayor proporción en el medio de cultivo. Para mejor control se debe usar agua destilada estéril (32).

v. Antioxidantes

Roca y Mroginski (29), indican que el empleo de sustancias antioxidantes como el ácido ascórbico, la L-cisteína, polivinilpirrolidona, puede ser de utilidad para el cultivo de explantes con alto contenido de polifenoles, cuya oxidación produce oscurecimiento y eventual muerte de los explantes. En estos casos también es útil usar las soluciones antioxidantes durante la preparación del explante, como también incubar los cultivos en la oscuridad o a bajas intensidades de luz. También se suele acortar el intervalo de tiempo entre subcultivos, como un medio para disminuir los efectos nocivos de la oxidación de polifenoles.

El carbón activado usado en dosis de 0.1% a 5%, incorporado al medio de cultivo, ha mostrado ser de utilidad en el cultivo de diferentes explantes, posiblemente por absorber metabolitos tóxicos. Es usado cuando ocurre el oscurecimiento de tejido "*in vitro*", decoloración del medio de cultivo, formación de callo en la fase de enraizamiento de propágulos, o cuando el crecimiento del tejido es inhibido. Absorbe productos provenientes del metabolismo, así como sustancias hormonales y vitaminas (29, 36).

vi. Agentes solidificantes

Un agente gelificante que ha sido utilizado en forma casi unánime hasta el momento, es el agar (una sustancia derivada de algas marinas). La solidez del medio varía según la cantidad agregada, lo normal es de 7 – 8 g/l (0.7 a 0.8%) y ésta va a variar, según la pureza del compuesto y la fineza de su preparación (15).

El agar liquidifica a una temperatura de 80 grados centígrados y solidifica a temperatura ambiente (36).

Actualmente han sido propuestas otras sustancias gelificantes como el Gel-Rite y el Phytigel, que son más puros que el agar, los cuales son provenientes de fermentaciones bacterianas y se usan comúnmente en concentraciones de 0.2% (2g/l) (15, 35, 36).

b. Cualidades físicas del medio de cultivo

i. pH del medio del medio de cultivo

El pH debe ser tal que no altere la función de las membranas celulares o el sistema buffer del citoplasma (15).

En la mayoría de los medios, el pH inicial es generalmente de 4.0 a 5.5, en ausencia de varios suplementos de crecimiento. El pH del medio se debe ajustar, aumentándolo con una solución 0.01N, 0.1N ó 1N de hidróxido de potasio (KOH) o de sodio (NaOH), o disminuyéndolo con una solución 1N de ácido clorhídrico (HCl); normalmente el pH se ajusta a 5.5, 5.8 ó 6.3 (15, 29).

Las funciones del pH en la regulación fisiológica son importantes (15):

- Condiciona cuales sales permanecen en forma soluble.

- Influencia la asimilación de nutrientes del medio.
- Afecta la gelificación del agar.

ii. Cantidad de medio de cultivo

Como regla general, cuanto más pequeño es el explante, menor será la cantidad de medio a ser utilizado. En cultivos establecidos, la tasa de crecimiento es directamente proporcional a la cantidad de medio (36).

G. Reguladores de crecimiento

a. Auxinas

El nombre auxina significa en griego "crecer" y es el término genérico que se aplica al grupo de compuestos caracterizados por su capacidad para inducir la extensión de las células (13, 15).

El ácido indolacético (IAA) es la más predominante, sin embargo, evidencias recientes sugieren que existen otras auxinas indólicas naturales en las plantas. Aunque la auxina se encuentra en toda la planta, la más alta concentración se localiza en las regiones meristemáticas en crecimiento activo y se le encuentra tanto como molécula libre o en formas conjugadas inactivas (13).

La auxina ha sido implicada en la regulación de un número de procesos fisiológicos (11, 13, 15, 23):

- i) *In vitro* se utilizan para promover la división celular, la diferenciación de raíces y la inducción de callo
- ii) Promueve el crecimiento y diferenciación celular, por lo tanto en el crecimiento en longitud de la planta
- iii) Estimula el crecimiento y maduración de frutos
- iv) Floración
- v) Senectud
- vi) Geotropismo
- vii) La auxina se dirige a la zona oscura de la planta, produciendo que las células de esa zona crezcan más que las correspondientes células que se encuentran en la zona clara de la planta. Esto produce una curvatura de la punta de la planta hacia la luz, movimiento que se conoce como fototropismo

- viii) Retardan la caída de hojas, flores y frutos jóvenes
- ix) Dominancia apical
- x) Aumenta la síntesis de etileno

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 ATPasa en la membrana plasmática y un efecto secundario mediado por la síntesis de enzimas (12).

Normalmente, se usan los componentes siguientes como fuente de auxina (11, 15):

i) De origen natural:

- IAA (Ácido indolacético)
- Ácido fenilacético

ii) De origen sintético:

- NAA (Ácido naftalenacético)
- IBA (Ácido indol 3-butírico)
- 2,4 D (Ácido 2,4-diclorofenoxiacético)

No es posible establecer una concentración de la auxina que se debe utilizar en un solo caso. Sin embargo, en general se utiliza el AIA en concentraciones que varían de 0.001 a 10 mg/l, con un punto óptimo que frecuentemente se encuentra alrededor de 1 a 5 mg/l; el ANA generalmente se utiliza en concentraciones levemente mayores (1 a 10 mg/l) con un punto óptimo cerca de 2 mg/l; y el IBA generalmente se utiliza en concentraciones que varían entre 0.001 y 10 mg/l con un punto óptimo de 0.1 a 10 mg/l (29).

Según la concentración inhibe o estimula el desarrollo de yemas. Así como altas concentraciones inducen la formación de embriones, pero una vez iniciados sólo se desarrollan en bajos niveles de auxina (15).

En altas concentraciones la mayoría de las auxinas sintéticas son fitotóxicas: el 2,4-D y el picloram son usados normalmente como herbicidas (15).

i. Ruta de biosíntesis

El precursor primario en la planta es el triptófano y la biosíntesis se realiza en ápices en crecimiento, hojas en desarrollo (hojas pequeñas en crecimiento), semillas, frutos. Y donde se sintetiza existe mayor cantidad. (11, 14). Para ello existen 3 rutas de síntesis (15):

- Vía del ácido indol-pirúvico: es la vía primaria de la síntesis
- Vía de la triptamina
- Vía del indol-acetaldoxina: Presente sobre todo en el género Brassica (repollo, coles). (15).

ii. 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 (15).

La auxina induce 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 (15).

- 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 (11).

b. 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 nombre para

un grupo de compuestos de la fisiología animal, se adoptó el término citoquinina (citocinesis o división celular). Son producidas en las zonas de crecimiento, como los meristemos en la punta de las raíces (13).

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 (13).

Entre los efectos generales de las citoquininas en los procesos fisiológicos de las plantas se encuentran (11, 13, 15):

- i) Estimulación de la germinación de las semillas
- ii) Estimulación de la formación de frutas sin semillas
- iii) Ruptura del letargo de semillas
- iv) Inducción de la formación de brotes
- v) Mejora de la floración
- vi) Alteración en el crecimiento de frutos
- vii) Ruptura de la dominancia apical
- viii) Mantiene la síntesis de proteínas
- ix) Acción en la organogénesis (15):
 - Suprime el efecto inhibitorio de la auxina sobre las yemas específicas para el desencadenamiento de la mitosis.
 - Retarda la senescencia de los tejidos (15).
- x) Aumenta la división y diferenciación celular. Su acción ocurre en dos etapas (15):
 - Durante la mitosis aumenta la cantidad de ADN.
 - En la citocinesis estimulan la síntesis de proteínas específicas de la división celular (15).

Se adicionan al medio de cultivo para promover la división celular y la inducción de yemas adventicias en callos y órganos (23).

Se usan los compuestos siguientes como fuente de Citoquinina (40):

- i) Cinetina
- ii) BA (6-Benciladenina)
- iii) BAP (6-Bencilaminopurina) estimula la proliferación de yemas axilares
- iv) 2ip (N-Isopentanilaminopurina)
- v) Zeatina: promueve el crecimiento del tallo principal (40).

Las más utilizadas son: Benciladenina (BA), Cinetina, Zeatina y Bencilaminopurina (BAP), en concentraciones que varían de 0.03 a 30 mg/l (18).

En ausencia de citocininas, la metafase de la mitosis es considerablemente afectada (15).

En altas concentraciones inhibe la formación, desarrollo y crecimiento de raíces. Suprime el efecto estimulador de las auxinas (15).

i. Ruta de biosíntesis

Las citoquininas están presentes en todos los tejidos. La biosíntesis tiene lugar en los tejidos meristemáticos. Se encuentran en el xilema, el floema y en las hojas. Hipótesis: Si se sintetizan en la raíz y se almacenan en las hojas, el transporte es xilema-floema. (11, 15)

Su metabolismo es complicado, estas sustancias están presentes en el tejido bajo varias formas (15):

- Bases libres
- Ribonucleósidos
- Ribonucleótidos.

Como constituyente de ciertos (ARNT), existen dos mecanismos de biosíntesis (15):

➤ Isopentenilación de la adenina monofosfato (AMP)



Las tres primeras formas se originan por esta vía.

- Por degradación de moléculas de ARNt. Por esta vía se produce muy poca citoquinina (15).

ii. Modo de acción

Se considera que actúan a través del control de la síntesis de proteínas específicas para el desencadenamiento de la mitosis (15).

c. Giberelinas

Son hormonas del crecimiento. Son diterpenoides tetracíclicos ácidos derivados del ent-kaureno. Todas tienen la misma estructura química, el ent-giberelano y las diferentes giberelinas difieren por las características de los grupos laterales (-CH₃, -CH₂OH, CHO, etc.). (11, 15).

Existen actualmente más de 71 giberelinas y su número sigue creciendo, la de mayor uso es el GA₃, es usada para el elongamiento de yemas y puntas meristemáticas en dormancia, en dosis de 0.05 a 2 mg/l. En la mayoría de los cultivos, los niveles de GA₃ superiores a 1.0 mg/l son tóxicos (15, 23, 29).

Existen dos tipos (11):

- i) De 20 carbonos
- ii) De 19 carbonos (+ activos)

Entre los efectos fisiológicos en las plantas se encuentran los siguientes (8, 11, 15):

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

i. 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 AG12. De éste se derivan las múltiples giberelinas que se conocen (15).
- 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 abcísico (ABA). Esto dependerá de la situación fisiológica de la planta (15).
- Sitios de síntesis: las síntesis ocurren en aquellas regiones que presentan división celular activa (ápices de tallo y raíces, en las hojas y en el embrión). También se presenta en órganos reproductores (flores, semillas inmaduras, embriones germinados). (8, 11, 15).

ii. Mecanismos de acción

- Estimula la síntesis de la α -amilasa, enzima encargada de hidrolizar el almidón para formar compuestos energéticos necesarios al crecimiento del embrión (15).
- 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 (16).

H. Algunos estudios realizados en cultivo de tejidos

a. Estudios realizados en el género *Prunus* utilizando la técnica del cultivo "*in vitro*"

i. Propagación "*in vitro*" de "*Nemaguard*", portainjerto de melocotón

En la propagación vegetativa "*in vitro*" del portainjerto de melocotón "*Nemaguard*", se utilizó el medio basal de Murashige y Skoog (MS) modificado y se usó el brote lateral como explante primario. La proliferación del brote fue inducida en el medio MS complementado con 50 mg/l de ácido L-ascórbico, 20 mg/l de una mezcla de vitaminas, 2.0 mg/l de Benciladenina (BA), y 0.1 mg/l de ácido naftalenacético

(ANA). El enraizamiento se indujo transfiriendo las plantas a otro medio similar al anterior, pero sin la mezcla de vitaminas y sin BA. En la fase de enraizamiento, también se realizó una prueba aplicando vitaminas al medio de cultivo, con lo que se observó que la mezcla de vitaminas redujo el enraizamiento; y la inhibición del enraizamiento se dio debido a la presencia de riboflavina (20).

ii. Método modificado para el cultivo "*in vitro*" del portainjerto de melocotón, "*Nemaguard*"

Este estudio fue realizado en 1991, en el Complejo de Biotecnología del ICTA de Quetzaltenango; en el cual se utilizó el medio de cultivo Murashige y Skoog (MS) modificado, a 1/3 de su concentración, suplementado con 0.5 mg/l de Bencilaminopurina (BAP) y 2 g/l de carbón activado. Los parámetros evaluados fueron: Porcentaje de sobrevivencia, porcentaje de contaminación (33).

Los resultados obtenidos no fueron muy satisfactorios, ya que pasados 30 días los explantes detuvieron su desarrollo y se apareció necrosis en los tejidos. Por lo tanto se recomienda continuar con el trabajo de investigación para encontrar el medio de cultivo más adecuado para el establecimiento y proliferación "*in vitro*" del material *Nemaguard*, a partir de meristemos (33).

iii. Propagación "*in vitro*" de melocotón, *Prunus persica* (L.) Batsch. a partir de yemas axilares

Azpeitia M. y colaboradores (2), trabajaron durante el periodo de julio de 1989 a abril de 1990, teniendo como objetivo conocer la respuesta a la propagación "*in vitro*" de dos genotipos de melocotón 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.

En este estudio se utilizaron cuatro medios basales de cultivo (Almehdi y Parfitt (AP), Gamborg (B5), Linsmaier y Skoog (LS) y Murashige y Skoog (MS)), tanto en estado sólido como líquido. De los ocho medios de cultivo probados para el establecimiento, el medio de Almehdi y Parfitt (AP) 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 alcanzó con 4 mg/l de Bencilaminopurina (BAP), y en la selección 50 (S-50) con 6 mg/l de Bencilaminopurina (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 indolbutírico (IBA) obteniendo raíces con mayor longitud en el nivel de 4.06 mg/l. En la S-50 el enraizamiento fue más escaso, sobresaliendo el nivel de 2 mg/l de ácido naftalenacético (NAA). El pH de los medios de cultivo fue ajustado a 5.7 (2).

iv. Obtención de plantas libres de virus y propagación "in vitro" de melocotón (*Prunus persica* (L) *Batsch*), cv. *DIAMANTE*

En esta investigación se consideró el interés de obtener plantas de melocotón cultivar "*Diamante*", libres de virus en condiciones "*in vitro*": El estudio se dividió en 4 fases experimentales, las cuales fueron:

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 agrimicín 500 y captán. 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 Bencilaminopurina (BAP), kinetina, 2-isopentenil adenina (2-iP) y 0.1 mg/l de ácido indolacético (AIA), complementado con tiamina (0.4 mg/l) e inositol (100mg/l), 0.3 % de sacarosa, 0.8% de agar, 100 mg/l de ácido cítrico; 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 MS y 1.5mg/l de BAP.

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 BAP.

En la cuarta fase, el mejor tratamiento para las variables, crecimiento y número de raíces fue con 0.4 mg/l de ácido indolacético (AIA), en un medio básico de MS al 75%, complementado con vitaminas, 2% de sacarosa, 0.8% (8g/l) de agar y con un pH de 5.7+/-0.1 (24)

v. Cultivo "*in vitro*" de embriones de melocotón

Este trabajo tuvo como objetivo la reducción del tiempo 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 (39).

Para este trabajo se utilizaron 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 de Murashige y Skoog (MS). 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 cultivo para cada variedad (39).

vi. 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, serían que desde el cultivo "*in vitro*" se podría observar, qué 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 el 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 fue, varetas de árboles establecidos en el campo de melocotón cv. *Salcajá* y de manzana *Wealthy* con yemas en estado de dormancia, y como medio de cultivo el MS + BA1. 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 atribuyó al hecho de que el material provenía del campo, con lo cual estaba expuesto a microorganismos contaminantes (26).

vii. Enraizamiento “*in vitro*” del portainjerto Colt (Híbrido entre “*Prunus avium* y *Prunus pseudocerasus*)

En el siguiente estudio, a partir de brotes provenientes del sexto y séptimo subcultivo “*in vitro*” del portainjerto Colt, se analizaron los efectos sobre el enraizamiento de los siguientes factores: a) diferentes auxinas, concentraciones y tiempos de exposición; b) sistemas de soporte; c) exposición a la oscuridad; y d) duración de la etapa de enraizamiento. Las auxinas ácido indolbutírico (IBA), ácido indolacético (AIA) y ácido naftalenacético (ANA), permitieron obtener un 90 - 100% de brotes enraizados. Si bien en siete días de exposición al ANA, seguido del cultivo en medio libre de auxina, se produjo el mejor sistema radical, fue posible obtener un muy buen enraizamiento por la presencia permanente de 0.5 mg/l de ANA, ya que esta última no inhibió el crecimiento de las raíces ni de los brotes. El agar a 4 ó 7 g/l resultó superior a los medios líquido o con vermiculita. La oscuridad indujo menor crecimiento de las raíces, con abundante formación de callo. Al extender la duración del enraizamiento de 26 a 34 y 42 días se incremento la longitud de las raíces sin un aumento aparente en la cantidad de callo. Fue posible la aclimatación de 1,000 plantas producidas según las condiciones resultantes de este trabajo, con una sobrevivencia superior al 95% bajo un túnel de polietileno y sin necesidad de nebulización (1).

b. Micropropagación de Manzana (*Malus pumila* Mill.)

Ápices vegetativos de yemas apicales y axilares de árboles jóvenes en crecimiento activo de los cultivares de manzana: Malling Merton 106, Spy Gold, Jonathan, Ana Ira, Mutzu y Slor; fueron aislados y

cultivados "*in vitro*" para establecer un sistema de micropropagación con el fin de producir plantas de manzana de calidad certificada, así mismo se realizaron experimentos de microinjertación "*in vitro*" con los cultivares mencionados, sobre el portainjerto MM106. El estudio se realizó en el laboratorio de cultivo de Tejidos Vegetales, Disciplina de Biotecnología, ICTA, Quetzaltenango, Guatemala. El medio de cultivo utilizado fue: Murashige y Skoog (MS) suplementado con hormonas de crecimiento y solidificado con agar. En la etapa de proliferación se evaluó el medio basal de Murashige y Skoog (MS) doble que combina medio sólido y líquido dentro del mismo recipiente de cultivo. Los mejores medios de cultivo fueron: $\frac{1}{2}$ MS (mitad concentración) + 0.5 mg/l de Bencilaminopurina, para la etapa de iniciación; MS doble + 1 mg/l BAP, para la etapa de proliferación y elongación de brotes; $\frac{1}{2}$ MS + 1 mg/l de Ácido Indolbutírico, para la etapa de enraizamiento. Se estableció una metodología de microinjertación "*in vitro*" con la cual se obtuvo mayor éxito en unión de injerto y sobrevivencia al trasplante con las variedades: Spy Gold, Jonathan y Mutzu (25).

3.2 MARCO REFERENCIAL

3.2.1 Ubicación del área experimental

La investigación se desarrollo en el laboratorio de cultivo de tejidos vegetales, de la Subárea de Manejo y Mejoramiento de Plantas, del Área Tecnológica de la Facultad de Agronomía, de la Universidad de San Carlos de Guatemala.

3.2.2 Injertación y portainjertos

La injertación es la unión de dos partes de tejido vegetal vivo de tal forma que se integren y crezcan como una sola planta. Se denomina patrón o portainjerto a la parte que conformará la estructura de anclaje y soporte, vale decir, quien aporta el sistema radical y base del tallo. Se denomina injerto a la parte que aportará tronco, ramas y hojas, vale decir, la parte aérea (9).

El portainjerto será fundamental para el desarrollo que tenga el huerto a establecer, así la elección de un patrón acorde a nuestras necesidades en cuanto a suelo, clima y manejo, será vital. Algunos de los portainjertos más utilizados para melocotón son: *Pomona* (cultivar para la industria y cosecha tardía), *Nemaguard* (resistente a nemátodos), *Chuche* y *picudo* (tipo silvestrado, similar al franco español, que es muy tolerante a suelos calcáreos, nemátodos y sequías). En el mundo los más usados son del grupo *GF* en Europa, *Halford*, *Lovell* e *Indian Peach* en EE.UU (9).

La elección del portainjerto depende también de la compatibilidad con el injerto a usar. Es importante que ambos tejidos se integren en forma adecuada para lograr un desarrollo ideal. El género *Prunus* presenta en general, una buena compatibilidad entre las diferentes especies (9).

3.2.3 Origen del portainjerto *Nemaguard*

El portainjerto de melocotón "*Nemaguard*" seleccionado por la Estación experimental de Fresno del U.S.D.A., se ha confirmado como el mejor entre los portainjertos con estas características. Procede de una semilla de *Prunus davidiana* hibridado probablemente de forma natural con *Prunus persica*. Es resistente a las siguientes especies de nemátodos: *Meloidogyne javanica* y *Meloidogyne incognita* var. *Acrita*. Es de

vigor medio y buena uniformidad. En el cuadro 5 se dan a conocer algunas características que presenta el portainjerto *Nemaguard* (14, 44).

Cuadro 5. Características que presenta el portainjerto *Nemaguard*

Portainjerto	Características				
	Resistencia a la sequía	Resistencia caliza	Resistencia a la humedad	Resistencia a nemátodos	Otra característica
<i>Nemaguard</i>	Resistente	Poco resistente	poco resistente	Muy resistente	es una selección de melocotón por su resistencia a nematodos

Fuente: Gonzáles (7) y Weibel (44)

4. OBJETIVOS

4.1 General

Evaluar medios de cultivo, antioxidantes y reguladores de crecimiento en la micropropagación del portainjerto "*Nemaguard*" (*Prunus spp.*), a partir de yemas axilares.

4.2 Específicos

- 4.2.1 Determinar el antioxidante que permita una mayor sobrevivencia de las yemas axilares a la oxidación en cada medio basal de cultivo.
- 4.2.2 Determinar las combinaciones de Bencilaminopurina (BAP) y Ácido Indolbutírico (IBA) que inducen la brotación de yemas axilares.
- 4.2.3 Evaluar diferentes concentraciones de sales del medio basal de Gamborg (B5) y dosis de Ácido Indolbutírico (IBA), para inducir la formación de raíces en los brotes obtenidos.

5. HIPÓTESIS

- 5.1 Al menos un antioxidante permite una mayor sobrevivencia a la oxidación de las yemas axilares del portainjerto *Nemaguard* (*Prunus spp.*).
- 5.2 Al menos una combinación de bencilaminopurina y ácido indolbutírico induce la brotación de yemas axilares del portainjerto *Nemaguard* (*Prunus spp.*).
- 5.3 Al menos una concentración de sales del medio basal de Gamborg (B5) y una dosis de ácido indolbutírico induce la formación de raíces en brotes del portainjerto *Nemaguard* (*Prunus spp.*).

6. MATERIALES Y METODOS

6.1 Materiales

6.1.1 Reactivos

Los reactivos utilizados fueron los siguientes: Sales minerales, constituyentes de los medios de cultivo, agua destilada, agua desmineralizada, hipoclorito de sodio, alcohol al 70 y 90%, sacarosa, ácido indolbutírico, bencilaminopurina, agar, ácido clorhídrico, hidróxido de sodio 1N.

