

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



ESTABLECIMIENTO IN VITRO DEL MANZANO Malus domestica
(Bork), DE LA REGION DE CANATLAN, DURANGO, MEXICO.

TESIS

QUE PARA OPTAR AL TITULO DE
BIOLOGO
PRESENTA

ZINNIA HAYDE GONZALEZ CARRANZA

MONTERREY, N. L.

MARZO DE 1993

T

SB363

G6

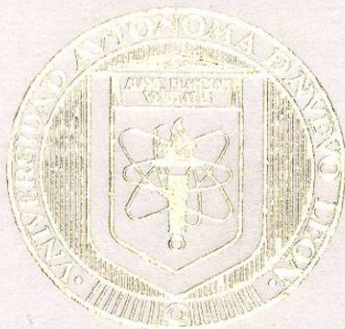
c.1

20



1080072704

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



ESTABLECIMIENTO IN VITRO DEL MANZARILLO *Melus domestica*
(Bark), DE LA REGIÓN DE CANATLAN, DURANGO, MEXICO.

TESIS

QUE PARA OPTAR AL TÍTULO DE
BIOLOGO
PRESENTA

ZIRNIA HAYDE GONZALEZ CARRANZA

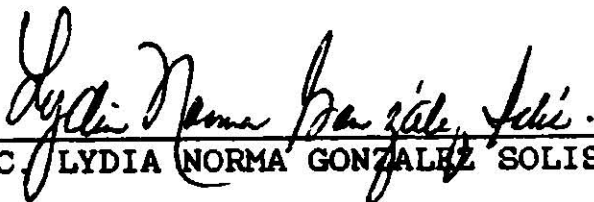
MONTERREY, N. L.

MARZO DE 1988

63 30

T
SB363
F6

COMISION DE TESIS.



M. C. LYDIA NORMA GONZALEZ SOLIS.

PRESIDENTE.



M. C. HAZAEL GUTIERREZ MAULEON.

DIRECTOR EXTERNO.



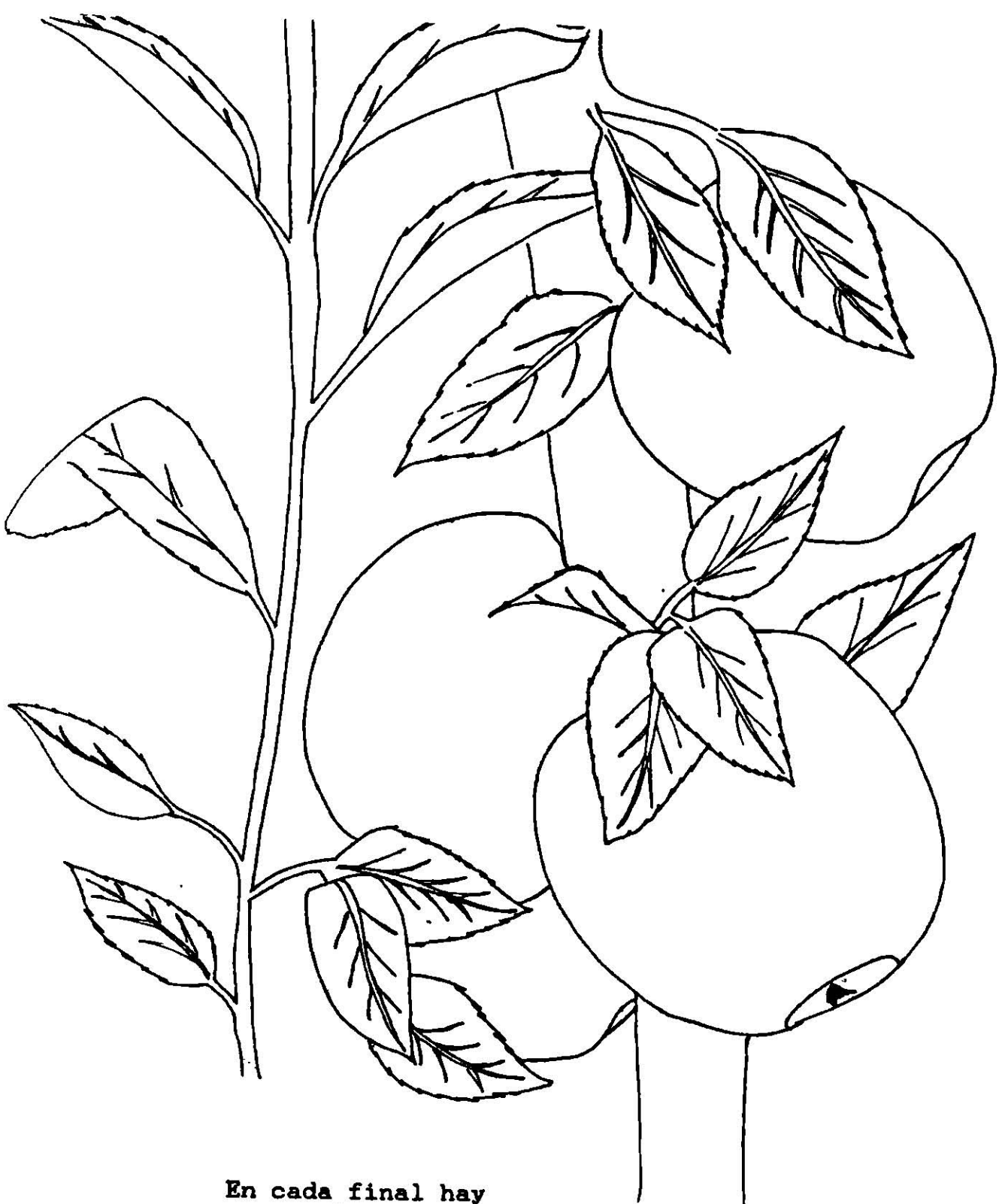
BIOL. JORGE VERDUGO.