6.1.2 Cristalería y equipo

La cristalería y equipo utilizados fueron: balanza analítica, potenciómetro, horno microondas, autoclave, campana de flujo laminar, refrigerador, agitador magnético, pipetas (de 1, 5 y 10 ml), micro pipetas (de 100 y 1,000 μ l), probetas (de 10, 50, 100, 250, 500 y 1,000 ml), erlenmeyer (de 25, 50, 100, 250, 500 y 1,000 ml), beacker (de 50, 100, 250, 500 y 1,000 ml), frascos, mecheros, parafilm, agujas de disección, micro espátulas, tijeras, bisturí, pinzas, pizetas, cajas de petri, frascos de compota de 100 ml, incubadora, papel aluminio, papel toalla, maskin tape, marcadores, mesas.

6.2 Métodos

6.2.1 Medios de cultivo

A. Preparación de las soluciones madre

Las soluciones madre se prepararon en función de los componentes (que se pueden observar en el cuadro 30 A) de cada uno de los grupos (macronutrientes, micronutrientes, vitaminas, etc) que conforman los diferentes medios basales de cultivo que se utilizaron en el experimento, los cuales fueron: Almehdi y Parfitt (AP) (19), Gamborg *et al* (B5) (40) y Linsmaier y Skoog (LS) (6). Éstas se preparan con el fin de ahorrar pasos en la elaboración de los medios de cultivo. A continuación se describe únicamente la forma en que se realizó la preparación de las soluciones patrón para el caso del medio basal LS, ya que se siguió la misma

metodología para los medios AP y B5 respetando siempre los grupos de los componentes, así como las cantidades y concentraciones de éstos, que se requieren para cada medio basal de cultivo.

a. Preparación de la solución madre de macronutrientes del medio basal de Linsmaier y Skoog (LS)

Se prepararon 700 ml de esta solución, para lo cual se empleó un beacker de 1 litro. En el cuadro 6 se describen los componentes.

Cuadro 6. Componentes de la solución madre de macronutrientes del medio basal de Linsmaier y Skoog (LS), a una concentración de 20 X. Cantidad en gramos para preparar 700 ml.

Sustancia	Peso (g)
NH ₄ NO ₃	23.1
KNO ₃	26.6
MgSO ₄ .7H ₂ O	5.18
KH ₂ PO ₄	2.38

Pesados los componentes se agregaron al beacker, el cual contenía 250 ml de agua desmineralizada estéril, ésta se mantuvo en constante agitación (en el agitador magnético), hasta observar que todas las sustancias estuvieran disueltas, el contenido se trasladó a una probeta de 1,000 ml, luego se aforó con agua desmineralizada estéril, hasta llegar al volumen deseado, seguidamente se volvió a agitar la solución y se guardó en frascos esterilizados, identificados y tapados adecuadamente, éstos se guardaron en refrigeración hasta su uso a una temperatura de 4 °C. En el cuadro 31 A se describen los componentes para las soluciones madre de macronutrientes, para los tres medios de cultivo.

De igual forma se prepararon 500 ml de una solución madre de CaCl₂.2H₂O (macronutriente), a una concentración de 30X. En el cuadro 32 A se puede observar la cantidad de éste para cada medio de cultivo.

b. Preparación de la solución madre de micronutrientes del medio basal de Linsmaier y Skoog (LS)

Se prepararon dos soluciones por aparte, de 100 ml cada una, a las que se les nombró micro A y micro B respectivamente. 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 en el cuadro 7.

Cuadro 7. Componentes de las soluciones madre de micronutrientes del medio basal de Linsmaier y Skoog (LS)

Sustancia	Peso (g)
MICRO "A" a 1,000X	
MnSO ₄ . 4H ₂ O	2.23
ZnSO ₄ . 7H ₂ O	0.86
H ₃ BO ₃	0.62
Na ₂ MoO ₄ . 2H ₂ O	0.025
MICRO B a 5,000X	
CoCl ₂ . 2H ₂ O	0.0125
CuSO ₄ . 5H ₂ O	0.0125

Pesados los componentes se agregaron al beacker que contenía 50 ml de agua desmineralizada estéril, ésta se mantuvo en constante agitación (en el agitador magnético), hasta observar que todas las sustancias estuvieran disueltas, el contenido se trasladó a una probeta de 100 ml, luego se aforó con agua desmineralizada estéril hasta llegar a 100 ml, seguidamente se volvió a agitar la solución y se guardó en frascos esterilizados, identificados y tapados adecuadamente con papel aluminio, éstos se guardaron (se habla en plural debido a que se prepararon dos soluciones: una de 100 ml de micro A y una de micro B) en refrigeración a una temperatura de 4 °C, hasta su uso. En el cuadro 33 A se pueden observar las cantidades de cada componente para los tres medios de cultivo.

Por aparte se prepararon 50 ml de una solución madre de KI (micronutriente), a una concentración de 1000X; en la que se agregaron 0.0415 g del compuesto en mención. En el cuadro 34 A se puede observar la cantidad de éste, para cada medio de cultivo.

c. Preparación de la solución madre de hierro a una concentración de 200X, para el medio basal de Linsmaier y Skoog (LS)

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

- i) Se tomaron dos beackers y se agregaron 100 ml de agua desmineralizada estéril en cada uno.
- ii) Seguidamente, ambos beackers se colocaron en la estufa, hasta que el agua llegó a una temperatura de aproximadamente 40 °C.
- iii) Al agua caliente y en constante agitación (en el agitador magnético), se agregaron 1.865 g de Na₂EDTA a un beacker y 1.3925 g de FeSO₄.7H₂O al otro beacker.

- iv) Al estar bien disueltos los dos compuestos, se mezclaron en un solo beacker; y se volvieron a agitar hasta que éstos estaban bien mezclados.
- v) Mezclados los elementos, se aforó la solución, en una probeta, hasta el volumen deseado; se volvió a agitar y luego se trasladó la solución a un envase de vidrio, cubriéndolo debidamente con papel aluminio y colocándole su respectiva etiqueta; y por último se guardó en la refrigeradora a 4°C.

La cantidad de los componentes para esta solución , para los tres medios de cultivo se puede observar en el cuadro 35 A.

d. Preparación de la solución madre de vitaminas a una concentración de 1,000X, para el medio basal de Linsmaier y Skoog (LS)

Se preparó una solución de 50 ml de la siguiente forma: se colocaron 25 ml de agua desmineralizada estéril en un beacker de 100 ml, la cual se mantuvo en constante agitación (en el agitador magnético). Se pesaron 0.02 g de tiamina y se agregaron al beacker; después de disuelto el compuesto, se aforó la solución hasta los 50 ml, luego la solución se trasladó a un envase de vidrio y se guardó en la refrigeradora a 4°C. En el cuadro 36 A se pueden observar las cantidades de las vitaminas, para los diferentes medios de cultivo.

e. Preparación de la solución madre de myo-inositol a una concentración de 1,000X, para el medio basal de Linsmaier y Skoog (LS)

Se preparó una solución de 100 ml de la siguiente forma: se colocaron 25 ml de agua desmineralizada estéril en un beacker de 100 ml, la cual se mantuvo en constante agitación (en el agitador magnético). Se pesaron 1.5 g de myo-Inositol y se agregó al beacker; después de haberse disuelto el compuesto, se aforó la solución en una probeta hasta los 100 ml, luego la solución se trasladó a un envase de vidrio y se guardó en la refrigeradora a 4°C. En el cuadro 37 A se presenta la cantidad de myo inositol, así como de otros componentes de cada medio de cultivo.

f. Preparación de las soluciones madre de reguladores del crecimiento

Los reguladores del crecimiento utilizados fueron: BAP (bencilaminopurina) e IBA (ácido indolbutírico). Para la preparación de las soluciones madre de éstos, se disolvieron en hidróxido de sodio 1 N y luego se llegó al volumen deseado con agua desmineralizada estéril hasta la cantidad a preparar.

Estas soluciones madre se prepararon con las siguientes concentraciones: BAP a 250 ppm, IBA a 250 ppm; se prepararon 250 ml de cada solución.

B. Preparación de los medios de cultivo

Se preparó la cantidad de medio según conveniencia, para lo cual se siguió la siguiente metodología:

En un beacker se colocó agua desmineralizada estéril, se agregó al recipiente una barra magnética y se mantuvo en constante agitación (en el agitador magnético), agregando los grupos de componentes (soluciones madre) de cada medio basal de cultivo, según la cantidad a preparar. Para el caso del medio basal LS (de igual forma fue para los otros medios de cultivo, sólo que respetando los grupos de componentes para cada uno), el orden fue el siguiente:

- a) Macronutrientes: NH_4NO_3 , KNO_3 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ y KH_2PO_4
- b) Macronutriente: $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
- c) Micronutrientes A: $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, H_3BO_3 y $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
- d) Micronutrientes B: $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ y $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$
- e) Micronutriente: KI
- f) Hierros: Na_2EDTA y $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
- g) Vitaminas: tiamina
- h) Myo-inositol
- i) Reguladores de crecimiento según cantidades a evaluar: para la fase II (de multiplicación) fueron: 2 mg/l, 4 mg/l, 6 mg/l y 8 mg/l de BAP; 0.01 mg/l, 0.1 mg/l y 1.5 mg/l de IBA. Para la fase III (de enraizamiento), las concentraciones de ácido indolbutírico (IBA) fueron: 0.1 mg/l, 0.5 mg/l, 1.0 mg/l; sin bencilaminopurina (BAP). Para la fase I (control de la oxidación), no se evaluó ningún regulador del crecimiento.
- j) Sacarosa
- k) Se agregó un antioxidante según dosis establecida
- l) Se aforó la solución

- m) Se midió el pH, el cual se estableció en 5.8, para ello se utilizó según fue necesario una solución de ácido clorhídrico 1N (para bajar el pH) o una solución de hidróxido de sodio 0.01N, 0.1N ó 1N (para subir el pH)
- n) Se agregaron 8 g/l (0.8 %) de agar
- o) Se calentó en el horno microondas hasta que se disolvió el agar
- p) La solución se distribuyó a razón de 25 ml de medio de cultivo por cada unidad experimental (frasco de 100 ml)
- q) Cada frasco se rotuló según el tratamiento que contenía.
- r) Todas las unidades experimentales se esterilizaron en el autoclave durante 25 minutos a una presión de 1.05 Kg/cm² y a una temperatura de 120 °C.
- s) Las unidades experimentales (frascos con medio de cultivo) se colocaron en el cuarto de incubación hasta que se realizó la siembra.

6.2.2 Fases de la investigación

El estudio se desarrolló en tres fases: La fase I (control de la oxidación), consistió en la evaluación de tres antioxidantes, para determinar cuál antioxidante y qué dosis permite una mayor sobrevivencia del portainjerto *Nemaguard*, a la oxidación en el cultivo "*in vitro*"; la fase II (multiplicación), consistió en evaluar la respuesta del portainjerto *Nemaguard* a la propagación vegetativa "*in vitro*" realizando diferentes combinaciones de bencilaminopurina (BAP) y ácido indolbutírico (IBA); y la fase III (enraizamiento de brotes), consistió en la inducción al enraizamiento "*in vitro*" de brotes obtenidos en la fase II.

A. Fase I, Control de la oxidación

a. Material vegetal

Se utilizaron yemas axilares con crecimiento activo, las cuales se tomaron del tercio medio de la copa del árbol, provenientes de árboles sanos y vigorosos de un año de edad, del portainjerto *Nemaguard*.

Los árboles fueron sometidos a un tratamiento fitosanitario contra: bacterias, hongos, insectos y ácaros; además, se fertilizaron y se podaron, según requerimientos del árbol. Para lo cual se siguieron las siguientes fases:

- i) A nivel de campo: Se trataron los árboles a partir de la adquisición hasta el traslado al invernadero.
- ii) A nivel de invernadero: Los árboles se trasladaron al invernadero 30 días antes de la siembra “*in vitro*”. En donde se continuó con el tratamiento fitosanitario.

i. 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 éstas fueran vegetativas y no de flor.

Se siguió la siguiente metodología de desinfección del material vegetal a nivel de campo y de laboratorio:

i.1 Desinfección a nivel de campo y preservación del material

- Se cortaron trozos de ramas, de 20 cm de longitud.
- Se lavaron con agua estéril y jabón, luego se secaron con papel toalla.
- Éstos se colocaron en una solución desinfectante de fungicidas y bactericidas, los cuales fueron: 0.15% de un bactericida comercial (que contiene 15% de estreptomina y 1.5% de oxitetraciclina), 0.1% de benomyl, 500 ppm de cloranfenicol, 200 ppm de oxitetraciclina, 0.2% de ácido ascórbico y 0.4% de ácido cítrico. Seguidamente se colocaron por veinticuatro horas en la refrigeradora.

i.2 Desinfección de explantes a nivel de laboratorio

Todo esto se realizó en la campana de flujo laminar:

- El material preservado en frío se cortó en trozos más pequeños (los cuales contenían de 3 a 4 yemas axilares), lo suficientemente pequeños como para que éstos pudieran ser manipulados en una caja petri. Y se dejaron en remojo en agua estéril para eliminar el exceso de la solución de fungicidas y bactericidas.
- Se trasladaron a un beacker que contenía una solución de alcohol etílico al 70%, por dos minutos.
- Se trasladaron a un beacker que contenía agua esterilizada, para eliminar el exceso de alcohol.
- Se trasladaron a un beacker que contenía una solución de cloro al 5% v/v, por 5 minutos

- Luego se sacó el material vegetal de la solución de cloro y se le realizaron como mínimo, tres lavados con agua estéril para eliminar el cloro del tejido vegetal.
- Los explantes se colocaron en un recipiente (cubierto con papel aluminio), el cual contenía una solución debidamente esterilizada de ácido cítrico, a una concentración de 150 ppm.

b. Inoculación de yemas axilares

En esta primera etapa de la investigación, se procedió a la siembra de los explantes, los cuales consistieron en trozos de tallo de 2 centímetros de longitud y que contenían una yema axilar. Se inoculó un explante por cada unidad experimental.

La inoculación de las yemas axilares en las unidades experimentales, se realizó en condiciones asépticas en la campana de flujo laminar, la cual se puso en funcionamiento 30 minutos antes de empezar a trabajar en ella. Se utilizaron los trozos de tallo de 3 ó 4 yemas que se encontraban en la solución de ácido cítrico a 150 ppm del paso anterior.

- i. En una caja de petri conteniendo 5 ml de una solución de ácido cítrico a 100 ppm, se colocó un trozo de tallo, el cual con la ayuda de un bisturí se cortó en trozos más pequeños, los cuales tenían 2 cm de longitud y una yema axilar.
- ii. Después de haber cortado el explante, se tomó con una pinza debidamente esterilizada y se inoculó dentro del medio de cultivo (frasco de 100 ml), teniendo cuidado que el explante quedara en la parte central del medio de cultivo; finalizada la siembra, se tapó cuidadosamente. Cada frasco se encontraba identificado con anterioridad según el tratamiento que contenía y el número de repetición que le correspondía.

c. Incubación de los tejidos

Después de haber realizado la inoculación de todos los explantes en sus respectivas unidades experimentales, se trasladaron al cuarto de incubación. El cual está equipado con una fuente de luz proporcionada por lámparas fluorescentes de luz blanca de 1,000 a 3,000 lux de intensidad; la temperatura media del cuarto es de 25 °C; con un fotoperíodo programado de 16 horas de luz y 8 de oscuridad. Cuyas condiciones son las propicias para el desarrollo de los explantes.

d. Descripción de los tratamientos

Los tratamientos evaluados en la fase I (Control de la oxidación), fueron las diferentes dosis de tres antioxidantes (incorporados en los medios de cultivo), los cuales fueron: ácido cítrico (AC), con las siguientes dosis: 50 mg/l, 100 mg/l y 150 mg/l; polivinilpirrolidona (PVP), con las siguientes dosis: 100 mg/l, 500 mg/l y 900 mg/l; y carbón activado (CA), con las siguientes dosis: 2,000 mg/l, 5,000mg/l y 10,000 mg/l. En tres diferentes medios basales de cultivo que fueron: el Almehdi y Parfitt (AP), Gamborg (B5) y Linsmaier y Skoog (LS). En los cuadros 8, 9 y 10 se presentan los tres antioxidantes con sus diferentes dosis, para cada medio basal (cada medio basal de cultivo se evaluó de forma independiente).

Los factores que se sometieron a evaluación fueron los antioxidantes: Ácido Cítrico (AC), Polivinilpirrolidona (PVP) y Carbón Activado (CA), con tres niveles cada uno.

e. Descripción de la unidad experimental

Cada unidad experimental consistió en un frasco de 100 ml, cada uno de los cuales contenía 25 ml de medio de cultivo, con el antioxidante correspondiente (según tratamiento) y una yema axilar.

El número de unidades experimentales por cada medio basal de cultivo fue de 50, ya que fueron 10 tratamientos (incluyendo un testigo absoluto, al que no se le aplicó ninguna dosis de antioxidante), con 5 repeticiones cada uno.

Cuadro 8. Descripción de los tratamientos utilizados en la fase I (control de la oxidación), para el medio basal de Almehdi y Parfitt (AP).

MEDIO BASAL DE CULTIVO	ANTIOXIDANTE		
	AC mg/l	PVP mg/l	CA mg/l
Almehdi y Parfitt (AP)	0	0	0
	50	0	0
	100	0	0
	150	0	0
	0	100	0
	0	500	0
	0	900	0
	0	0	2,000
	0	0	5,000
	0	0	10,000

Cuadro 9. Descripción de los tratamientos utilizados en la fase I (control de la oxidación), para el medio basal de Gamborg (B5).

MEDIO BASAL DE CULTIVO	ANTIOXIDANTE		
	AC mg/l	PVP mg/l	CA mg/l
Gamborg (B5)	0	0	0
	50	0	0
	100	0	0
	150	0	0
	0	100	0
	0	500	0
	0	900	0
	0	0	2,000
	0	0	5,000
	0	0	10,000

Cuadro 10. Descripción de los tratamientos utilizados en la fase I (control de la oxidación), para el medio basal de Linsmaier y Skoog (LS).

MEDIO BASAL DE CULTIVO	ANTIOXIDANTE		
	AC mg/l	PVP mg/l	CA mg/l
Linsmaier y Skoog (LS)	0	0	0
	50	0	0
	100	0	0
	150	0	0
	0	100	0
	0	500	0
	0	900	0
	0	0	2,000
	0	0	5,000
	0	0	10,000

f. Variables de respuesta

- i. Porcentaje de explantes que no presentaron oxidación: para lo cual se hizo una relación entre el número de repeticiones (por cada tratamiento) que fue de 5 y el número de explantes que no presentaron oxidación. La lectura se tomó a los 15 días después de sembrados los mismos, por cada unidad experimental.

g. Análisis de los resultados

Se realizó un análisis descriptivo de la información, ya que no fue factible aplicar estadísticos paramétricos, sólo porcentajes de la variable de respuesta, debido a la naturaleza de los resultados, para ello se detalló de forma precisa cada uno de los eventos realizados para poder cumplir con los objetivos de la investigación.

B. Fase II, multiplicación de brotes

a. Material vegetal

Se utilizaron yemas axilares con crecimiento activo, las cuales se tomaron del tercio medio de la copa del árbol, provenientes de árboles sanos y vigorosos de un año de edad, del portainjerto *Nemaguard*.

Los árboles fueron sometidos a un tratamiento fitosanitario contra: bacterias, hongos, insectos y ácaros; además, se fertilizaron y se podaron, según requerimientos del árbol. Para lo cual se siguieron las siguientes fases:

- i) A nivel de campo: Se trataron los árboles a partir de la adquisición hasta el traslado al invernadero.
- ii) A nivel de invernadero: Los árboles se trasladaron al invernadero 30 días antes de la siembra "*in vitro*". En donde se continuó con el tratamiento fitosanitario.

i. 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 éstas fueran vegetativas y no de flor.

Se siguió la siguiente metodología de desinfección del material vegetal a nivel de campo y de laboratorio:

i.1 Desinfección a nivel de campo y preservación del material

- Se cortaron trozos de ramas, de 20 cm de longitud.

- Se lavaron con agua estéril y jabón, luego se secaron con papel toalla.
- Éstos se colocaron en una solución desinfectante de fungicidas y bactericidas, los cuales fueron: 0.15% de un bactericida comercial (que contiene 15% de estreptomycin y 1.5% de oxitetraciclina), 0.1% de benomyl, 500 ppm de cloranfenicol, 200 ppm de oxitetraciclina, 0.2% de ácido ascórbico y 0.4% de ácido cítrico. Seguidamente se colocaron por veinticuatro horas en la refrigeradora.

i.2 Desinfección de explantes a nivel de laboratorio

Todo esto se realizó en la campana de flujo laminar:

- El material preservado en frío se cortó en trozos más pequeños (los cuales contenían de 3 a 4 yemas axilares), lo suficientemente pequeños como para que éstos pudieran ser manipulados en una caja petri. Y se dejaron en remojo en agua estéril para eliminar el exceso de la solución de fungicidas y bactericidas.
- Se trasladaron a un beacker que contenía una solución de alcohol etílico al 70%, por dos minutos.
- Se trasladaron a un beacker que contenía agua esterilizada, para eliminar el exceso de alcohol.
- Se trasladaron a un beacker que contenía una solución de cloro al 5% v/v, por 5 minutos
- Luego se sacó el material vegetal de la solución de cloro y se le realizaron como mínimo, tres lavados con agua estéril para eliminar el cloro del tejido vegetal.
- Los explantes se colocaron en un recipiente (cubierto con papel aluminio), el cual contenía una solución debidamente esterilizada de ácido cítrico, a una concentración de 150 ppm.

b. Inoculación de yemas axilares

En esta segunda etapa de la investigación, se procedió a la siembra de los explantes con el fin de observar brotación, los cuales consistieron en trozos de tallo de 2 centímetros de longitud y que contenían una yema axilar. Se inoculó un explante por cada unidad experimental.

La inoculación de las yemas axilares en las unidades experimentales, se realizó en condiciones asépticas en la campana de flujo laminar, la cual se puso en funcionamiento 30 minutos antes de empezar a trabajar en ella. Se utilizaron los trozos de tallo de 3 ó 4 yemas que se encontraban en la solución de ácido cítrico a 150 ppm del paso anterior.

- i. En una caja petri conteniendo 5 ml de una solución de ácido cítrico a 100 ppm, se colocó un trozo de tallo, el cual con la ayuda de un bisturí se cortó en trozos más pequeños, los cuales tenían 2 cm de longitud y una yema axilar.
- ii. Después de haber cortado el explante, se tomó con una pinza debidamente esterilizada y se inoculó dentro del medio de cultivo (frasco de 100 ml), teniendo cuidado que el explante quedara en la parte central del medio de cultivo; finalizada la siembra, se tapó cuidadosamente. Cada frasco se encontraba identificado según el tratamiento que contenía y el número de repetición que le correspondía.

c. Incubación de los tejidos

Después de haber realizado la inoculación de todos los explantes en sus respectivas unidades experimentales, se trasladaron al cuarto de incubación. El cual está equipado con una fuente de luz proporcionada por lámparas fluorescentes de luz blanca de 1,000 a 3,000 lux de intensidad; la temperatura media del cuarto es de 25 °C; con un fotoperíodo programado de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad. Cuyas condiciones son las propicias para el desarrollo de los explantes.

d. Descripción de los tratamientos

Los tratamientos evaluados en la fase II (de multiplicación), fueron las diferentes combinaciones de: Bencilaminopurina (BAP) (con las siguientes dosis: 2 mg/l, 4 mg/l, 6 mg/l y 8 mg/l) y Ácido Indolbutírico (IBA) (con las siguientes dosis: 0.01mg/l, 0.1 mg/l y 1.5 mg/l), en tres diferentes medios basales de cultivo que fueron: Almehdi y Parfitt (AP), Gamborg (B5) y Linsmaier y Skoog (LS). En los cuadros 11, 12 y 13 se presentan las diferentes combinaciones de reguladores del crecimiento para cada medio basal de cultivo (cada medio basal de cultivo se evaluó de forma independiente).

Todos los tratamientos incluyendo al testigo (el cual contenía 0 mg/l de BAP y 0 mg/l de IBA), fueron suplementados con el antioxidante polivinilpirrolidona en la dosis de 900 mg/l, cuyo antioxidante y su dosis, se estableció en la fase I (control de la oxidación).

e. Descripción de la unidad experimental

Cada unidad experimental consistió en un frasco de 100 ml, cada uno de los cuales contenía 25 ml de medio de cultivo, con los reguladores de crecimiento correspondientes (según tratamiento) y una yema axilar.

El número de unidades experimentales por cada medio basal de cultivo fue de 130, ya que fueron 13 tratamientos (incluyendo al testigo absoluto, al que no se le aplicó ninguna dosis de reguladores del crecimiento), con 10 repeticiones cada uno.

Cuadro 11. Descripción de los tratamientos utilizados en la fase de multiplicación para el medio basal de Almehdi y Parfitt (AP).

MEDIO DE CULTIVO	COMBINACIÓN DE REGULADORES DEL CRECIMIENTO	
	BAP mg/l	IBA mg/l
Almehdi y Parfitt (AP)	0	0
	2	0.01
	2	0.1
	2	1.5
	4	0.01
	4	0.1
	4	1.5
	6	0.01
	6	0.1
	6	1.5
	8	0.01
	8	0.1
	8	1.5

Cuadro 12. Descripción de los tratamientos utilizados en la fase de multiplicación para el medio basal de Gamborg (B5).

MEDIO DE CULTIVO	COMBINACIÓN DE REGULADORES DEL CRECIMIENTO	
	BAP mg/l	IBA mg/l
Gamborg (B5)	0	0
	2	0.01
	2	0.1
	2	1.5
	4	0.01
	4	0.1
	4	1.5
	6	0.01
	6	0.1
	6	1.5
	8	0.01
	8	0.1
	8	1.5

Cuadro 13. Descripción de los tratamientos utilizados en la fase de multiplicación para el medio basal de Linsmaier y Skoog (LS).

MEDIO DE CULTIVO	COMBINACIÓN DE REGULADORES DEL CRECIMIENTO	
	BAP mg/l	IBA mg/l
Linsmaier y Skoog (LS)	0	0
	2	0.01
	2	0.1
	2	1.5
	4	0.01
	4	0.1
	4	1.5
	6	0.01
	6	0.1
	6	1.5
	8	0.01
	8	0.1
	8	1.5

f. Variables de respuesta

- i. Porcentaje de sobrevivencia de los explantes, las lecturas se tomaron a los 15, 30, 45 y 60 días después de sembrados los explantes. Para determinar el porcentaje de sobrevivencia se relacionó el número de unidades experimentales con explantes vivos, con el número de unidades experimentales iniciales

- ii. Porcentaje de brotación de las yemas axilares, se tomó lectura a los 15, 30, 45 y 60 días después de realizada la siembra.
- iii. Número de brotes, se tomó lectura a los 15, 30, 45 y 60 días después de realizada la siembra de las yemas axilares.

g. 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, debido a la naturaleza de los resultados. 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 combinaciones de reguladores del crecimiento: Ácido Indolbutírico (IBA) y Bencilaminopurina (BAP) que favorezcan la propagación *in vitro* del portainjerto *Nemaguard*.

C. Fase III, inducción de raíces en brotes obtenidos

a. Materiales

Se utilizó el medio basal de Gamborg (B5), que fue el medio que mostró una mejor respuesta en cuanto a: sobrevivencia en la fase II, el cual se preparó a diferentes concentraciones de sales: 100, 75, 50, y 25%. Los explantes utilizados fueron brotes obtenidos en la fase de multiplicación. A estos medios de cultivo se les agregó ácido indolbutírico (IBA), en las siguientes dosis: 0.1 mg/l, 0.5mg/l y 1.0mg/l; y además, se adicionó el antioxidante y su dosis (Polivinilpirrolidona a razón de 900 mg/l), que se utilizó en la fase II.

b. Inoculación

Con la ayuda de un bisturí se cortaron los brotes obtenidos en la fase II (de multiplicación), luego el brote se tomó con una pinza y se inoculó dentro del medio de cultivo (frasco de 100 ml), teniendo el cuidado de que éste quedara en la parte central del medio de cultivo; y por último el frasco se tapó cuidadosamente, el cual se encontraba identificado adecuadamente según el tratamiento que contenía y el número de repetición que le correspondía.

c. Incubación de los tejidos

Después de haber realizado la inoculación (siembra) de los explantes en sus respectivas unidades experimentales, se trasladaron al cuarto de incubación, el cual está equipado con una fuente de luz proporcionada por lámparas fluorescentes de luz blanca con una intensidad de 1000 a 3000 lux; la temperatura media del cuarto es de 25 °C; con un fotoperíodo programado de 16 horas de luz y 8 de oscuridad. Cuyas condiciones son las propicias para el desarrollo de los explantes.

d. Descripción de los tratamientos

Los tratamientos que se realizaron en la fase de enraizamiento, fueron las combinaciones que se dieron entre las diferentes concentraciones de sales (75, 50 y 25%) del medio basal de Gamborg (B5) y las diferentes dosis (0.1 mg/l, 0.5 mg/l y 1.0 mg/l) de ácido indolbutírico utilizadas, dichas combinaciones se pueden observar en el cuadro 14. Para el caso del testigo absoluto se utilizó el medio basal de Gamborg (B5) al 100% de concentración de sales con 0 mg/l de ácido indolbutírico.

Cuadro 14. Descripción de los tratamientos utilizados en la fase de enraizamiento.

TRATAMIENTO	CONCENTRACIÓN DE SALES DEL MEDIO BASAL DE GAMBORG (B5) EN %	ACIDO INDOL BUTÍRICO mg/l
T1	100	0.0
T2	75	0.1
T3	50	0.1
T4	25	0.1
T5	75	0.5
T6	50	0.5
T7	25	0.5
T8	75	1.0
T9	50	1.0
T10	25	1.0

e. Descripción de la unidad experimental

Cada unidad experimental consistió en un frasco de 100 ml, cada uno de los cuales contenía 25 ml del medio de cultivo, con su respectivo tratamiento (según la concentración de sales y la dosis de ácido

indolbutírico que le correspondía). También como parte de la unidad experimental se utilizó un brote obtenido en la fase de multiplicación.

El número de unidades experimentales fue de 40, ya que fueron 10 tratamientos (incluyendo al testigo absoluto, el cual fue el medio de Gamborg (B5) al 100% de sales y sin ácido indolbutírico (IBA)), con 4 repeticiones cada uno.

f. Variables de respuesta

La toma de datos se realizó a los 15 y 30 días después de haber inoculado los brotes, las variables de respuesta que se tomaron en consideración para medir el efecto de los tratamientos fueron las siguientes:

- i. Porcentaje de brotes enraizados: se relacionó el número de brotes que emitieron raíz, con el número total de brotes por tratamiento.
- ii. Número de raíces por planta: se realizó el conteo de raíces por cada una de las plantas que logró enraizar.
- iii. Longitud de la raíz más larga: se midió la raíz más larga y la longitud se expresó en mm.

g. 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, debido a la naturaleza de los resultados. 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 al enraizamiento, empleando dosis del regulador del crecimiento: Ácido Indolbutírico que favorezca el enraizamiento "*in vitro*" del portainjerto *Nemaguard*.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 FASE DE CONTROL DE LA OXIDACIÓN

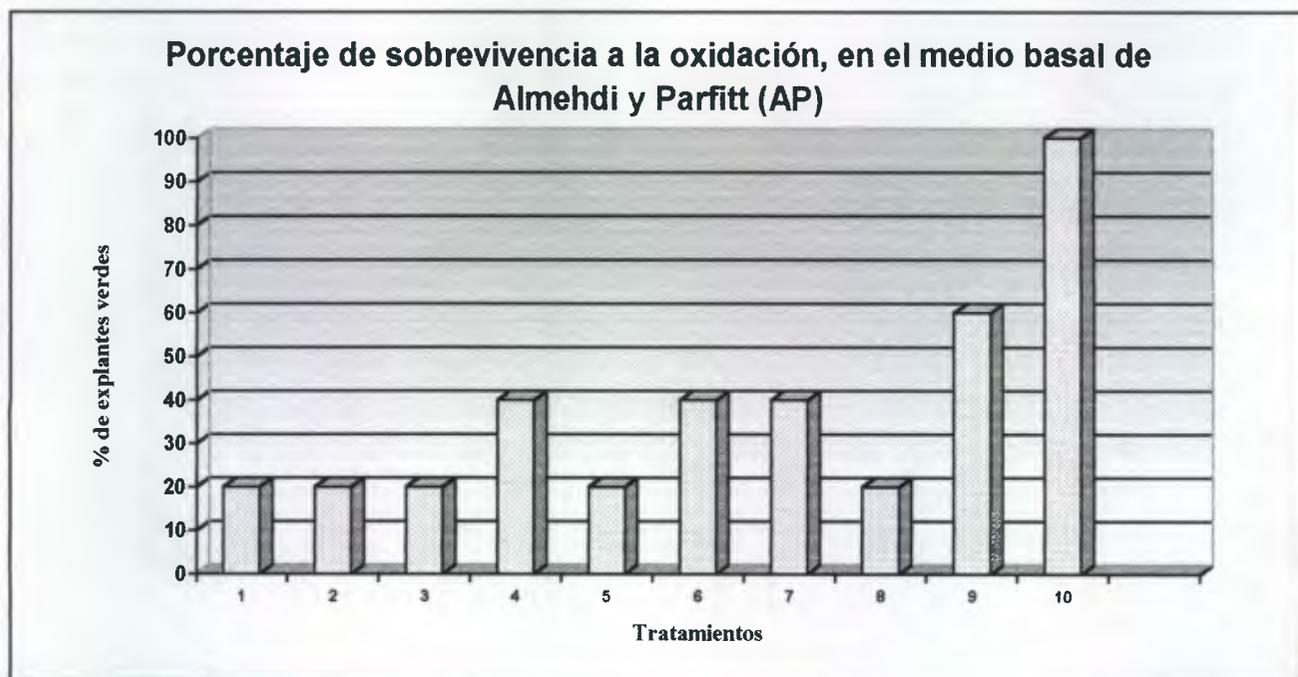
Para controlar la oxidación de los explantes del portainjerto Nemaguard, se probaron tres antioxidantes con el objetivo de establecer el que controlara en mayor grado la oxidación de los explantes. Al final se pudo establecer que el antioxidante que controló en mayor grado la oxidación fue el polivinilpirrolidona (PVP) y el antioxidante que menos la controló fue el ácido cítrico (AC), por lo menos en los tratamientos evaluados en esta investigación. Con respecto a la oxidación, Monsella mencionado por Azpeitia (2), dice que: "El melocotón se considera una especie difícil de propagar por medio de cultivo de tejidos debido a diversos factores que afectan la adaptación del explante a condiciones *in vitro* y uno de estos factores es la oxidación". George (12), menciona que "el ennegrecimiento de corte de muchos explantes comienza a ocurrir justo después de la escisión. Los explantes, o partes de ellos, frecuentemente continúan oscureciendo cuando son introducidos dentro del medio de cultivo, donde pueden también exudar sustancias coloreadas oscuras hacia el medio. Este tipo de ennegrecimiento es asociado con la cortadura. No todos los compuestos producidos son inhibitorios, pero con frecuencia se ha encontrado que una vez ocurre el oscurecimiento, el crecimiento es inhibido y los tejidos pueden morir a menos que se tomen medidas para remediarlo".

7.1.1 Control de la oxidación en el medio basal de Almehdi y Parfitt (AP)

Cuadro 15. Comportamiento de los explantes del portainjerto Nemaguard, en la fase de control de la oxidación, en el medio basal de Almehdi y Parfitt (AP)

Medio Basal	antioxidante	Dosis Mg/l	Explantes Oxidados		Explantes Verdes	
			No.	%	No.	%
AP	TESTIGO	0	4	80	1	20
	AC	50	4	80	1	20
		100	4	80	1	20
		150	3	60	2	40
		2,000	4	80	1	20
	CA	5,000	3	60	2	40
		10,000	3	60	2	40
		100	4	80	1	20
	PVP	500	2	40	3	60
		900	0	0	5	100

En el cuadro 15 así como en la figura 1, se puede observar que el antioxidante polivinilpirrolidona (PVP) en la dosis de 900 mg/l fue el que presentó una mayor efectividad, ya que ninguna de las repeticiones presentó oxidación por lo que se obtuvo el 100% de explantes verdes. Los tratamientos que menos efectividad presentaron fueron: el ácido cítrico (AC) en las dosis de 50 y 100 mg/l, así como también el carbón activado (CA) en la dosis de 2000 mg/l. En cuanto a la efectividad del antioxidante también podría afectar la edad del explante, ya que algunas especies responden mejor si se utilizan explantes de reciente formación y algunas especies responden mejor si se utilizan explantes altamente lignificados.



Referencia: T1 (Sin antioxidantes), T2 (50 mg/l de AC), T3 (100 mg/l de AC), T4 (150 mg/l de AC), T5 (2,000 mg/l de CA), T6 (5,000 mg/l de CA), T7 (10,000 mg/l de CA), T8 (100 mg/l de PVP), T9 (500 mg/l de PVP), T10 (900 mg/l de PVP).
 AC: Ácido Cítrico; CA: Carbón Activado; PVP: Polivinilpirrolidona.

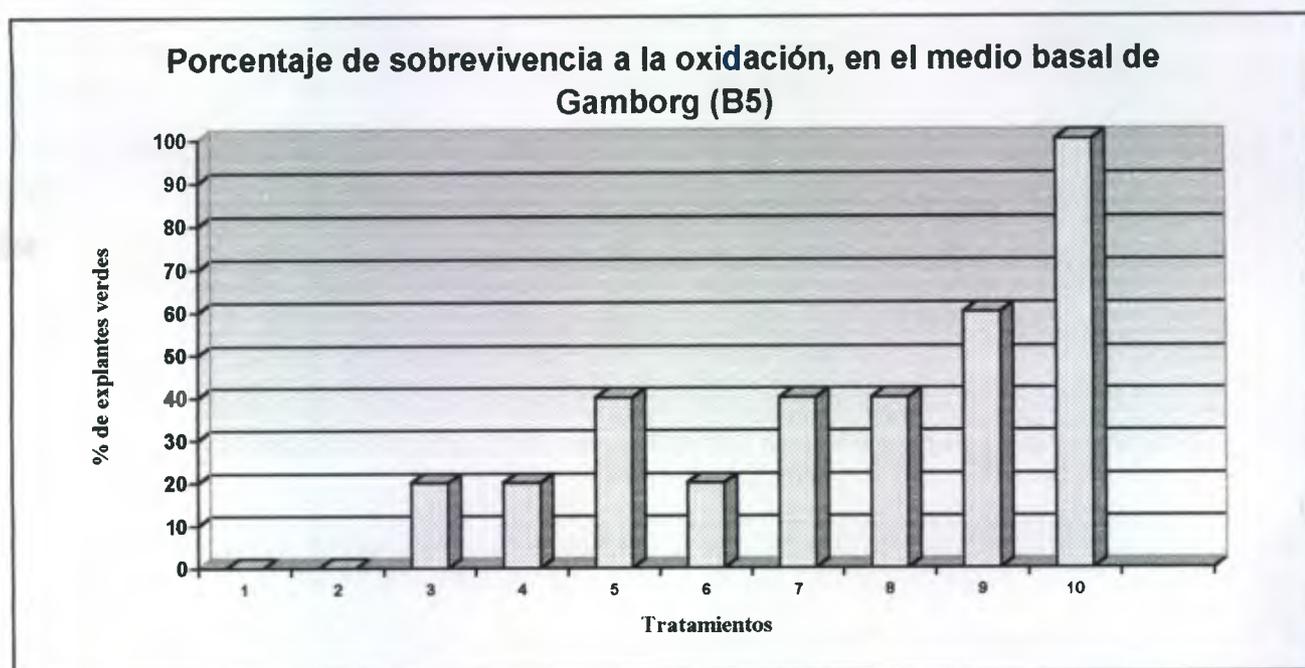
Figura 1. Efecto de antioxidantes en el control de la oxidación, en el medio de Almehdi y Parfitt (AP).

7.1.2 Control de la oxidación en el medio basal de Gamborg (B5)

En el cuadro 16 así como en la figura 2, se puede observar que el antioxidante polivinilpirrolidona (PVP) en la dosis de 900 mg/l fue el que controló en mayor grado la oxidación, ya que se obtuvo el 100% de explantes verdes, no observándose oxidación en algún explante. El antioxidante que presentó menor efectividad fue el ácido cítrico (AC), ya que como se puede observar, se dio entre un 80% y 100% de oxidación en sus diferentes dosis.

Cuadro 16. Comportamiento de los explantes del portainjerto Nemaguard, en la fase de control de la oxidación, en el medio basal de Gamborg (B5)

Medio Basal	Antioxidante	Dosis mg/l	Explantes Oxidados		Explantes Verdes	
			No.	%	No.	%
B5	TESTIGO	0	5	100	0	0
	AC	50	5	100	0	0
		100	4	80	1	20
		150	4	80	1	20
	CA	2,000	3	60	2	40
		5,000	4	80	1	20
		10,000	3	60	2	40
	PVP	100	3	60	2	40
		500	2	40	3	60
		900	0	0	5	100



Referencia: T1 (Sin antioxidantes), T2 (50 mg/l de AC), T3 (100 mg/l de AC), T4 (150 mg/l de AC), T5 (2,000 mg/l de CA), T6 (5,000 mg/l de CA), T7 (10,000 mg/l de CA), T8 (100 mg/l de PVP), T9 (500 mg/l de PVP), T10 (900 mg/l de PVP).
AC: Ácido Cítrico; CA: Carbón Activado; PVP: Polivinilpirrolidona.

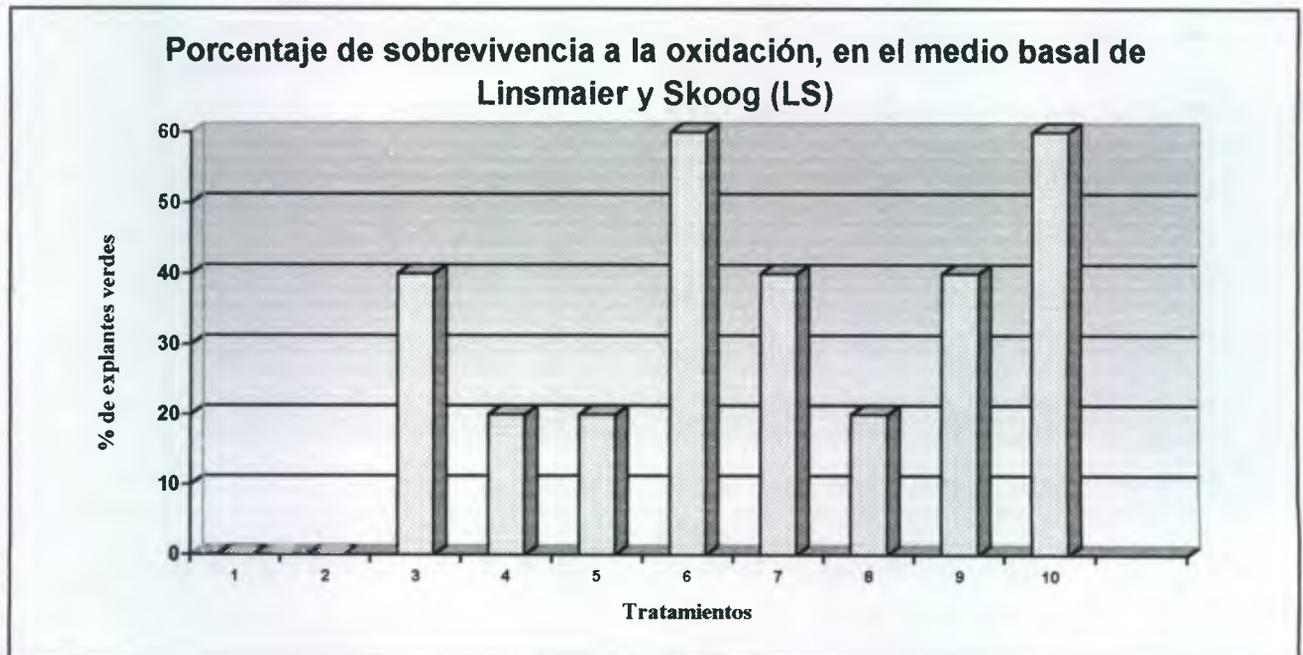
Figura 2. Efecto de antioxidantes en el control de la oxidación, en el medio de Gamborg (B5).

7.1.3 Control de la oxidación en el medio basal de Linsmaier y Skoog (LS)

Cuadro 17. Comportamiento de los explantes del portainjerto Nemaguard, en la fase de control de la oxidación, en el medio basal Linsmaier y Skoog (LS).

Medio Basal	Antioxidante	Dosis mg/l	Explantes Oxidados		Explantes Verdes	
			No.	%	No.	%
LS	TESTIGO	0	5	100	0	0
	AC	50	5	100	0	0
		100	3	60	2	40
		150	4	80	1	20
	CA	2,000	4	80	1	20
		5,000	2	40	3	60
		10,000	3	60	2	40
	PVP	100	4	80	1	20
		500	3	60	2	40
		900	2	40	3	60

El cuadro 17 muestra que los mejores tratamientos fueron el polivinilpirrolidona (PVP) a la dosis de 900 mg/l y el carbón activado (CA) a la dosis de 5000 mg/l, ambos tratamientos presentaron un 60% de explantes verdes, por lo que son las mejores dosis en comparación con las demás de estos mismos antioxidantes. El antioxidante que menos controló la oxidación fue el ácido cítrico en sus tres dosis. Como se puede observar en la figura 3.



Referencia: T1 (Sin antioxidantes), T2 (50 mg/l de AC), T3 (100 mg/l de AC), T4 (150 mg/l de AC), T5 (2,000 mg/l de CA), T6 (5,000 mg/l de CA), T7 (10,000 mg/l de CA), T8 (100 mg/l de PVP), T9 (500 mg/l de PVP), T10 (900 mg/l de PVP).
AC: Ácido Cítrico; CA: Carbón Activado; PVP: Polivinilpirrolidona.