SECRETARIO.



M. C. NABOR GONZALEZ GARZA.

VOCAL.



En cada final hay un nuevo comienzo, una oportunidad para forjar nuevas metas, para renovar nuestros sueños, o para reavivar las esperanzas.

Los finales son una manera de redescubrirnos de aprender quienes somos y analizar que es lo que queremos de la vida...

DEDICATORIA:

A LA MEMORIA DE MI ABUELO:

Sr. Telésforo Carranza Salcedo que dió vida a mi madre e inclucó en ella los valores que permiten trascender al hombre a lo largo de la vida.

A MIS PADRES:

Ing. Roberto González González y María Guadalupe Carranza de González, con todo el respeto, admiración y amor que nace desde lo más profundo de mi ser.

A MIS HERMANOS:

Dra. Ana Beatriz González de Enriquez.
M.C. Guadalupe Friné González de Lucho.
M.C. Patricia Irais González de Hernández.
Srita. Claudia Lucrecia González Carranza y
Roberto González Carranza.

A MIS SOBRINITOS:

Ana Betty, Friné, Paty y José Ramón.

AGRADECIMIENTOS:

Hoy y siempre mi eterno agradecimiento a mis padres porque primero que todo han sido mis amigos, y por enseñarme cada día que la grandeza del hombre radica en sus valores y en su fuerza de voluntad de luchar diariamente para lograr sus metas e ideales, gracias por enseñarme a ser un buen ser humano.

A mis hermanos que siempre han sido mi ejemplo a seguir y que juntos hemos aprendido a querernos, respetarnos y valorar el significado de una familia; en especial a Lucky por comprenderme y convivir conmigo durante estos años; durante los cuales hemos aprendido el significado de responsabilidad, libertad y respeto.

A los maestros : M.C Lydia Norma González Solís y M.C. Hazael Gutierrez Mauléon; que con su gran ayuda hoy una de mis grandes metas se ha convertido en realidad.

Al M.C. Alfredo Luis Aguilar del Centro de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias de la Unidad Experimental de Canatlán Durango por sus valiosas aportaciones de material vegetal utilizado en la realización del presente trabajo.

Al Dr. Marco Antonio Bustamante de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, por la valiosa información aportada para la realización del presente trabajo.

Al Ing. Lorenzo Recendiz Rojas del CIIDIR, Unidad Durango por sus sugerencias y ayuda desinteresada.

A mi Alma Mater que me acogió y brindó una importante parte de mi educación. Gracias a todos los maestros que tomaron parte de mi formación como profesionista y ser humano; en especial al maestro Gerardo Guajardo Martínez y Antonio Heredia Rojas.