Figura 3. Efecto de antioxidantes en el control de la oxidación, en el medio de Linsmaier y Skoog (LS)

Después de analizar los resultados obtenidos en los tres medios de cultivo, se logró determinar que el antioxidante que mejor controló la oxidación fue el polivinilpirrolidona (PVP) en la dosis de 900 mg/l, este mismo antioxidante en la dosis de 500 mg/l controló la oxidación en segundo lugar. El antioxidante que mejor controló la oxidación después del polivinilpirrolidona fue el carbón activado en las dosis de 5000 y 10000 mg/l. En cuanto a la efectividad del PVP posiblemente se le atribuya a que ésta es una poliamida utilizada 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 (45). En el cuadro 18 se pueden observar los mejores tratamientos para cada medio de cultivo.

Cuadro 18. Cuadro resumen de los mejores tratamientos de cada medio de cultivo, para la fase de control de la oxidación.

Medio Basal	Antioxidante	Dosis mg/l	Explantos Oxidados		Explantos Verdes	
			No.	%	No.	%
AP	PVP	900	0	0	5	100
B5	PVP	900	0	0	5	100
LS	PVP	900	2	40	3	60
	CA	5,000	2	40	3	60

7.2 FASE DE MULTIPLICACIÓN DE BROTES.

7.2.1 Comportamiento de los explantes en el medio nutritivo de Almehdi y Parfitt

A. Porcentaje de sobrevivencia de los explantes ante diversos factores

En el cuadro 19 se puede observar que los tratamientos que presentaron mayor sobrevivencia fueron: 2.0 mg/l de BAP + 0.01 mg/l de IBA y 2.0 mg/l de BAP + 0.1 mg/l de IBA. En la última lectura, efectuada a los 60 días después de inoculados los explantes, 8 explantes vivos por cada tratamiento indican que fueron los menos afectados tanto por microorganismos, oxidación y por efectos de la concentración de los reguladores del crecimiento. A la vez se observa que la contaminación en el tratamiento 2.0 mg/l de BAP + 0.01 mg/l de IBA se presentó únicamente en los primeros 15 días, luego ya no se observó; la muerte de los explantes por toxicidad en este tratamiento no se observó, por lo que se indica que 8 explantes presentaron condiciones favorables para el desarrollo de la brotación. En el tratamiento 2.0 mg/l de BAP + 0.1 mg/l de IBA se observó que un explante resulto contaminado, esto probablemente se atribuye a la presencia de microorganismos endógenos, ya que estos son los más difíciles de eliminar, de igual forma la oxidación se hizo presente en un explante. En la figura 4 se pueden observar las características de un explante que presentó sobrevivencia.

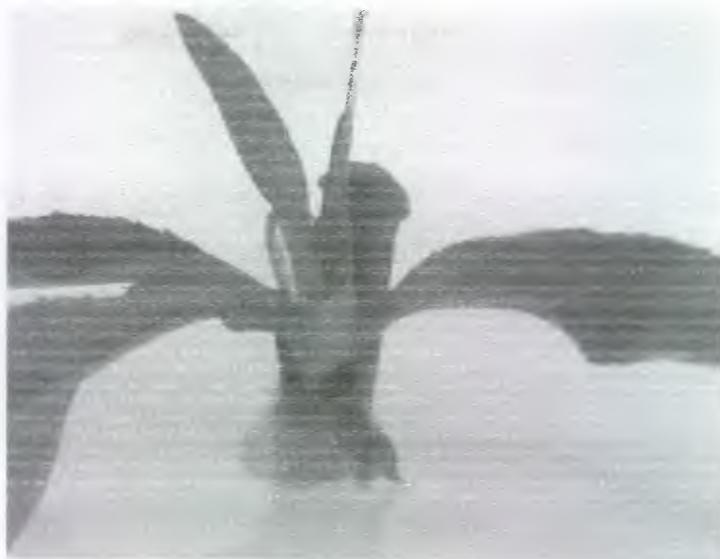


Figura 4. Explante que presentó sobrevivencia en el medio basal de Almehdi y Parfitt.

Cuadro 19. Sobrevivencia de los explantes del portainjerto Nemaguard, en la fase de multiplicación, en el medio basal de Almehdi y Parfitt (AP).

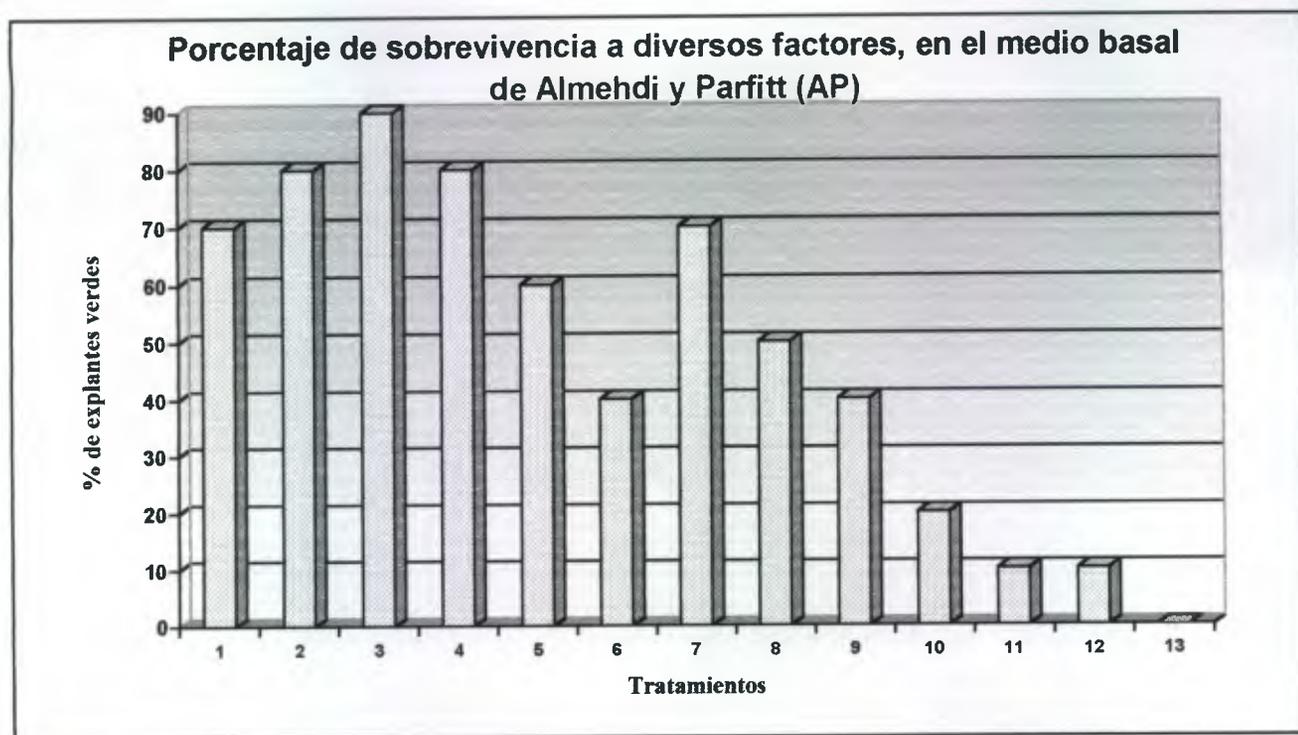
Tratamiento Dosis (mg/l)	Porcentaje de Mortandad																% de Explantes Verdes			
	% de Contaminación				% de Oxidación				% de Toxicidad				TOTAL							
	15 Días	30 D	45 D	60 D	15 D	30 D	45 D	60 D	15 D	30 D	45 D	60 D	15 D	30 D	45 D	60 D	15 D	30 D	45 D	60 D
0 BAP + 0 IBA	20	30	30	30	0	0	0	0	0	0	0	0	20	30	30	30	80	70	70	70
2 BAP + 0.01 IBA	20	20	20	20	0	0	0	0	0	0	0	0	20	20	20	20	80	80	80	80
2 BAP + 0.1 IBA	0	10	10	10	0	0	10	10	0	0	0	0	0	10	20	20	100	90	80	80
2 BAP + 1.5 IBA	0	0	10	10	0	20	30	30	0	0	0	0	0	20	40	40	100	80	60	60
4 BAP + 0.01 IBA	0	10	10	10	0	30	30	40	0	0	0	0	0	40	40	50	100	60	60	50
4 BAP + 0.1 IBA	0	10	10	10	0	30	30	30	10	20	20	20	10	60	60	60	90	40	40	40
4 BAP + 1.5 IBA	10	10	10	10	0	10	20	20	0	10	10	10	10	30	40	40	90	70	60	60
6 BAP + 0.01 IBA	10	10	10	10	0	10	20	30	20	30	30	30	30	50	60	70	70	50	40	30
6 BAP + 0.1 IBA	0	0	0	0	0	10	10	10	40	50	50	50	40	60	60	60	60	40	40	40
6 BAP + 1.5 IBA	0	0	0	0	0	10	10	10	30	70	80	80	30	80	90	90	70	20	10	10
8 BAP + 0.01 IBA	10	20	20	20	10	30	30	30	30	40	40	40	50	90	90	90	50	10	10	10
8 BAP + 0.1 IBA	10	30	30	30	0	10	10	10	40	50	50	50	50	90	90	90	50	10	10	10
8 BAP + 1.5 IBA	10	20	20	20	0	0	0	0	60	80	80	80	70	100	100	100	30	0	0	0

El tratamiento que presentó mayor porcentaje de mortandad fue: 8.0 mg/l de BAP + 1.5 mg/l de IBA, en el cuadro 19 se puede observar que la muerte de los explantes fue progresiva. A los 15 días, 7 explantes murieron y de éstos, 6 explantes posiblemente murieron debido al efecto de la concentración de los reguladores empleados, el otro explante murió debido a la contaminación por microorganismos. La segunda lectura nos muestra que la contaminación aumentó en una unidad experimental, al igual que la mortandad por el efecto de los reguladores del crecimiento, que de 6 explantes muertos se elevó a 8. Por lo que en la lectura

final, efectuada a los sesenta días después de sembrados los explantes, se observó una mortandad del 100 por ciento.

En el tratamiento testigo (0 mg/l de BAP + 0 mg/l de IBA), se observa que la contaminación se hizo presente en 3 explantes, que al final repercutió en que se contó con 7 explantes aptos para la brotación. La muerte por oxidación no se observó, al igual que por toxicidad debida a los reguladores del crecimiento, ya que este tratamiento no contenía reguladores del crecimiento, lo cual demuestra que no fueron los componentes del medio utilizado los que afectaron a los explantes, sino que fueron otros factores como la concentración de los reguladores del crecimiento utilizados.

En los tratamientos en los que se observó un mayor porcentaje de sobrevivencia a los 30 días fueron en los que se utilizaron 2 mg/l de BAP como puede observarse en la figura 5.



Referencia: T1 (0 mg/l de BAP + 0 mg/l de IBA), T2 (2 mg/l de BAP + 0.01 mg/l de IBA), T3 (2 mg/l de BAP + 0.1 mg/l de IBA), T4 (2 mg/l de BAP + 1.5 mg/l de IBA), T5 (4 mg/l de BAP + 0.01 mg/l de IBA), T6 (4 mg/l de BAP + 0.1 mg/l de IBA), T7 (4 mg/l de BAP + 1.5 mg/l de IBA), T8 (6 mg/l de BAP + 0.01 mg/l de IBA), T9 (6 mg/l de BAP + 0.1 mg/l de IBA), T10 (6 mg/l de BAP + 1.5 mg/l de IBA), T11 (8 mg/l de BAP + 0.01 mg/l de IBA), T12 (8 mg/l de BAP + 0.1 mg/l de IBA), T13 (8 mg/l de BAP + 1.5 mg/l de IBA).

BAP: Bencilaminopurina; **IBA:** Ácido Indolbutírico.

Figura 5. Sobrevivencia de los explantes a los 30 días, en la fase de multiplicación de brotes en el medio basal de Almehdi y Parfitt (AP).

Los resultados en cuanto a contaminación, son satisfactorios, ya que Ramírez (26), en su estudio sobre micropropagación de materiales de frutales deciduos tratados con radiación, para lo cual utilizo varetas de árboles del melocotón cv. Salcajá establecidos en el campo, no tuvo éxito en la regeneración de plantas, ya que tuvo un 100% de contaminación. Caso que no se dio en esta investigación, esto se le podría atribuir al tratamiento con antibióticos y funguicidas, que se le dio a los árboles previo a la inoculación, además de la desinfección a nivel de laboratorio. Ver cuadro 20.

B. Porcentaje de brotación de yemas en el medio nutritivo de Almehdi y Parfitt

a. Brotación de yemas a los 15 días

La combinación de reguladores del crecimiento que mostró una mejor respuesta en cuanto al porcentaje de brotación fue el tratamiento 2.0 mg/l de BAP + 0.1 mg/l de IBA, que de las 10 unidades experimentales, 9 explantes brotaron y 1 aunque estaba verde no respondió, esto a los 15 días después de inoculados los mismos. Ver cuadro 20.

En los tratamientos 0 mg/l de BAP + 0 mg/l de IBA y 2 mg/l de BAP + 0.01 mg/l de IBA se pudo observar que de 8 explantes vivos que se tenían en cada tratamiento, todos estos brotaron y esto se observó a los quince días después de inocularlos en las unidades experimentales, teniéndose con esto un 80 por ciento de brotación, ya que para determinar este porcentaje se tomó en cuenta el número original de unidades experimentales que fue de 10. En el tratamiento 4 mg/l de BAP + 0.01 mg/l de IBA, de los 10 explantes, 8 brotaron a los quince días.

Por otro lado el tratamiento que mostró escasa brotación de las yemas axilares fue el tratamiento 8 mg/l de BAP + 1.5 mg/l de IBA. A los 15 días de inoculadas las yemas, solamente una brotó y este número no se incrementó, sin embargo, hubo explantes que presentaron sobrevivencia, pero estos no brotaron, probablemente se deba a la concentración de los reguladores del crecimiento utilizados.

El resto de tratamientos se caracterizaron por presentar al menos dos o más explantes brotados, sin embargo, estos no fueron superiores al resto de tratamientos.

b. Brotación de yemas a los 30 días

A los 30 días se observó en los tratamientos 2 mg/l de BAP + 1.5 mg/l de IBA y 4 mg/l de BAP + 1.5 mg/l de IBA, un incremento en cuanto al número de explantes brotados que de 5 observados a los 15 días, se incrementó a 7. En el tratamiento 6 mg/l de BAP + 0.1 mg/l de IBA, se incrementó de 4 a 5 yemas brotadas. En el resto de tratamientos no hubo incremento en el porcentaje de explantes brotados.

Cuadro 20. Porcentaje de brotación de las yemas axilares del portainjerto Nemaguard, en el medio basal de Almehdi y Parfitt (AP).

Tratamiento	% de brotación de la yema axilar				% de explantes verdes sin respuesta			
	15 Días	30 Días	45 Días	60 Días	15 Días	30 Días	45 Días	60 Días
Dosis (mg/l)								
0.0 BAP + 0.0 IBA	80	80	80	80	0	0	0	0
2.0 BAP + 0.01 IBA	80	80	80	80	0	0	0	0
2.0 BAP + 0.1 IBA	90	90	90	90	10	10	0	0
2.0 BAP + 1.5 IBA	50	70	70	70	50	10	0	0
4.0 BAP + 0.01 IBA	80	80	80	80	20	0	0	0
4.0 BAP + 0.1 IBA	50	50	50	50	40	0	0	0
4.0 BAP + 1.5 IBA	50	70	70	70	40	0	0	0
6.0 BAP + 0.01 IBA	40	40	40	40	30	10	10	0
6.0 BAP + 0.1 IBA	40	50	50	50	20	0	0	0
6.0 BAP + 1.5 IBA	20	20	30	30	50	20	0	0
8.0 BAP + 0.01 IBA	20	20	20	20	30	0	0	0
8.0 BAP + 0.1 IBA	30	30	30	30	20	0	0	0
8.0 BAP + 1.5 IBA	10	10	10	10	20	0	0	0

c. Brotación de yemas a los 45 días

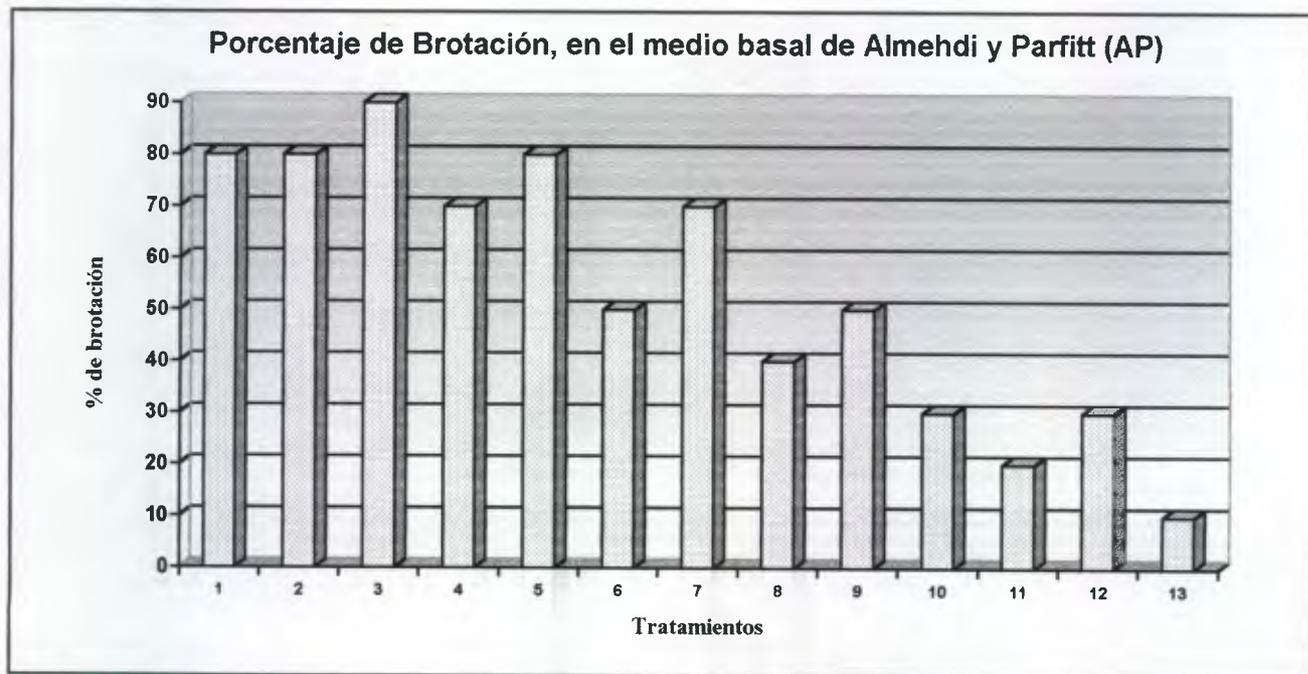
Sólo en el tratamiento 6 mg/l de BAP + 1.5 mg/l de IBA, se observó un incremento en cuanto a brotación, que de 2 yemas brotadas se incrementó a 3.

d. Brotación de yemas a los 60 días

En esta lectura no se registró ningún incremento en cuanto a la brotación y la mayor brotación se observó durante los primeros 15 días, disminuyendo durante los siguientes 15 días.

Como puede observarse en el cuadro 20 los niveles bajos de reguladores del crecimiento en combinación (BAP e IBA), favorecieron a la brotación no así en las combinaciones altas donde afectó

directamente al explante, esto coincide con lo reportado por Azpeitia (2), quien observó que los niveles altos de BAP indujeron necrosis del tallo en las yemas de melocotón de la selección 66 (tardía) y la selección 50 (intermedia). El comportamiento de la brotación en esta lectura, se puede observar en la figura 6.



Referencia: T1 (0 mg/l de BAP + 0 mg/l de IBA), T2 (2 mg/l de BAP + 0.01 mg/l de IBA), T3 (2 mg/l de BAP + 0.1 mg/l de IBA), T4 (2 mg/l de BAP + 1.5 mg/l de IBA), T5 (4 mg/l de BAP + 0.01 mg/l de IBA), T6 (4 mg/l de BAP + 0.1 mg/l de IBA), T7 (4 mg/l de BAP + 1.5 mg/l de IBA), T8 (6 mg/l de BAP + 0.01 mg/l de IBA), T9 (6 mg/l de BAP + 0.1 mg/l de IBA), T10 (6 mg/l de BAP + 1.5 mg/l de IBA), T11 (8 mg/l de BAP + 0.01 mg/l de IBA), T12 (8 mg/l de BAP + 0.1 mg/l de IBA), T13 (8 mg/l de BAP + 1.5 mg/l de IBA).

BAP: Bencilaminopurina; **IBA:** Ácido Indolbutírico.

Figura 6. Efecto de la concentración de Bencilaminopurina (BAP) y Ácido Indolbutírico (IBA) en el porcentaje de brotación de yemas a los 60 días, en el medio basal de Almehdi y Parfitt (AP).

En el cuadro 20, se puede observar que el porcentaje de brotación va en aumento en algunos casos en lecturas posteriores. A pesar de que en el porcentaje de mortandad del cuadro 19 muestra que muchos de éstos murieron, pero lo que se hizo fue llevar una lectura acumulada en este caso debido a que el porcentaje se determinó siempre en relación a los 10 explantes sembrados originalmente. Lo que interesaba en este caso era determinar si brotaban o no.

En este estudio se obtuvo que el tratamiento que indujo un mayor porcentaje de brotación fue la combinación 2 mg/l de BAP + 0.1 mg/l de IBA con un 90 % de brotación, dato que no coincide con lo

reportado por Cabrera (4) para la variedad de melocotón Salcajá, quien obtuvo que el mayor porcentaje de brotación se dio con 4 mg/l de IBA + 0.01 mg/l de IBA.

Azpeitia y colaboradores (2), en su estudio de propagación in vitro del melocotón de las variedades S-50 y S-66, obtuvieron que el medio de Almehdi y Parfitt fue el que dio una mejor respuesta en cuanto al porcentaje de brotación, así como el que dio mayor grado de multiplicación, comparado con otros medios de cultivo.

C. Número de brotes

Cuadro 21. Número de brotes a los 15, 30, 45 y 60 días después de inoculados los explantes del portainjerto Nemaguard, en el medio basal de Almehdi y Parfitt (AP).

Tratamiento	Número de explantes vivos Brotados				Número de brotes por tratamiento				Número de explantes vivos Sin respuesta			
	15 Días	30 Días	45 Días	60 Días	15 Días	30 Días	45 Días	60 Días	15 Días	30 Días	45 Días	60 Días
0.0 BAP + 0.0 IBA	8	7	7	7	8	7	7	7	0	0	0	0
2.0 BAP + 0.01 IBA	8	8	8	8	8	18	20	21	0	0	0	0
2.0 BAP + 0.1 IBA	9	8	8	8	9	19	19	19	1	1	0	0
2.0 BAP + 1.5 IBA	5	7	6	6	5	10	9	9	5	1	0	0
4.0 BAP + 0.01 IBA	8	6	6	5	8	10	10	9	2	0	0	0
4.0 BAP + 0.1 IBA	5	4	4	4	5	9	9	9	4	0	0	0
4.0 BAP + 1.5 IBA	5	7	6	6	5	8	7	7	4	0	0	0
6.0 BAP + 0.01 IBA	4	4	3	3	4	8	5	5	3	1	1	0
6.0 BAP + 0.1 IBA	4	4	4	4	4	6	8	8	2	0	0	0
6.0 BAP + 1.5 IBA	2	0	1	1	2	0	1	2	5	2	0	0
8.0 BAP + 0.01 IBA	2	1	1	1	2	3	3	3	3	0	0	0
8.0 BAP + 0.1 IBA	3	1	1	1	3	2	2	2	2	0	0	0
8.0 BAP + 1.5 IBA	1	0	0	0	1	0	0	0	2	0	0	0

a. Número de brotes a los 15 días

A los 15 días no se observó incremento alguno en cuanto al número de brotes por cada explante, teniéndose únicamente la yema original de los explantes inoculados. Ver cuadro 21.

En el caso en que la yema axilar brotó, se contabilizó como un brote a la hora de tomar lecturas.

b. Número de brotes a los 30 días

A los 15 días únicamente se observó la yema original brotada, sin embargo, el incremento se observó a los 30 días después de inoculados los explantes en los medios de cultivo. La combinación de reguladores del crecimiento que produjo mayor número de brotes, fue la del tratamiento 2 BAP + 0.1 IBA, este tratamiento

produjo 19 brotes, en 8 explantes. A este tratamiento le siguió el de 2 mg/l BAP + 0.01 IBA, este produjo un total de 18 brotes, también en 8 explantes. Le siguieron los tratamientos 2 BAP + 1.5 IBA y 4 BAP + 0.01 IBA ambos con un total de 10 brotes. Los tratamientos: 4 mg/l de BAP + 0.1 mg/l de IBA y 6 mg/l de BAP + 0.01 mg/l de IBA, produjeron 9 y 8 brotes respectivamente, en un número de 4 explantes cada uno. Los tratamientos 4 mg/l de BAP + 1.5 mg/l de IBA y 6 mg/l de BAP + 0.1 mg/l de IBA no mostraron algún incremento significativo en cuanto al número de brotes formados. En cuanto al testigo, éste presentó 7 brotes en 7 explantes, cuyos brotes procedieron de la yema original. Los tratamientos 8 mg/l de BAP + 0.01 mg/l de IBA y 8 mg/l de BAP + 0.1 mg/l de IBA también produjeron más de un brote, pero en ambos casos, solo quedó un explante vivo. En la figura 8 se puede observar el comportamiento de la brotación a los 30 días.

Se puede observar que la mayor cantidad de brotes se obtuvo en el rango de 2.0 y 4.0 mg/l de BAP (en la figura 7 se puede observar un explante que presentó 2 brotes), ya que en los tratamientos donde el BAP y el IBA se incrementó, la respuesta en cuanto a la formación de brotes fue escasa, o no se presentó, además de que muchos explantes murieron debido a las altas dosis de reguladores del crecimiento. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Cabrera (4) quien multiplicó melocotón de la variedad Salcajá, el cual utilizando el medio Almehdi y Parfitt obtuvo que la mejor combinación fue la de 4.0 mg/l de BAP + 0.01 mg/l de IBA.

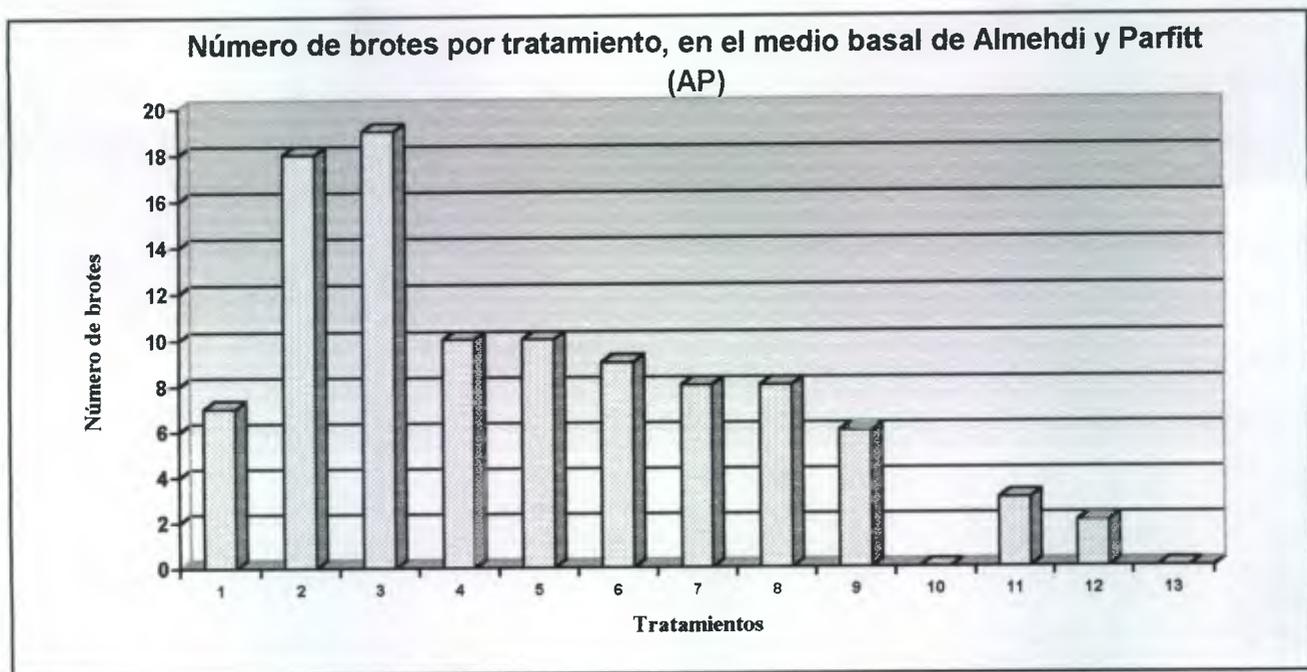


Figura 7. Fotografía que muestra la formación de brotes en el medio basal de Almehdi y Parfitt.

c. Número de brotes a los 45 días

A los 45 días de inoculados los explantes, en el tratamiento 2 mg/l BAP + 0.01 mg/l de IBA se observaron 20 brotes, en un total de 8 explantes. En el tratamiento 6 mg/l de BAP + 0.1 mg/l de IBA también se observa un incremento en cuanto al número de brotes, que de 6 brotes se incrementó a 8, esto para cuatro unidades experimentales que presentaron respuesta. El resto de tratamientos no produjeron cambio alguno en cuanto a la formación de brotes.

Es importante hacer notar que existió un decrecimiento en cuanto al número de brotes en los tratamientos 2 mg/l de BAP + 1.5 IBA, 4 mg/l de BAP + 1.5 mg/l de IBA y 6 mg/l de BAP + 0.01 mg/l de IBA, esto se debió a que en estos tratamientos hubo muerte de explantes ya sea por contaminación, oxidación o toxicidad por los reguladores del crecimiento, disminuyéndose así el número de brotes.



Referencia: T1 (0 mg/l de BAP + 0 mg/l de IBA), T2 (2 mg/l de BAP + 0.01 mg/l de IBA), T3 (2 mg/l de BAP + 0.1 mg/l de IBA), T4 (2 mg/l de BAP + 1.5 mg/l de IBA), T5 (4 mg/l de BAP + 0.01 mg/l de IBA), T6 (4 mg/l de BAP + 0.1 mg/l de IBA), T7 (4 mg/l de BAP + 1.5 mg/l de IBA), T8 (6 mg/l de BAP + 0.01 mg/l de IBA), T9 (6 mg/l de BAP + 0.1 mg/l de IBA), T10 (6 mg/l de BAP + 1.5 mg/l de IBA), T11 (8 mg/l de BAP + 0.01 mg/l de IBA), T12 (8 mg/l de BAP + 0.1 mg/l de IBA), T13 (8 mg/l de BAP + 1.5 mg/l de IBA).

BAP: Bencilaminopurina; **IBA:** Ácido Indolbutírico.

Figura 8. Efecto de la concentración de Bencilaminopurina (BAP) y Ácido Indolbutírico (IBA) en la formación de brotes a los 30 días, en el medio basal de Almehdi y Parfitt (AP).

d. Número de brotes a los 60 días

Se observó que en los únicos tratamientos en los que se incrementó el número de brotes fueron: 2 mg/l de BAP + 0.01 mg/l de IBA, en el que de 20 se incrementó a 21, de igual forma para el tratamiento 6 mg/l de BAP + 1.5 mg/l de IBA se incrementó de 1 brote a 2. En el resto de tratamientos no se observó aumento alguno en el número de brotes. Como aspecto relevante se observó que el número de brotes decreció en el tratamiento 4 mg/l de BAP + 0.01 mg/l de IBA, que de 10 brotes contabilizados en la tercera lectura, paso a tener 9 brotes en esta lectura, esta disminución, se debió a que un explante murió por oxidación. Cabrera (4), obtuvo que la dosis que le indujo el mayor número de brotes en el melocotón de la variedad Salcajá fue la de 4 mg/l de BAP, dato que no coincide con el de la presente investigación, en la que la dosis de BAP que produjo mayor número de brotes fue la de 2 mg/l. Azpeitia y colaboradores (2), obtuvieron que el mayor grado de multiplicación de brotes del durazno de la variedad S-50 se alcanzó con 6 mg/l de BAP, y en la variedad S-66 se alcanzo con 4 mg/l de BAP.

e. Explantes vivos sin respuesta

A los 15 días de inoculadas las yemas axilares, se observó que de los tratamientos 2 mg/l de BAP + 0.1 mg/l de IBA al de 8 mg/l de BAP + 1.5 mg/l de IBA, existían explantes vivos que aún no habían brotado, cuyos datos se pueden observar en el cuadro 21. A los 30 días aún se observaron explantes verdes que no respondieron a la brotación, en los tratamientos 2 mg/l de BAP + 0.1 mg/l de IBA, 2 mg/l de BAP + 1.5 mg/l de IBA, 6 mg/l de BAP + 0.01 mg/l de IBA y 6 mg/l de BAP + 1.5 mg/l de IBA, estas probablemente no se encontraban en la edad fisiológica adecuada como para poder ser inducidas a la brotación en un medio artificial, es decir, las yemas se encontraban en estado de latencia.

7.2.2 Comportamiento de los explantes en el medio nutritivo de Gamborg (B5)

A. Porcentaje de sobrevivencia de los explantes ante diversos factores

En el cuadro 22 se observa que la contaminación afectó más a los tratamientos 4 mg/l de BAP + 1.5 mg/l de IBA y 6 mg/l de BAP + 0.01 mg/l de IBA a los 60 días, con un 30 por ciento. En los tratamientos en los que no se observó contaminación fueron: 2 mg/l de BAP + 1.5 mg/l de IBA, 4 mg/l de BAP + 0.1 mg/l de IBA y 6 mg/l de BAP + 0.1 mg/l de IBA, estos tratamientos se caracterizaron por tener cero por ciento de contaminación. En el resto de tratamientos se observó de un 10 a un 20 por ciento de contaminación.

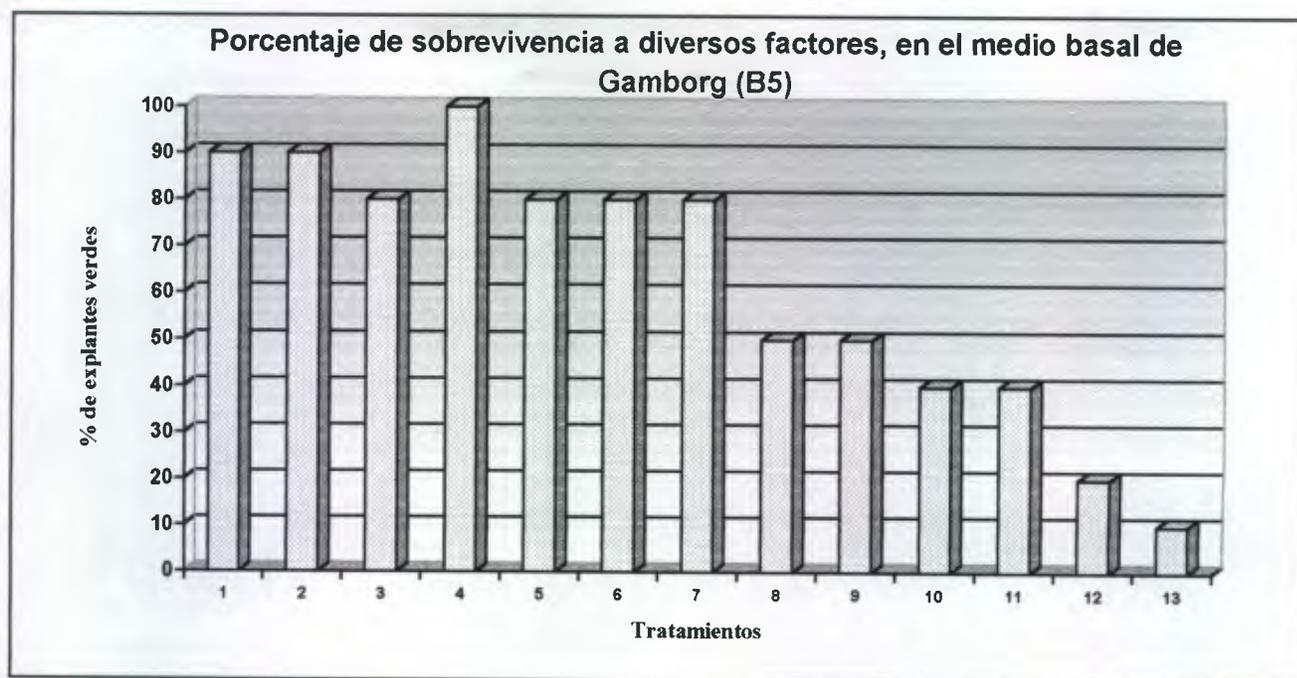
El porcentaje de oxidación fue nula en los tratamientos 2 mg/l de BAP + 0.01 mg/l de IBA, 2 mg/l de BAP + 0.1 mg/l de IBA, 2 mg/l de BAP + 1.5 mg/l de IBA y 8 mg/l de BAP + 0.01 mg/l de IBA, esto a los sesenta días después de haber inoculado los explantes. El resto de tratamientos presentó de un 10 a un 20 por ciento de oxidación.

Cuadro 22. Supervivencia de explantes del portainjerto Nemaguard en la fase de multiplicación de brotes, en el medio basal de Gamborg (B5).

Tratamiento Dosis (mg/l)	Porcentaje de Mortandad																% de Explantes Verdes							
	% de Contaminación				% de Oxidación				% de Toxicidad				TOTAL				15 D		30 D		45 D		60 D	
	15 D	30 D	45 D	60 D	15 D	30 D	45 D	60 D	15 D	30 D	45 D	60 D	15 D	30 D	45 D	60 D	15 D	30 D	45 D	60 D	15 D	30 D	45 D	60 D
0 BAP + 0 IBA	10	10	10	10	0	0	0	0	0	0	0	0	10	10	10	20	90	90	90	80				
2 BAP + 0.01 IBA	0	10	20	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10	20	20	100	90	80	80				
2 BAP + 0.1 IBA	20	20	20	20	0	0	0	0	0	0	0	0	20	20	20	20	80	80	80	80				
2 BAP + 1.5 IBA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	100	100	100				
4 BAP + 0.01 IBA	0	10	10	10	0	10	10	10	0	0	0	0	0	20	20	20	100	80	80	80				
4 BAP + 0.1 IBA	0	0	0	0	10	20	20	20	0	0	0	0	10	20	20	20	90	80	80	80				
4 BAP + 1.5 IBA	0	10	30	30	0	10	10	10	0	0	0	0	0	20	40	40	100	80	60	60				
6 BAP + 0.01 IBA	10	20	30	30	0	10	10	10	0	20	20	20	10	50	60	60	90	50	40	40				
6 BAP + 0.1 IBA	0	0	0	0	10	20	20	20	20	30	30	30	30	50	50	50	70	50	50	50				
6 BAP + 1.5 IBA	10	10	10	10	10	10	10	10	20	40	40	40	40	60	60	60	60	40	40	40				
8 BAP + 0.01 IBA	10	10	10	10	0	0	0	0	40	50	50	50	50	60	60	60	50	40	40	40				
8 BAP + 0.1 IBA	10	20	20	20	10	20	20	20	20	40	40	40	40	80	80	80	60	20	20	20				
8 BAP + 1.5 IBA	0	10	10	10	0	10	10	10	60	70	70	70	60	90	90	90	40	10	10	10				

La mortandad de los explantes por toxicidad debido a los componentes del medio utilizado, Gamborg (B5), puede no ser la causante de este factor. Se observa claramente que a partir del tratamiento de 6 mg/l de BAP + 0.01 mg/l de IBA en adelante, los explantes sufrieron una alteración en cuanto a su coloración original que de un color verde pasaron a tener un color café, conforme fue aumentando la dosis de BAP, esto resulto ser letal para la supervivencia de los explantes, teniendo hasta un 70 por ciento de mortandad por este factor, lo cual se observó en el tratamiento 8 mg/l de BAP + 1.5 mg/l de IBA. En el resto de tratamientos afectados existió un incremento de 20 hasta llegar a un 50 por ciento de toxicidad, esto está directamente relacionado con la dosis de BAP utilizada, es decir, que a medida que se incrementó la dosis del mismo, la mortandad aumentó.

De los tres factores analizados, el que causo una mayor muerte de los explantes fue la toxicidad por el regulador del crecimiento BAP, a ello le siguió la muerte de explantes por la oxidación de los mismos y por último la contaminación de los explantes.



Referencia: T1 (0 mg/l de BAP + 0 mg/l de IBA), T2 (2 mg/l de BAP + 0.01 mg/l de IBA), T3 (2 mg/l de BAP + 0.1 mg/l de IBA), T4 (2 mg/l de BAP + 1.5 mg/l de IBA), T5 (4 mg/l de BAP + 0.01 mg/l de IBA), T6 (4 mg/l de BAP + 0.1 mg/l de IBA), T7 (4 mg/l de BAP + 1.5 mg/l de IBA), T8 (6 mg/l de BAP + 0.01 mg/l de IBA), T9 (6 mg/l de BAP + 0.1 mg/l de IBA), T10 (6 mg/l de BAP + 1.5 mg/l de IBA), T11 (8 mg/l de BAP + 0.01 mg/l de IBA), T12 (8 mg/l de BAP + 0.1 mg/l de IBA), T13 (8 mg/l de BAP + 1.5 mg/l de IBA).

BAP: Bencilaminopurina; **IBA:** Ácido Indolbutírico.

Figura 9. Sobrevivencia de los explantes en la fase de multiplicación de brotes a los 30 días, en el medio basal de Gamborg (B5).

B. Porcentaje de brotación de yemas en el medio nutritivo de Gamborg (B5)

a. Brotación de yemas a los 15 días

Los tratamientos que presentaron una mejor respuesta en esta lectura fueron: 2 mg/l de BAP + 0.01 mg/l de IBA y 2 mg/l de BAP + 1.5 mg/l de IBA, ambos con un 100 por ciento de brotación, les siguieron los tratamientos 4 mg/l de BAP + 0.01 mg/l de IBA y 4 mg/l de BAP + 1.5 mg/l de IBA con un 80 por ciento. El tratamiento 2 mg/l de BAP + 0.1 mg/l de IBA y 4 mg/l de BAP + 0.1 mg/l de IBA, con un 70 por ciento. El tratamiento 6 mg/l de BAP + 0.01 mg/l de IBA, con un 50 por ciento. El tratamiento 6 mg/l de BAP + 1.5 mg/l de IBA, con un 40 por ciento. El resto de tratamientos con un 30 por ciento. Es de hacer notar que en todos los tratamientos se presentó la brotación. Ver cuadro 23.

Cuadro 23. Porcentaje de brotación de las yemas axilares del portainjerto Nemaguard, en el medio basal de Gamborg (B5).

Tratamiento	% de brotación de la yema axilar				% de explantes verdes sin respuesta			
	15 Días	30 Días	45 Días	60 Días	15 Días	30 Días	45 Días	60 Días
0.0 BAP + 0.0 IBA	70	80	80	80	20	10	10	10
2.0 BAP + 0.01 IBA	100	100	100	100	0	0	0	0
2.0 BAP + 0.1 IBA	70	70	70	70	10	10	10	10
2.0 BAP + 1.5 IBA	100	100	100	100	0	0	0	0
4.0 BAP + 0.01 IBA	80	90	90	90	20	0	0	0
4.0 BAP + 0.1 IBA	70	90	90	90	20	0	0	0
4.0 BAP + 1.5 IBA	80	90	90	90	20	0	0	0
6.0 BAP + 0.01 IBA	50	70	70	70	40	0	0	0
6.0 BAP + 0.1 IBA	30	40	40	40	40	10	10	10
6.0 BAP + 1.5 IBA	40	50	50	50	20	0	0	0
8.0 BAP + 0.01 IBA	30	40	40	40	20	0	0	0
8.0 BAP + 0.1 IBA	30	30	30	30	30	0	0	0
8.0 BAP + 1.5 IBA	30	30	30	30	10	0	0	0

b. Brotación de yemas a los 30 días

Los tratamientos que incrementaron su porcentaje de brotación fueron: el testigo (0 mg/l de BAP + 0 mg/l de IBA), 4 mg/l de BAP + 0.01 mg/l de IBA, 4 mg/l de BAP + 0.1 mg/l de IBA, 4 mg/l de BAP + 1.5 mg/l de IBA, 6 mg/l de BAP + 0.01 mg/l de IBA, 6 mg/l de BAP + 0.1 mg/l de IBA, 6 mg/l de BAP + 1.5 mg/l de IBA y 8 mg/l de BAP + 0.01 de IBA. En el resto de tratamiento no se incrementó el número de explantes brotados.

c. Brotación de yemas a los 45 días

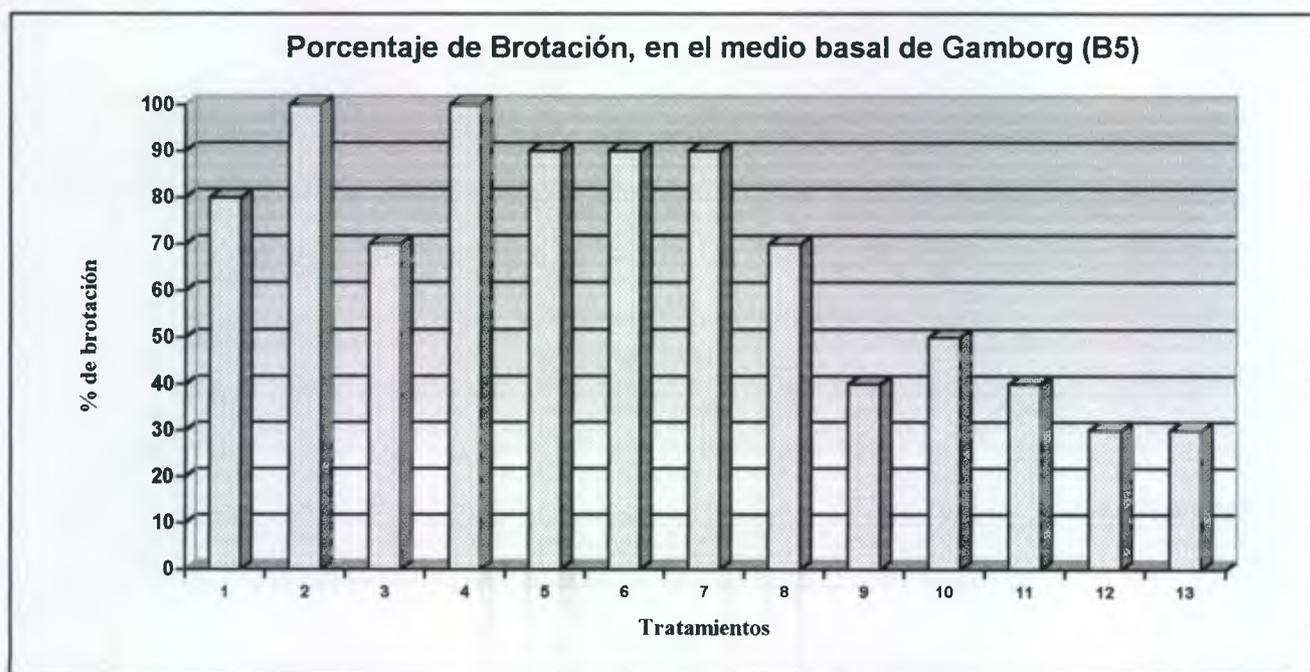
A los 45 días de inoculados los explantes, en ningún tratamiento se observó incremento en el porcentaje de brotación.

d. Brotación de yemas a los 60 días

Al igual que en la lectura anterior no se observó ningún cambio en cuanto al aumento del porcentaje de brotación.

Azpeitia y colaboradores (2), reportan que el medio de Almehdi y Parfitt, en el cultivo *in vitro* de las variedades de melocotón S-50 y S-66, fue en el que se logró un mayor porcentaje de brotación, lográndose un

porcentaje mayor que en el medio de Gamborg. Pero en el caso de esta investigación el medio B5 fue el que reportó mayor porcentaje de brotación, dando hasta un 100% de la misma. En la figura 10 se puede observar el comportamiento de la brotación a los 60 días.



Referencia: T1 (0 mg/l de BAP + 0 mg/l de IBA), T2 (2 mg/l de BAP + 0.01 mg/l de IBA), T3 (2 mg/l de BAP + 0.1 mg/l de IBA), T4 (2 mg/l de BAP + 1.5 mg/l de IBA), T5 (4 mg/l de BAP + 0.01 mg/l de IBA), T6 (4 mg/l de BAP + 0.1 mg/l de IBA), T7 (4 mg/l de BAP + 1.5 mg/l de IBA), T8 (6 mg/l de BAP + 0.01 mg/l de IBA), T9 (6 mg/l de BAP + 0.1 mg/l de IBA), T10 (6 mg/l de BAP + 1.5 mg/l de IBA), T11 (8 mg/l de BAP + 0.01 mg/l de IBA), T12 (8 mg/l de BAP + 0.1 mg/l de IBA), T13 (8 mg/l de BAP + 1.5 mg/l de IBA).

BAP: Bencilaminopurina; **IBA:** Ácido Indolbutírico.

Figura 10. Efecto de la concentración de Bencilaminopurina (BAP) y Ácido Indolbutírico (IBA) en el porcentaje de brotación de yemas a los 60 días, en el medio basal de Gamborg (B5).

C. Número de brotes

a. Número de brotes a los 15 días

En los tratamientos 2 mg/l de BAP + 0.01 mg/l de IBA y 2 mg/l de BAP + 1.5 mg/l de IBA, fue en los que se observó un mayor número de brotes, ambos con un total de 10 brotes, a ellos les siguieron los tratamientos 4 mg/l de BAP + 0.01 mg/l de IBA y 4 mg/l de BAP + 1.5 mg/l de IBA, con un número de 8 brotes cada uno. Los tratamientos: testigo, 2 mg/l de BAP + 0.1 mg/l de IBA y 4 mg/l de BPA + 0.1 mg/l de IBA, con 7 brotes. El tratamiento 6 mg/l de BAP + 0.01 mg/l de IBA, con 5 brotes. Estos fueron los tratamientos más

relevantes en cuanto a la multiplicación de brotes. Para el resto de tratamientos se observaron 3 y 4 brotes respectivamente. Ver cuadro 24.

Cuadro 24. Número de brotes a los 15, 30, 45 y 60 días después de inoculados los explantes del portainjerto Nemaguard, en el medio basal de Gamborg (B5).

Tratamiento	Número de explantes vivos Brotados				Número de brotes por tratamiento				Número de explantes vivos Sin respuesta			
	15 Días	30 Días	45 Días	60 Días	15 Días	30 Días	45 Días	60 Días	15 Días	30 Días	45 Días	60 Días
0.0 BAP + 0.0 IBA	7	8	8	7	7	8	8	7	2	1	1	1
2.0 BAP + 0.01 IBA	10	9	8	8	10	14	12	14	0	0	0	0
2.0 BAP + 0.1 IBA	7	7	7	7	7	12	13	13	1	1	1	1
2.0 BAP + 1.5 IBA	10	10	10	10	10	12	14	14	0	0	0	0
4.0 BAP + 0.01 IBA	8	8	8	8	8	9	9	9	2	0	0	0
4.0 BAP + 0.1 IBA	7	8	8	8	7	10	11	13	2	0	0	0
4.0 BAP + 1.5 IBA	8	8	6	6	8	9	7	7	2	0	0	0
6.0 BAP + 0.01 IBA	5	5	4	4	5	5	5	6	4	0	0	0
6.0 BAP + 0.1 IBA	3	4	4	4	3	4	4	5	4	1	1	1
6.0 BAP + 1.5 IBA	4	4	4	4	4	5	6	7	2	0	0	0
8.0 BAP + 0.01 IBA	3	4	4	4	3	4	4	6	2	0	0	0
8.0 BAP + 0.1 IBA	3	2	2	2	3	3	3	3	3	0	0	0
8.0 BAP + 1.5 IBA	3	1	1	1	3	1	1	1	1	0	0	0

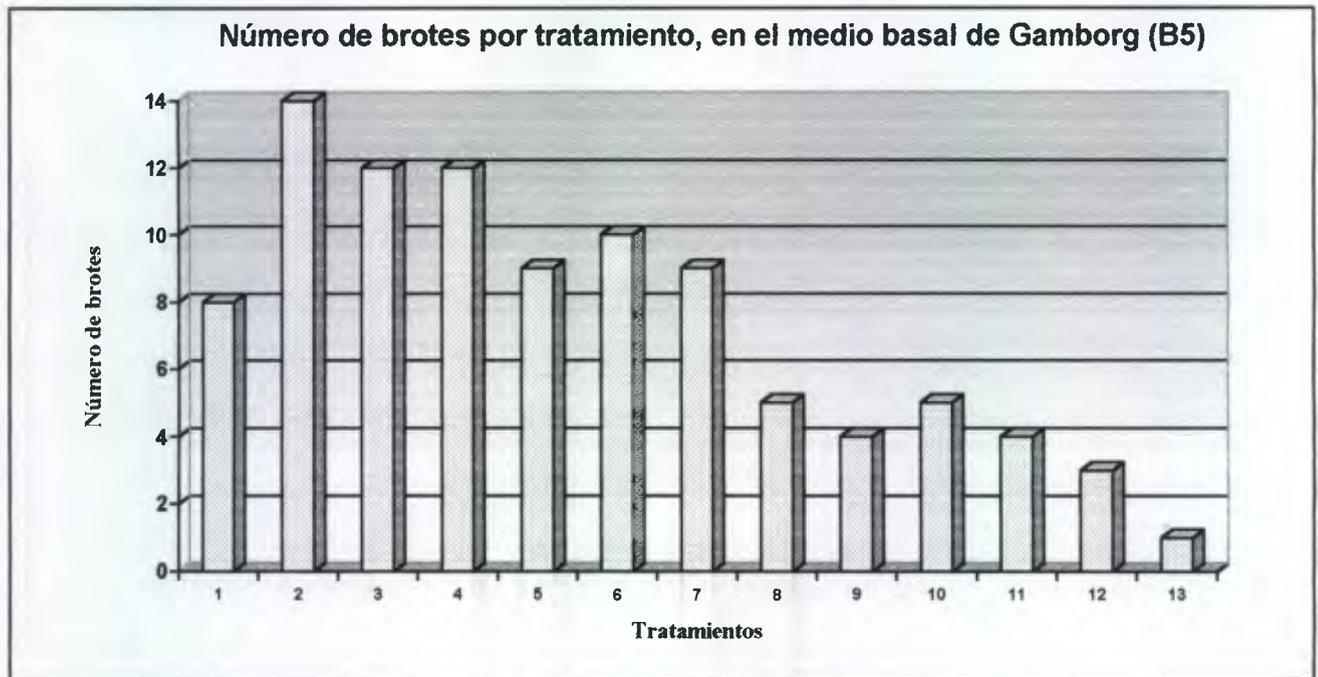
b. Número de brotes a los 30 días

A los 30 días en los tratamientos en que se observó un mayor incremento en cuanto al número de brotes fueron: el de 2 mg/l de BAP + 0.1 mg/l de IBA, con un incremento de 5 brotes que de 7 paso a tener 12; el de 2.0 mg/l de BAP + 0.01 mg/l de IBA que fue el que presentó un mayor número de brotes para esta lectura el cual de 10 brotes se incremento a 14; y el de 4 mg/l de BAP + 0.1 mg/l de IBA, con un incremento de 3 brotes, que de 7 se incremento 10. Los tratamientos que no sufrieron incremento alguno fueron: el de 6 mg/l de BAP + 0.01 mg/l de IBA y el de 8 mg/l de BAP + 0.1 mg/l de IBA. El resto de tratamientos sufrieron muy poca alteración. Es importante mencionar que el tratamiento 8 mg/l de BAP + 1.5 mg/l de IBA, sufrió decrecimiento, que de 3 brotes reportados en la primera lectura, pasó a tener sólo uno, esto debido a la toxicidad que se dio por la dosis de los reguladores del crecimiento presentes en el medio. En la figura 11 se pudo observar el comportamiento en cuanto al número de brotes a los 30 días.

c. Número de brotes a los 45 días

En esta lectura el tratamiento de 2 mg/l de BAP + 1.5 mg/l de IBA, incrementó su número de 12 brotes a 14. Y los tratamientos que incrementaron en un brote, fueron: 2 mg/l de BAP + 0.1 mg/l de IBA, 4 mg/l de

BAP + 0.1 mg/l de IBA y el de 6 mg/l de BAP + 1.5 mg/l de IBA. El resto de tratamientos no aumentó el número de brotes; y el tratamiento 4 mg/l de BAP + 1.5 mg/l de IBA, mas bien redujo su número en dos.



Referencia: T1 (0 mg/l de BAP + 0 mg/l de IBA), T2 (2 mg/l de BAP + 0.01 mg/l de IBA), T3 (2 mg/l de BAP + 0.1 mg/l de IBA), T4 (2 mg/l de BAP + 1.5 mg/l de IBA), T5 (4 mg/l de BAP + 0.01 mg/l de IBA), T6 (4 mg/l de BAP + 0.1 mg/l de IBA), T7 (4 mg/l de BAP + 1.5 mg/l de IBA), T8 (6 mg/l de BAP + 0.01 mg/l de IBA), T9 (6 mg/l de BAP + 0.1 mg/l de IBA), T10 (6 mg/l de BAP + 1.5 mg/l de IBA), T11 (8 mg/l de BAP + 0.01 mg/l de IBA), T12 (8 mg/l de BAP + 0.1 mg/l de IBA), T13 (8 mg/l de BAP + 1.5 mg/l de IBA).

BAP: Bencilaminopurina; **IBA:** Ácido Indolbutírico.

Figura 11. Efecto de la concentración de Bencilaminopurina (BAP) y Ácido Indolbutírico (IBA) en la formación de brotes a los 30 días, en el medio basal de Gamborg (B5).

d. Número de brotes a los 60 días

Los tratamientos 2 mg/l de BAP + 0.01 mg/l de IBA, 4 mg/l de BAP + 0.1 mg/l de IBA y 8 mg/l de BAP + 0.01 mg/l de IBA, aumentaron su número de brotes en 2 cada uno. No lo aumentaron los tratamientos 2 mg/l de BAP + 0.1 mg/l de IBA, 2 mg/l de BAP + 1.5 mg/l de IBA, 4 mg/l de BAP + 0.01 mg/l de IBA, 4 mg/l de BAP + 1.5 mg/l de IBA, 8 mg/l de BAP + 0.1 mg/l de IBA y 8 mg/l de BAP + 1.5 mg/l de IBA. El tratamiento testigo sufrió un descenso, que de 7 brotes, paso a tener 6. El resto de tratamientos aumentaron en un brote.

Cabrera (4), en el medio de Gamborg (B5), determinó que las mejores respuestas para la multiplicación y crecimiento de brotes de *Prunus persica* (L.) Batsch, var. Salcajá, se presentaron en la dosis de 2 mg/l de BAP, dosis que coincide con la mejor obtenida en el presente trabajo, para el caso de este medio de cultivo.

e. Explantes vivos sin respuesta

A los 15 días fue cuando más explantes sin respuesta se observaron, sin embargo, este número disminuyó a los 30 días, ya que a esta fecha los explantes habían brotado o muerto según sea el caso. Y a los 60 días, en los únicos tratamientos en que se observaron explantes verdes sin respuesta fueron el testigo (0 mg/l de BAP + 0 mg/l de IBA), 2 mg/l de BAP + 0.1 mg/l de IBA y 6 mg/l de BAP + 0.1 mg/l de IBA, en dichos tratamientos se observó una repetición en cada uno, que no presentó brotación y que aún se encontraba viva.

7.2.3 Comportamiento de los explantes en el medio nutritivo de Linsmaier y Skoog (LS)

A. Porcentaje de sobrevivencia de los explantes ante diversos factores

Cuadro 25. Sobrevivencia de los explantes del portainjerto Nemaguard, en la fase de multiplicación, en el medio basal de Linsmaier y Skoog (LS).

Tratamiento Dosis (mg/l)	Porcentaje de Mortandad																% de explantes verdes			
	% contaminación				% de oxidación				% de Toxicidad				TOTAL							
	15 Días	30 D	45 D	60 D	15 D	30 D	45 D	60 D	15 D	30 D	45 D	60 D	15 D	30 D	45 D	60 D	15 D	30 D	45 D	60 D
0 BAP + 0 IBA	10	20	20	20	0	0	10	30	0	0	0	0	10	20	30	50	90	80	70	50
2 BAP + 0.01 IBA	0	0	0	0	10	20	30	30	0	0	0	0	10	20	30	30	90	80	70	70
2 BAP + 0.1 IBA	0	10	10	10	0	10	20	20	0	0	0	0	0	20	30	30	100	80	70	70
2 BAP + 1.5 IBA	10	10	10	10	20	40	40	40	0	0	0	0	30	50	50	50	70	50	50	50
4 BAP + 0.01 IBA	0	0	10	10	20	20	30	30	0	0	0	0	20	20	40	40	80	80	60	60
4 BAP + 0.1 IBA	0	0	10	10	0	30	30	30	0	0	0	0	0	30	40	40	100	70	60	60
4 BAP + 1.5 IBA	0	10	10	10	20	20	40	40	10	20	20	20	30	50	70	70	70	50	30	30
6 BAP + 0.01 IBA	0	10	10	10	20	20	30	30	30	30	30	30	50	60	70	70	50	40	30	30
6 BAP + 0.1 IBA	0	0	0	0	20	30	30	30	10	40	40	40	30	70	70	70	70	30	30	30
6 BAP + 1.5 IBA	0	0	0	0	0	10	20	20	40	60	70	70	40	70	90	90	60	30	10	10
8 BAP + 0.01 IBA	10	10	10	10	20	20	30	30	30	50	60	60	60	80	100	100	40	20	0	0
8 BAP + 0.1 IBA	10	20	20	20	10	10	20	20	50	60	60	60	70	90	100	100	30	10	0	0
8 BAP + 1.5 IBA	0	0	0	0	10	20	20	20	70	80	80	80	80	100	100	100	20	0	0	0

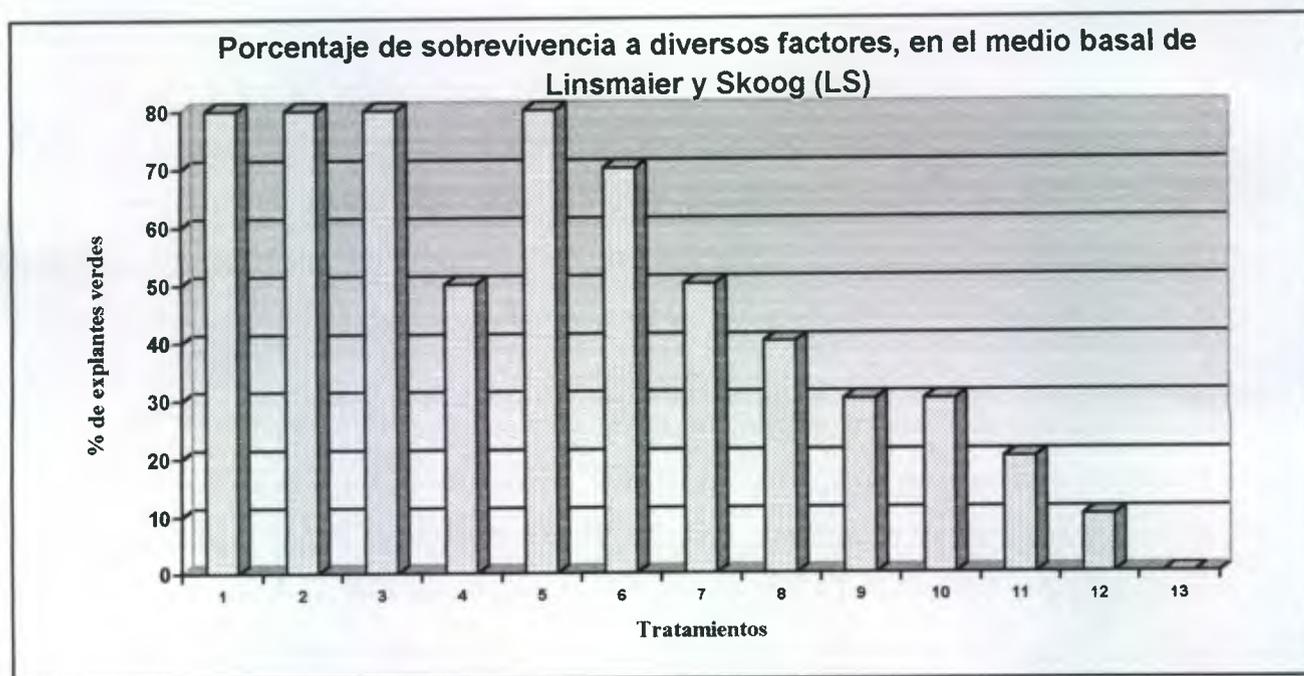
Como se puede observar en el cuadro 25, el comportamiento del porcentaje de sobrevivencia en este medio de cultivo, fue el siguiente: la contaminación a los 15 días después de sembradas las yemas se observó únicamente en los tratamientos: testigo, 2 mg/l de BAP + 1.5 mg/l de IBA, 8 mg/l de BAP + 0.01 mg/l de

IBA y 8 mg/l de BAP + 0.1 mg/l de IBA, los cuales presentaron un 10% de contaminación. La contaminación se incrementó a los 30 días tanto en los mismos tratamientos como en nuevos; en los tratamientos: testigo y 8 mg/l de BAP + 0.1 mg/l de IBA, la contaminación se incrementó al 20%; los nuevos tratamientos que presentaron contaminación fueron: 2 mg/l de BAP + 0.1 mg/l de IBA, 4 mg/l de BAP + 1.5 mg/l de IBA y 6 mg/l de BAP + 0.01 mg/l de IBA, todos con un 10 por ciento, en el resto de tratamientos no se observó la misma. A los 45 días, la contaminación se observó en los tratamientos 4 mg/l de BAP + 0.01 mg/l de IBA y 4 mg/l de BAP + 0.1 mg/l de IBA, ambos con un 10 por ciento de contaminación, en el resto de tratamientos no se observó cambio alguno. En la lectura realizada a los 60 días no se observó contaminación alguna en los distintos tratamientos. En la figura 12 se puede observar la sobrevivencia de los explantes a los 30 días.

Los tratamientos que se vieron afectados a los 15 días por la oxidación fueron: 2 mg/l de BAP + 1.5 mg/l de IBA, 4 mg/l de BAP + 0.01 mg/l de IBA, 4 mg/l de BAP + 1.5 mg/l de IBA, 6 mg/l de BAP + 0.01 mg/l de IBA, 6 mg/l de BAP + 0.1 mg/l de IBA y 8 mg/l de BAP + 0.01 mg/l de IBA, estos tratamientos presentaron un 20 por ciento de oxidación. Presentando un 10 por ciento de oxidación los tratamientos: 2 mg/l de BAP + 0.01 mg/l de IBA, 8 mg/l de BAP + 0.1 mg/l de IBA y 8 mg/l de BAP + 1.5 mg/l de IBA. En el resto de tratamientos no se observó oxidación siempre a los 15 días. A los 30 días el número de repeticiones que presentaban oxidación se incrementó en los tratamientos 2 mg/l de BAP + 0.01 mg/l de IBA, 2 mg/l de BAP + 1.5 mg/l de IBA, 6 mg/l de BAP + 0.1 mg/l de IBA y 8 mg/l de BAP + 1.5 mg/l de IBA, además de presentarse en los tratamientos 2 mg/l de BAP + 0.1 mg/l de IBA, 4 mg/l de BAP + 0.1 mg/l de IBA y 6 mg/l de BAP + 1.5 mg/l de IBA. A los 45 días se observó también en el tratamiento testigo; y los tratamientos en los que se incrementó fueron: 2 mg/l de BAP + 0.01 mg/l de IBA, 2 mg/l de BAP + 0.1 mg/l de IBA, 4 mg/l de BAP + 0.01 mg/l de IBA, 4 mg/l de BAP + 1.5 mg/l de IBA, 6 mg/l de BAP + 0.01 mg/l de IBA, 6 mg/l de BAP + 1.5 mg/l de IBA, 8 mg/l de BAP + 0.01 mg/l de IBA y 8 mg/l de BAP + 0.1 mg/l de IBA. En la lectura realizada a los 60 días se puede observar que solamente el tratamiento testigo sufrió un incremento de un 10 a un 30 por ciento, en cuanto al número de repeticiones que presentaron oxidación. El resto de tratamientos no sufrió alteración alguna. En base a los datos anteriores se puede observar que todos los tratamientos presentaron más de alguna unidad experimental con presencia de fenoles liberados (oxidación) por los explantes. Ver cuadro 25.

En cuanto a la toxicidad, se puede observar que afectó a partir del tratamiento 4 mg/l de BAP + 1.5 mg/l de IBA, siendo el tratamiento 8 mg/l de BAP + 1.5 mg/l de IBA el más afectado, ya que presentó un 70

por ciento de toxicidad a los 15 días y ésta se incrementó a un 80 por ciento a los 60 días. El tratamiento 8 mg/l de BAP + 0.1 mg/l de IBA, a los 60 días presentó un 60 por ciento, al igual que el tratamiento 8 mg/l de BAP + 0.01 mg/l de IBA. El tratamiento 6 mg/l de BAP + 1.5 mg/l de IBA, presentó un 70 por ciento. El tratamiento 6 mg/l de BAP + 0.1 mg/l de IBA, presentó un 40 por ciento. El tratamiento 6 mg/l de BAP + 0.01 mg/l de IBA, presentó un 30 por ciento. Y el tratamiento 4 mg/l de BAP + 1.5 mg/l de IBA, presentó un 20 por ciento. Como puede observarse, a partir del tratamiento 4 mg/l de BAP + 0.01 mg/l de IBA, a medida que se incrementó la dosis de reguladores del crecimiento (más que todo el BAP), el porcentaje de toxicidad aumentó, por lo que la dosis del regulador afectó directamente a los explantes.



Referencia: T1 (0 mg/l de BAP + 0 mg/l de IBA), T2 (2 mg/l de BAP + 0.01 mg/l de IBA), T3 (2 mg/l de BAP + 0.1 mg/l de IBA), T4 (2 mg/l de BAP + 1.5 mg/l de IBA), T5 (4 mg/l de BAP + 0.01 mg/l de IBA), T6 (4 mg/l de BAP + 0.1 mg/l de IBA), T7 (4 mg/l de BAP + 1.5 mg/l de IBA), T8 (6 mg/l de BAP + 0.01 mg/l de IBA), T9 (6 mg/l de BAP + 0.1 mg/l de IBA), T10 (6 mg/l de BAP + 1.5 mg/l de IBA), T11 (8 mg/l de BAP + 0.01 mg/l de IBA), T12 (8 mg/l de BAP + 0.1 mg/l de IBA), T13 (8 mg/l de BAP + 1.5 mg/l de IBA).

BAP: Bencilaminopurina; **IBA:** Ácido Indolbutírico.

Figura 12. Sobrevivencia de los explantes en la fase de multiplicación de brotes a los 30 días, en el medio basal de Linsmaier y Skoog (LS).

B. Porcentaje de brotación de yemas en el medio nutritivo de Linsmaier y Skoog (LS)

a. Brotación de yemas a los 15 días

En el tratamiento en el que se observó un mayor número de yemas brotadas fue: 2 mg/l de BAP + 0.1 mg/l de IBA, con 5 yemas brotadas. El que le siguió fue el tratamiento 4 mg/l de BAP + 0.01 mg/l de IBA con 4 yemas brotadas. Los tratamientos 6 mg/l de BAP + 0.01 mg/l de IBA, 6 mg/l de BAP + 0.1 mg/l de IBA y 6 mg/l de BAP + 1.5 mg/l de IBA, con tres yemas brotadas. En el resto de tratamientos brotó una o dos yemas, con excepción de los tratamientos: testigo, 2 mg/l de BAP + 1.5 mg/l de IBA y 4 mg/l de BAP + 1.5 mg/l de IBA, en los que no se observó brotación alguna.

Cuadro 26. Porcentaje de brotación de las yemas axilares del portainjerto Nemaguard, en el medio basal de Linsmaier y Skoog (LS).

Tratamiento	% de brotación de la yema axilar				% de explantes verdes sin respuesta			
	15 Días	30 Días	45 Días	60 Días	15 Días	30 Días	45 Días	60 Días
0.0 BAP + 0.0 IBA	0	20	30	30	90	60	40	20
2.0 BAP + 0.01 IBA	20	30	40	40	70	50	30	30
2.0 BAP + 0.1 IBA	50	60	70	80	50	30	10	0
2.0 BAP + 1.5 IBA	0	0	0	20	70	50	50	30
4.0 BAP + 0.01 IBA	40	60	60	60	40	20	0	0
4.0 BAP + 0.1 IBA	20	50	50	50	80	20	20	20
4.0 BAP + 1.5 IBA	0	0	0	0	70	50	30	30
6.0 BAP + 0.01 IBA	30	40	40	40	20	0	0	0
6.0 BAP + 0.1 IBA	30	40	40	40	40	10	10	10
6.0 BAP + 1.5 IBA	30	30	30	30	30	20	10	10
8.0 BAP + 0.01 IBA	20	20	20	20	20	0	0	0
8.0 BAP + 0.1 IBA	10	10	10	10	20	10	0	0
8.0 BAP + 1.5 IBA	10	10	10	10	10	0	0	0

b. Brotación de yemas a los 30 días

Los tratamientos en los que se observó un incremento en cuanto al número de yemas brotadas fueron: 2 mg/l de BAP + 0.01 mg/l de IBA, 2 mg/l de BAP + 0.1 mg/l de IBA, 4 mg/l de BAP + 0.01 mg/l de IBA, 4 mg/l de BAP + 0.1 mg/l de IBA, 6 mg/l de BAP + 0.01 mg/l de IBA y 6 mg/l de BAP + 0.1 mg/l de IBA, de estos tratamientos el que tuvo un mayor incremento fue el de 4 mg/l de BAP + 0.1 mg/l de IBA, que de 2

yemas brotadas a los 15 días paso a tener 5 a los 30 días. El resto de tratamientos no sufrió cambio alguno. Ver cuadro 26.

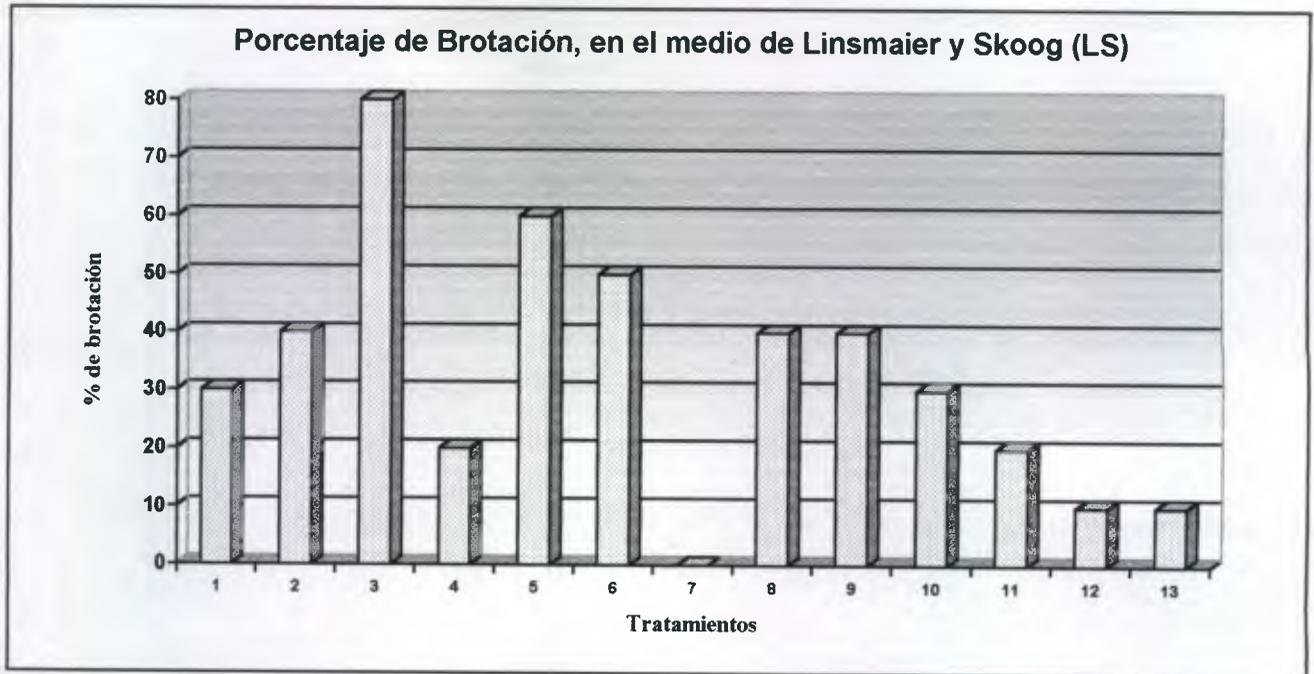
c. Brotación de yemas a los 45 días

Los únicos tratamientos en los que hubo un incremento en cuanto a la brotación fueron los tratamientos: testigo (0 mg/l de BAP + 0 mg/l de IBA), 2 mg/l de BAP + 0.01 mg/l de IBA y 2 mg/l de BAP + 0.1 mg/l de IBA, cada uno aumentó en uno el número de yemas brotadas. El resto de tratamientos no sufrió modificación alguna.

d. Brotación de yemas a los 60 días

Dos tratamientos modificaron su porcentaje de yemas brotadas, los cuales fueron: el tratamiento 2 mg/l de BAP + 0.1 mg/l de IBA, que de un 70 por ciento pasó a un 80 por ciento de brotación; y el tratamiento 2 mg/l de BAP + 1.5 mg/l de IBA, que en las lecturas anteriores no mostró yemas brotadas, en este caso mostró un 20 por ciento de brotación. En la figura 13 se puede observar el comportamiento de los explantes en cuanto al porcentaje de brotación.

Como lo demuestran los resultados, la respuesta del material vegetal fue muy limitado, por lo que con fines de propagación del portainjerto Nemaguard este medio no favorece la brotación de las yemas axilares esto debido a la concentración de los elementos que lo conforman. Azpeitia y colaboradores (2), obtuvieron resultados muy limitados en la brotación de las variedades de melocotón S-50 y S-66 en el medio de Linsmaier y Skoog, no así en los medios Almehdi y Parfitt y Gamborg donde los resultados fueron satisfactorios. Y también Cabrera (4), en su estudio con el melocotón de la variedad Salcajá obtuvo una respuesta similar.



Referencia: T1 (0 mg/l de BAP + 0 mg/l de IBA), T2 (2 mg/l de BAP + 0.01 mg/l de IBA), T3 (2 mg/l de BAP + 0.1 mg/l de IBA), T4 (2 mg/l de BAP + 1.5 mg/l de IBA), T5 (4 mg/l de BAP + 0.01 mg/l de IBA), T6 (4 mg/l de BAP + 0.1 mg/l de IBA), T7 (4 mg/l de BAP + 1.5 mg/l de IBA), T8 (6 mg/l de BAP + 0.01 mg/l de IBA), T9 (6 mg/l de BAP + 0.1 mg/l de IBA), T10 (6 mg/l de BAP + 1.5 mg/l de IBA), T11 (8 mg/l de BAP + 0.01 mg/l de IBA), T12 (8 mg/l de BAP + 0.1 mg/l de IBA), T13 (8 mg/l de BAP + 1.5 mg/l de IBA).

BAP: Bencilaminopurina; IBA: Ácido Indolbutírico.

Figura 13. Efecto de la concentración de Bencilaminopurina (BAP) y Ácido Indolbutírico (IBA) en el porcentaje de brotación de yemas a los 60 días, en el medio basal de Linsmaier y Skoog (LS).

C. Número de brotes

a. Número de brotes a los 15 días

El tratamiento que produjo un mayor número de brotes fue el de 2 mg/l de BAP + 0.1 mg/l de IBA, con un total de 5 brotes, en 5 unidades experimentales; le siguió el tratamiento de 4.0 mg/l de BAP + 0.01 mg/l de IBA, con 4 brotes. Los tratamientos: 6 mg/l de BAP + 0.01 mg/l de IBA, 6 mg/l de BAP + 0.1 mg/l de IBA y 6 mg/l de BAP + 1.5 mg/l de IBA, con 3 brotes. Los tratamientos: 2 mg/l de BAP + 0.01 mg/l de IBA, 4 mg/l de BAP + 0.1 mg/l de IBA y 8 mg/l de BAP + 0.01 mg/l de IBA, con 2 brotes. Y con uno los tratamientos: 8 mg/l de BAP + 0.1 mg/l de IBA y 8 mg/l de BAP + 1.5 mg/l de IBA. El resto de tratamientos no produjo brotes. Ver cuadro 27.

b. Número de brotes a los 30 días

Como se puede observar en la figura 14, el tratamiento que produjo un mayor número de brotes a los 30 días fue el de 4 mg/l de BAP + 0.1 mg/l de IBA, con un total de 9 brotes; le siguieron los tratamientos 2 mg/l de BAP + 0.1 mg/l de IBA, 4 mg/l de BAP + 0.01 mg/l de IBA y 6 mg/l de BAP + 0.01 mg/l de IBA, con 7 brotes cada uno. El resto de tratamientos presentó más de un brote, a excepción de los tratamientos: 2 mg/l de BAP + 1.5 mg/l de IBA, 4 mg/l de BAP + 1.5 mg/l de IBA, 8 mg/l de BAP + 0.1 mg/l de IBA y 8 mg/l de BAP + 1.5 mg/l de IBA, los cuales no presentaron brotes.

Cuadro 27. Número de brotes a los 15, 30, 45 y 60 días después de inoculados los explantes del portainjerto Nemaguard, en el medio basal de Linsmaier y Skoog (LS).

Tratamiento	Número de explantes vivos Brotados				Número de brotes por tratamiento				Número de explantes vivos Sin respuesta			
	15 Días	30 Días	45 Días	60 Días	15 Días	30 Días	45 Días	60 Días	15 Días	30 Días	45 Días	60 Días
0.0 BAP + 0.0 IBA	0	2	3	3	0	2	3	3	9	6	4	2
2.0 BAP + 0.01 IBA	2	3	4	4	2	3	4	4	7	5	3	3
2.0 BAP + 0.1 IBA	5	5	6	7	5	7	9	10	5	3	1	0
2.0 BAP + 1.5 IBA	0	0	0	2	0	0	0	2	7	5	5	3
4.0 BAP + 0.01 IBA	4	6	6	6	4	7	7	7	4	2	0	0
4.0 BAP + 0.1 IBA	2	5	4	4	2	9	8	8	8	2	2	2
4.0 BAP + 1.5 IBA	0	0	0	0	0	0	0	0	7	5	3	3
6.0 BAP + 0.01 IBA	3	4	3	3	3	7	6	7	2	0	0	0
6.0 BAP + 0.1 IBA	3	2	2	2	3	5	5	5	4	1	1	1
6.0 BAP + 1.5 IBA	3	1	0	0	3	3	0	0	3	2	1	1
8.0 BAP + 0.01 IBA	2	2	0	0	2	4	0	0	2	0	0	0
8.0 BAP + 0.1 IBA	1	0	0	0	1	0	0	0	2	1	0	0
8.0 BAP + 1.5 IBA	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0

c. Número de brotes a los 45 días

El tratamiento que más brotes presentó a los 45 días fue el de 2 mg/l de BAP + 0.1 mg/l de IBA, con 9 brotes; le siguió el tratamiento 4 mg/l de BAP + 0.1 mg/l de IBA, con 8 brotes. El tratamiento 4 mg/l de BAP + 0.01 mg/l de IBA, con un total de 7 brotes. El tratamiento 6 mg/l de BAP + 0.01 mg/l de IBA, con 6 brotes. El tratamiento 6 mg/l de BAP + 0.1 mg/l de IBA, con 5 brotes. Y los que menos presentaron, fueron el testigo y el tratamiento 2 mg/l de BAP + 0.01 mg/l de IBA. En el resto de tratamientos no se observó brotes.

d. Número de brotes a los 60 días

Los únicos tratamientos que incrementaron el número de brotes fueron: el de 2 mg/l de BAP + 0.1 mg/l de IBA, con un total de 10 brotes. El tratamiento 6 mg/l de BAP + 0.01 mg/l de IBA, que de 6 brotes se

incrementó a 7. Y el tratamiento 2 mg/l de BAP + 1.5 mg/l de IBA, que fue el último en presentar brotación, con un total de 2 brotes. En el resto de tratamientos no se observó aumento alguno.

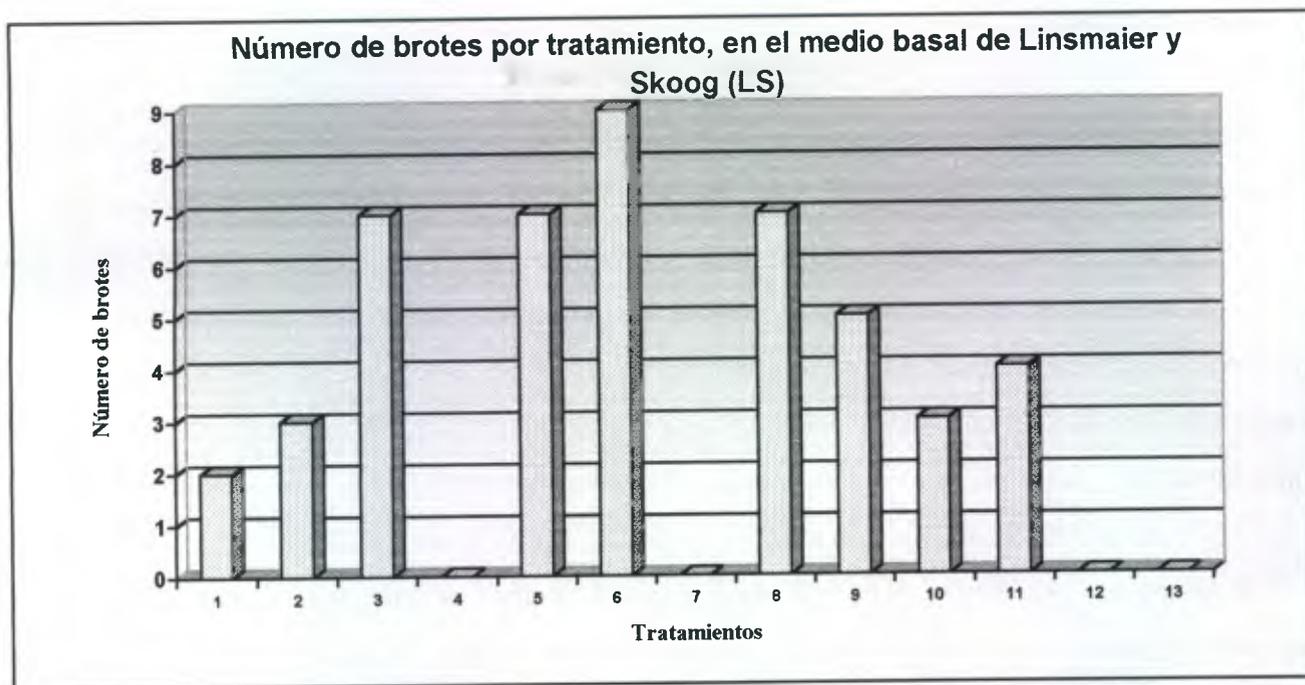
En general en lo que respecta al número de brotes así como al porcentaje de brotación, en el medio basal de Linsmaier y Skoog, se puede observar que los valores de estas variables están por debajo de los valores de las mismas en los dos medios de cultivo anteriormente mencionados. Caso similar al reportado por Azpeitia (2) y Cabrera (4) en sus estudios realizados.

Peñalosa (24), obtuvo la mejor respuesta en cuanto a multiplicación y crecimiento de brotes del melocotón de la variedad Diamante, con el medio de Murashige y Skoog (MS) y con una dosis de BAP de 2 mg/l. El medio de Linsmaier y Skoog tiene el mismo contenido de sales que el medio de Murashige y Skoog, en lo único en que difieren es en el contenido de vitaminas. Azpeitia y colaboradores (2), en su estudio con las variedades de melocotón S-50 y S-66, evaluaron el medio de Murashige y Skoog (MS) en el cual obtuvieron los resultados más bajos. Con lo que se puede decir que cada variedad tiene necesidades distintas en cuanto a requerimientos de nutrientes y hormonas, así como otros componentes de los medios de cultivo, por lo que cada material vegetal requiere un medio de cultivo específico.

e. Explantes vivos sin respuesta

En cuanto a los tratamientos que presentaron explantes vivos sin ninguna respuesta, se tiene al de 2 mg/l de BAP + 0.01 mg/l de IBA, 2 mg/l de BAP + 1.5 mg/l de IBA y 4 mg/l de BAP + 1.5 mg/l de IBA, con 3 cada uno. El testigo y el tratamiento 4 mg/l de BAP + 0.1 mg/l de IBA, con 2 unidades experimentales cada uno. Los tratamientos: 6 mg/l de BAP + 0.1 mg/l de IBA y el de 6 mg/l de BAP + 1.5 mg/l de IBA, ambos con uno. El resto de tratamientos no presentó explantes vivos sin brotación.

En general la respuesta en el medio de cultivo de Linsmaier y Skoog fue menor que en los otros dos medios de cultivo, en todas las variables evaluadas en esta investigación, ya que no se observó mucha respuesta en las mismas.



Referencia: T1 (0 mg/l de BAP + 0 mg/l de IBA), T2 (2 mg/l de BAP + 0.01 mg/l de IBA), T3 (2 mg/l de BAP + 0.1 mg/l de IBA), T4 (2 mg/l de BAP + 1.5 mg/l de IBA), T5 (4 mg/l de BAP + 0.01 mg/l de IBA), T6 (4 mg/l de BAP + 0.1 mg/l de IBA), T7 (4 mg/l de BAP + 1.5 mg/l de IBA), T8 (6 mg/l de BAP + 0.01 mg/l de IBA), T9 (6 mg/l de BAP + 0.1 mg/l de IBA), T10 (6 mg/l de BAP + 1.5 mg/l de IBA), T11 (8 mg/l de BAP + 0.01 mg/l de IBA), T12 (8 mg/l de BAP + 0.1 mg/l de IBA), T13 (8 mg/l de BAP + 1.5 mg/l de IBA).

BAP: Bencilaminopurina; **IBA:** Ácido Indolbutírico.

Figura 14. Efecto de la concentración de Bencilaminopurina (BAP) y Ácido Indolbutírico (IBA) en la formación de brotes a los 30 días, en el medio basal de Linsmaier y Skoog (LS).

En el cuadro 28 se pueden observar los tratamientos que dieron las mejores respuestas, en las diferentes variables de respuesta para los tres medios de cultivo.

Cuadro 28. Cuadro resumen de los mejores tratamientos en los diferentes medios de cultivo, en la fase de multiplicación de brotes.

Medio Basal	Tratamiento Dosis (mg/l)	% de Supervivencia				% de Brotación				Número de Brotes			
		15 Dias	30 D	45 D	60 D	15 D	30 D	45 D	60 D	15 D	30 D	45 D	60 D
AP	2 BAP + 0.01 IBA	80	80	80	80	80	80	80	80	8	18	20	21
	2 BAP + 0.1 IBA	100	90	80	80	90	90	90	90	9	19	19	19
B5	2 BAP + 0.01 IBA	100	90	80	80	100	100	100	100	10	14	12	14
	2 BAP + 1.5 IBA	100	100	100	100	100	100	100	100	10	12	14	14
LS	2 BAP + 0.1 IBA	100	80	70	70	50	60	70	80	5	7	9	10
	4 BAP + 0.1 IBA	100	70	60	60	20	50	50	50	2	9	8	8

7.3 FASE DE INDUCCIÓN DE RAÍCES EN BROTES

En esta fase únicamente se logró enraizar un brote de los 40 inoculados, lo cual se dio en el tratamiento que consistió en: el medio de Gamborg al 75 % de concentración de sales y 0.5 mg/l de IBA. A los 15 días este brote ya había enraizado, mostrando 2 raíces de aproximadamente 4 milímetros de longitud. A los 30 días ya no se observaron más brotes con raíces, únicamente el que ya había enraizado anteriormente, el cual tenía las dos raíces anteriores con una longitud de aproximadamente 20 mm una y 15 mm la otra. Por lo que se puede observar que el enraizamiento fue muy escaso, por lo menos en estas dosis y con este regulador del crecimiento (IBA).

Los resultados de enraizamiento tienen similitud con los obtenidos por Skirvin y Chu mencionados por Miller (20), quienes obtuvieron resultados limitados en los sucesos de enraizamiento de patrones de melocotón. Cabrera (4) no obtuvo respuesta en el enraizamiento de brotes *in vitro*, de la variedad Salcajá, sin embargo, los brotes sobrevivieron mejor en la concentración de sales del medio de Murashige y Skoog al 75%. Azpeitia (2), logró enraizar el melocotón de la selección S-66 en la dosis de 4.06 y 8.12 mg/l de IBA.

El comportamiento de los explantes en los tratamientos que contenían el medio de cultivo a una concentración de sales al 50% y 25%, fue que como ya se dijo anteriormente no enraizaron, además, presentaron una clorosis general del explante, seguramente debido a deficiencia por nutrientes. Para el caso de los tratamientos con un 75% de concentración de sales, si se observó explantes vigorosos con una coloración verde, pudiéndose decir que esta concentración de sales del medio no afectó a los explantes. Con respecto a la concentración de sales en el medio de cultivo, Roca (29) dice que: "el proceso de enraizamiento en los brotes propagados *in vitro* requiere generalmente del trasplante a un medio de cultivo con menor concentración de sales".

El portainjerto *Nemaguard* se podría considerar como difícil de enraizar, ya que Roca (29), menciona que en algunas especies, la simple eliminación de las citocininas exógenas ha sido suficiente estímulo para la diferenciación del sistema radical; caso que no se dio con este material, el cual no enraizó (solo enraizó uno) ni con la adición de una auxina como lo fue el ácido indolbutírico (IBA), mucho menos en el caso del testigo el cual no contenía IBA.

Cuadro 29. Porcentaje de enraizamiento de brotes, en el medio de Gamborg (B5)

Tratamiento		% de enraizamiento	
Concentración de Medio B5 en %	Dosis IBA (mg/l)	15 Días	30 Días
100	0.0	0	0
75	0.1	0	0
50	0.1	0	0
25	0.1	0	0
75	0.5	25	25
50	0.5	0	0
25	0.5	0	0
75	1.0	0	0
50	1.0	0	0
25	1.0	0	0

En el cuadro 29, se puede observar un 25% de enraizamiento (1 brote enraizado de 4 sembrados) en el tratamiento de 75% de concentración de sales del medio de Gamborg combinado con 0.5 mg/l de IBA, que fue el único en que se observó la misma y el escaso enraizamiento se pudo deber a que los brotes utilizados fueron los obtenidos en la fase de multiplicación de brotes (fase anterior) en la cual se usó la Bencilaminopurina (BAP) que es una citocinina, las cuales inhiben el enraizamiento. A pesar de que en la fase de enraizamiento se eliminaron las citocininas, éstas seguían provocando su efecto sobre los brotes inhibiendo así el enraizamiento, por lo tanto sería necesario transferir los brotes a un medio con bajo contenido de citocininas o sin las mismas antes de pasar a la fase de enraizamiento. El escaso enraizamiento también se pudo deber a que la auxina (ácido indolbutírico) utilizada, o las dosis de la misma no fueron las adecuadas para estimular el enraizamiento.

En general la respuesta en el cultivo de tejidos puede ser limitada y muy variable, debido a que son varios los factores que pueden influir en la misma, como podrían ser: la composición del medio de cultivo, dosis de reguladores de crecimiento, edad del explante, fotoperíodo, temperatura, etc.

8. CONCLUSIONES

- 8.1 El antioxidante que controló en mayor grado la oxidación de los explantes, en los tres medios de cultivo evaluados, fue el polivinilpirrolidona a la dosis de 900 mg/l. En el caso de los medios: de Almehti y Parfitt (AP) y de Gamborg (B5), controló la oxidación en un 100 %. Y en el medio Linsmaier y Skoog en un 60%.
- 8.2 En la combinación de reguladores del crecimiento de 2.0 mg/l de BAP + 0.1 mg/l de IBA, fue en la que se observó un mayor porcentaje de brotación de las yemas axilares en el medio basal de Almehti y Parfitt con un 90 % de brotación. En el medio basal de Gamborg fueron las combinaciones de 2.0 mg/l de BAP + 0.01 mg/l de IBA y la de 2.0 mg/l de BAP + 1.5 mg/l de IBA, con un 100 % de brotación. En el medio basal de Linsmaier y Skoog la combinación de 2.0 mg/l de BAP + 0.1 mg/l de IBA, mostró un 80% de brotación, pero hasta los 60 días.
- 8.3 Los tratamientos que produjeron el mayor número de brotes, en los tres medios de cultivo fueron: para el medio basal de Almehti y Parfitt, la combinación de 2.0 mg/l de BAP + 0.1 mg/l de IBA, con un total de 19 brotes en 9 explantes, a los 30 días. En el medio basal de Gamborg, la combinación de 2.0 mg/l de BAP + 0.01 mg/l de IBA, con un total de 14 brotes en 9 explantes, a los 30 días. En el medio basal de Linsmaier y Skoog, la combinación de 4.0 mg/l de BAP + 0.1 mg/l de IBA, con un total de 9 brotes en 5 explantes, a los 30 días.
- 8.4 El tratamiento con una concentración de sales al 75% del medio basal de Gamborg (B5) en combinación con el IBA en la dosis de 0.5 mg/l, fue el único que estimuló raíces y esto únicamente en un brote.

9. RECOMENDACIONES

- 9.1 Efectuar otras investigaciones en el portainjerto *Nemaguard*, para establecer una dosis de reguladores del crecimiento que incremente el número de brotes, realizando para ello una exploración cerca de la combinación de reguladores 2.0 mg/l de BAP + 0.01 mg/l de IBA, la cual fue la que produjo un mayor número de brotes, usando para ello el medio basal de Almehdi y Parfitt.
- 9.2 Realizar estudios sobre enraizamiento de explantes del portainjerto *Nemaguard*, utilizando para ello otras auxinas como el ácido naftalenacético en diversas concentraciones, tomando en cuenta la auxina ácido indolbutírico, partiendo de la concentración 0.5 mg/l de IBA. Tomado como referencia el medio basal de Gamborg en una concentración de sales del 75%.

10. BIBLIOGRAFÍA

1. Arjona, C; Welkerling, E; Rosell, GA. 1990. Enraizamiento *in vitro* del portainjerto Colt. Turrialba 40(1):82-87.
2. Azpeitia Morales, A; Zapata Altamirano, RJ; Nava Cedillo, A. 1993. Propagación *in vitro* de melocotón (*Prunus persica* (L.) Batsch) a partir de yemas axilares. Agricultura Técnica, México 19(1,2):37-50.
3. Bidwell, R. 1990. Fisiología vegetal. México, AGT. 784 p.
4. Cabrera Morales, A. 2003. 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 Ing. Agr. Guatemala, USAC. 85 p.
5. Cabrera, W. 2000. Propagación de plantas; reproducción asexual (en línea). Lima, Perú, Universidad Nacional Agraria La Molina, Facultad de Agronomía. Consultado 18 nov. 2002. Disponible en <http://www.lamolina.edu.pe/Facultad/Agronomía/horticultura/propagación/reprodasexual/wildercabrera.doc>
6. Conger, BV. 1982. Cloning agricultural plants, via *in vitro* techniques. 2 ed. Florida, US, CRC Press. 273 p.
7. Dodds, H; Roberts, L. 1986. Experiments in plant tissue culture. 2 ed. US, Cambridge University Press. 232 p.
8. Domínguez, CM. 2002. Principios activos; sustancias reguladoras del crecimiento de las plantas (en línea). Barcelona, España. Consultado 18 nov. 2002. Disponible en <http://personal.redestb.es/martin/activos.htm>.
9. Errázuriz, F; Leyton, F; Oyarzun, C; Valdivieso, A. 2001. Melocotonero (en línea). Chile, Universidad Católica de Chile, Facultad de Agronomía e Ingeniería Forestal. Consultado 26 oct. 2002. Disponible en <http://www.geocities.com/Athens/Sparta/4704/duraznero.htm>.
10. Evans, D. *et al.* 1983. Handbook of plant and cell culture. US, MacMillan Publishing. v. 2-5.
11. Fisiología vegetal (en línea). 2002. España. Consultado 18 nov. 2002. Disponible en <http://biocity.iespana.es/biocity/fisveg/FV8.htm>.
12. George, EF. 1993. Plant propagation by tissue culture. 2 ed. US, Exegetics. 1,574 p.
13. Gonzáles, AM; Raisman, JS; Aguirre, M. 1999. Hormonas vegetales (en línea). Trad. por gened.emc.Maricopa.edu/bio/bio181/Biobk.htm. Argentina, Universidad del Sol, Facultad de Ciencias Agrarias. Consultado 7 mar 2003. Disponible en <http://fai.unne.edu.ar/biologia/planta/auxinas.htm>
14. Gonzáles, C. 1999. Propagación de plantas; injerto en melocotón (en línea). Lima, Perú, Universidad Nacional Agraria La Molina, Facultad de Agronomía. Consultado 18 nov. 2002. Disponible en <http://lamolina.edu.pe/Facultad/Agronomía/horticultura/propagación/reprodasexual/cgonzales.doc>.

15. Guevara, BE. 1986. Métodos y medios de cultivo. *In* Curso de cultivo de tejidos (2., 1986, Turrialba, CR). Turrialba, CR, CATIE. p. 22-57.
16. Hartman, HT; Kester, DT. 1989. Propagación de plantas. Trad. por Antonio Marino. 2 ed. México, Continental. 760 p.
17. Hernández González, CM. 1999. Respuesta de los cultivares de aguacate (*Persea americana* Mill.) Fuerte y Booth 7, al cultivo *in vitro* de yemas axilares. Tesis Ing. Agr. Guatemala, USAC. 72 p.
18. Hurtado, M. *et al.* 1987. Cultivo de tejidos vegetales. México, Trillas. 232 p.
19. Kyle, L; Kley, J. 1996. Plants from test tubes an introduction to micropropagation. 3 ed. Hong Kong, Timber Press. 240 p.
20. Miller, GA; Coston, DC; Denny, EG; Romeo, ME. 1982. *In vitro* propagation of "Nemaguard" Peach rootstock. *HortScience* 17(2):194.
21. Molina, Y. 1999. Cultivo de tejidos vegetales (en línea). Mérida, Venezuela, Universidad de los Andes. Consultado 25 oct. 2002. Disponible en <http://geocities.com/rainforest/andes/3026/introducción.htm>.
22. Orozco Castillo, C. 1996. Cultivo de tejidos y su aplicación en agricultura. *In* Simposio Nacional Sobre Cultivo de Tejidos Vegetales (1., 1996, Guatemala). Guatemala, Instituto de Ciencia y Tecnología Agrícolas. p. 1-10.
23. Pelacho, A; Closas, L; Cueva, RM. 2001. Reguladores de crecimiento (en línea). Cataluña, España, Universidad de Lleida, Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agrícola. Consultado 17 mar 2003. Disponible en <http://www.etsea.udl.es/invitro/medis/hormo.htm>.
24. Peñaloza, P. 2001. Obtención de plantas libres de virus y propagación *in vitro* de melocotón (*Prunus persica* (L.) Batsch) cv. Diamante (en línea). Puebla, Mx, Universidad Popular Autónoma del Estado de Puebla, Escuela de Agronomía. Consultado 25 oct. 2002. Disponible en <http://siza.gemtel.com.mx/libros/delaros/p1.htm>.
25. Ramírez, E. 1994. Micropropagación de manzana (*Malus pumila* Mill.). Labor Ovalle, Quetzaltenango, Guatemala, ICTA. p. 34-40.
26. _____. 1996. Micropropagación de materiales de frutales deciduos tratados con radicación: informe técnico de actividades de 1996. Labor Ovalle, Quetzaltenango, Guatemala, ICTA. p. 29-37.
27. Randolph, H *et al.* 1985. Tissue culture in forestry and agriculture. US, Plenum. 379 p.
28. Roca Canet, CE. 1996. Respuesta de dos diferentes tipos de explante de zapote (*Pouteria sapota* L. Cronquist) a diferentes medios de cultivo *in vitro*. Tesis Ing. Agr. Guatemala, USAC. 82 p.
29. Roca, WM; Mroginski, LA. 1991. Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones. Cali, Colombia, CIAT. 970 p.

30. Rojas, GM. 1984. Fisiología vegetal aplicada. 3 ed. México, McGraw-Hill. 302 p.
31. 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.
32. Ruiz, D. 1996. Forma de preparación de medios de cultivo Murashige & Skoog. San Pedro Sula, Honduras, Fondo Hondureño de Investigación Agrícola. 25 p.
33. Soto, G; Suzudi, N; Ramírez, E. 1991. Método modificado para el cultivo *in vitro* del material de melocotón, *Nemaguard*; informe técnico de las actividades de 1991. Labor Ovalle, Quetzaltenango, Guatemala, ICTA. p. 30-37.
34. Thomas, B. 1989. *In vitro* propagation of *Oxidendrum arboreum* from mature trees. HortScience 24(4):62-68.
35. Thorpe, TA. 1988. Plant tissue culture and applications in agriculture. New York, US, Academic Press. 177 p.
36. Torres, AC; Teixeira Ferreira, A; Campos, M. 1996. Medio de cultivo. Brasilia, D.F., Centro Brasileiro Argentino de Biotecnología. 21 p.
37. Trujillo, MI. 2000. Técnicas de clonación en *Eucalyptus grandis* (en línea). Tacuarembó, Uruguay, Programa Nacional Forestal INIA. Consultado 8 nov. 2002. Disponible en <http://www.e-campo/media/news/nl/altforestación16.htm>
38. USAC (Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Humanidades, Departamento de Post Grado, GT). 1999. Problemas sociales y económicos de Guatemala. Guatemala, Ediciones Superación. p. 36-37.
39. Usui, K. 1995. Cultivo de embriones de melocotón *in vitro*; informe final de las actividades realizadas desde mayo de 1994 hasta septiembre de 1996. Guatemala, ICTA. p. 24-35.
40. _____. *et al.* 1996. Principios básicos del cultivo de tejidos vegetales. Ed. por RV. Pernillo; AE. Ramírez. Guatemala, ICTA. 166 p.
41. Vázquez, F; Carrillo, E; Mejía, L. 1991. Biotecnología y su aplicación en la agricultura guatemalteca. Guatemala, ICTA. 22 p.
42. Villacinda, R. 1994. Respuesta de la especie tres puntas (*Neurolaena lobata* L.) a la propagación *in vitro*. Tesis Ing. Agr. Guatemala, USAC. 93 p.
43. Vuylsteke, D. 1989. Shot-tip culture for the propagation, conservation and exchange of *Musa* germplasm. Roma, Italia, International Board for Plant Genetic Resources. 56 p.
44. Weibel, AM. 2000. Respuesta de nueve portainjertos al replante en melocotón (*Prunus persica* (L.) Batsch) (en línea). Junín, Argentina. Consultado 7 mar 2003. Disponible en <http://www.e-campo.com/media/news/nl/altfruticultura27.htm>.

45. Ziv, M; Halevy, AH. 1983. Control of oxidative browning and *in vitro* propagation of *Strelitzia reginae*. HortScience 18(4):434-436.



U.Bo Rolando Barrios

11. APÉNDICE

11.1 Concentración de los componentes de cada medio basal de cultivo

Cuadro 30 "A" Concentración de los componentes de los diferentes medios basales de cultivo

COMPONENTES	MEDIOS DE CULTIVO mg/l		
	Almehdi y Parfitt (AP)	Gamborg (B5)	Linsmaier y Skoog (LS)
NH ₄ NO ₃	-----	-----	1,650
(NH ₄) ₂ SO ₄	270	134	-----
KNO ₃	2,500	2,500	1,900
CaCl ₂ .2H ₂ O	150	150	440
MgSO ₄ .7H ₂ O	190	250	370
KH ₂ PO ₄	-----	-----	170
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	150	150	-----
Na ₂ EDTA	37.3	37.3	37.3
FeSO ₄ .7H ₂ O	27.85	27.85	27.85
MnSO ₄ .7H ₂ O	20	10	22.3
ZnSO ₄ .7H ₂ O	2.0	2.0	8.6
H ₃ BO ₃	4.5	3.0	6.2
KI	0.75	0.75	0.83
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.06	0.25	0.25
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.05	0.025	0.025
CoCl ₂ .6H ₂ O	0.03	0.025	0.025
Vitaminas			
Thiamina-HCl	5.0	10.0	0.4
Nicotinamida	0.5	1.0	----
Piridoxina-HCl	1.0	1.0	----
Otros			
(iso-) o myo inositol	25	100	100
Glicina	-----	-----	-----
Sucrosa	20,000	20,000	30,000
Agar	0.8 %	0.8%	0.8%
PH	5.7%	5.7%	5.7%

11.2 Concentración de los componentes para preparar 0.7 litros de solución madre de macronutrientes, para los diferentes medios basales de cultivo

Cuadro 31 "A" Solución madre de macronutrientes a una concentración de 20X, para los diferentes medios basales de cultivo

Sustancia	Medio de cultivo		
	AP g/0.7litros	B5 g/0.7 litros	LS g/0.7 litros
NH ₄ NO ₃	-----	-----	23.1
KNO ₃	35	35	26.6
MgSO ₄ .7H ₂ O	2.66	3.5	5.18
KH ₂ PO ₄	-----	-----	2.38
(NH ₄) ₂ SO ₄	3.78	1.876	-----
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	2.1	2.1	-----

11.3 Concentración para preparar la solución madre de cloruro de calcio, para los diferentes medios basales de cultivo

Cuadro 32 "A" Solución madre de Cloruro de calcio, para los diferentes medios basales de cultivo

Sustancia	Medio de cultivo		
	AP 40X	B5 40X	LS 30X
CaCl ₂ .H ₂ O	4.2 g/ 0.7litros	4.2 g/ 0.7 litros	6.60 g/ 0.5litros

11.4 Concentración de los componentes para preparar las soluciones madre de micronutrientes, para los diferentes medios basales de cultivo

Cuadro 33 "A" Solución madre de micronutrientes, para los diferentes medios basales de cultivo

Sustancia	Medio de cultivo		
	AP g/ 0.1 litros	B5 g/ 0.25 litros	LS g/0.1litros
Micro A	1,000X	1,000X	1,000X
MnSO ₄ .4H ₂ O	2	0.5	2.23
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0.2	0.1	0.86
H ₃ BO ₃	0.45	0.15	0.62
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.006	0.0125	0.025
Micro B	2,000X	5,000 X	5,000 X
CoCl ₂ .2H ₂ O	0.015 g/0.25 litros	0.0125 g/0.1 litros	0.0125 g/0.1 litros
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.025 g/0.25 litros	0.0125 g/0.1 litros	0.0125 g/0.1 litros

11.5 Concentraciones para preparar las soluciones madre de yoduro de potasio, de los diferentes medios basales de cultivo

Cuadro 34 "A" Solución madre de Yoduro de potasio a una concentración de 1,000X, para los diferentes medios basales de cultivo

Sustancia	Medio de cultivo		
	AP g/0.1 litros	B5 g/0.1litros	LS g/ 0.05 litros
KI	0.075	0.075	0.0415

11.6 Concentraciones para preparar las soluciones madre de hierro, de los diferentes medios de cultivo

Cuadro 35 "A" Solución madre de Hierro a una concentración de 200X, para los diferentes medios basales de cultivo

Sustancia	Medio de cultivo		
	AP g/ 0.25litros	B5 g/0.25litros	LS g/0.25litros
Na ₂ EDTA	1.865	1.865	1.865
Fe SO ₄ .7H ₂ O	1.3925	1.3925	1.3925

11.7 Concentraciones para preparar las soluciones madre de vitaminas, de los diferentes medios de cultivo

Cuadro 36 "A" Solución madre de vitaminas a una concentración de 1,000X, para los diferentes medios basales de cultivo

Sustancia	Medio de cultivo		
	AP g/0.05litros	B5 g/0.05litros	LS g/0.05 litros
Tiamina-HCl	0.25	0.5	0.02
Acido nicotínico	0.025	0.05	-----
Piridoxina-HCl	0.05	0.05	-----

11.8 Concentración de otros componentes de los medios basales de cultivo

Cuadro 37 "A" Otros componentes de los diferentes medios basales (se preparó una solución madre sólo para el caso del myo inositol, los otros componentes se aplicaron directamente al medio de cultivo)

Sustancia	Medio de cultivo		
	AP	B5	LS
Myo Inositol	1.25 g/0.05lts (a 1000X)	1.5 g/0.1lts (a 150X)	1.5 g/0.1lts (a 150X)
Sucrosa	20 g/l de medio	20 g/l de medio	30 g/l de medio
Agar	0.8% (8 g/l)	0.8% (8 g/l)	0.8% (8 g/l)
Glicina	-----	-----	-----



UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
 FACULTAD DE AGRONOMÍA -FAUSAC-
 INSTITUTO DE INVESTIGACIONES AGRONÓMICAS
 Y AMBIENTALES -IIA-



REF. Sem. 61/2005

LA TESIS TITULADA:

"EVALUACION DE MEDIOS DE CULTIVO,
 ANTIOXIDANTES Y REGULADORES DE
 CRECIMIENTO EN LA
 MICROPROPAGACION DEL
 PORTAINJERTO NEMAGUARD (*Prunus
 spp*)"

DESARROLLADA POR EL ESTUDIANTE:

JULIO ERNESTO BERDUO SANDOVAL

CARNE:

9310048

HA SIDO EVALUADO POR LOS PROFESIONALES:

Ing. Agr. Helmer Dagoberto Ayala
 Ing. Agr. César Linneo García Contreras
 Ing. Agr. Víctor Hermógenes Castillo Díaz
 Ing. Agr. Edgar Eduardo Pretzanzin

Los Asesores y las Autoridades de la Facultad de Agronomía, hacen constar que ha cumplido con las Normas Universitarias y Reglamentos de la Facultad de Agronomía de la Universidad de San Carlos de Guatemala.

Ing. Agr. Domingo Amador Pérez
 ASESOR

Dr. David Monterroso Salyatierra
 DIRECTOR DEL IIA

IMPRIMASE

Dr. Ariel Abderramán Ortiz López
 DECANO



DMS/nm
 c.c. Archivo
 IIA
 Control Académico

PROPIEDAD DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
 Biblioteca Central