A los maestros: M.C. Nabor González Garza y Biol. Jorge Verduzco por su gran colaboración para obtener el escrito final.

A mis amigos y compañeros de generación por haber compartido conmigo tantas experiencias; en especial a: Gloria Isela Cuevas Pérez, Luz Elena Delgado Amaya, Selene María Abad Rosales y Gerardo Bermejo Acosta.

INDICE:

	PAGINA:
DEDICATORIA.....	*
AGRADECIMIENTO.....	**
RESUMEN.....	1
INTRODUCCION.....	3
REVISION DE LITERATURA.....	9
ASPECTOS SOBRE EL CULTIVO DEL MANZANO.....	9
METODOS TRADICIONALES DE PROPAGACION DE MANZANO.	10
Uso de semillas.....	10
Propagación vegetativa.....	11
Propagación por hijuelos.....	12
Propagación por estacado.....	12
Propagación por acodo.....	13
Propagación por injerto.....	13
PROPAGACION POR TECNICA DE CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES.....	14
Establecimiento de un cultivo aséptico.....	15
Multiplicación del propágulo....	16
a).- Desarrollo de yemas terminales y axilares.....	16
b).- La propagación a través del cultivo de meristemos.....	16
c).- Desarrollo de yemas adventicias.....	17
d).- Embriogénesis somática.....	17

Enraizamiento y fortalecimiento de la planta.....	17
Factores que influyen en la multiplicación <i>in vitro</i>	18
1).- Medio nutritivo.....	18
a).- Sales inorgánicas..	18
b).- Sustancias orgánicas.	18
c).- Agar.....	19
d).- Antioxidantes.....	19
2).- Medio ambiente.....	19
a).- Luz.....	19
b).- Temperatura.....	19
VENTAJAS DE UTILIZAR LA TECNICA DE CULTIVO <i>IN VITRO</i>	19
ENFERMEDADES QUE COMUNMENTE ATACAN AL MANZANO...	21
Hongos.....	21
<u>Venturia inaequalis</u>	21
<u>Podospaera leucotricha</u>	21
<u>Monilia fruticola</u>	21
Bacterias.....	21
<u>Agrobacterium tumefaciens</u>	21
<u>Erwinia amylovora</u>	21
GENERALIDADES DEL CULTIVO DE TEJIDO <i>IN VITRO</i>	22
HIPOTESIS DE TRABAJO.....	28
MATERIALES Y METODOS.....	29
RESULTADOS Y DISCUSION.....	44

CONCLUSIONES	50
LITERATURA CONSULTADA	52

APENDICE I

MAPA No. 1.....	I.
MAPA No. 2.....	II.
MAPA No. 3.....	III.
MAPA No. 4.....	IV.
TABLA No. 1. Soluciones stock para el medio MS.....	V.
TABLA No. 2. Soluciones Stock para el medio WPM.....	V.
TABLA No. 3. Soluciones Stock para el medio α	VI.
TABLA No. 4. Agentes contaminantes encontrados.....	VI.
TABLA No. 5. Pruebas de antibiosis.....	VI.
TABLA No. 6. Análisis de varianza medio WPM, en yemas en refrigeración (7 días).....	VII.
TABLA No. 7. Análisis de varianza medio WPM, en yemas en refrigeración (21 días).....	X.
TABLA No. 8. Análisis de varianza medio WPM, en yemas en refrigeración (35 días).....	XIII.
TABLA No. 9. Medias entre genotipos y medios de culti- vo según # de primordios, long. de yemas y formación de callo (7 días).....	XVII.
TABLA No. 10 Medias entre genotipos y medios de culti- vo según # de primordios, long. de yemas y formación de callo (7 días).....	XVII.
TABLA No. 11 Medias entre genotipos y medios de culti- vo según # de primordios, long. de yemas y formación de callo (7 días).....	XVIII

GRAFICA No. 1..... XIX.

GRAFICA No. 2..... XX.

GLOSARIO DE TERMINOS..... XXI.

ABREVIATURAS..... XXII.

RESUMEN:

En la presente investigación se trabajó con yemas laterales de los patrones de manzano: Perón, MM-106, MM-109 y MM-111; el material fué donado por el CIFAP y la Huerta "La Lupe" ubicados ambos en Portero de Barreras Canatlán, Durango; el material se procesó en la unidad de Biotecnología Vegetal del Laboratorio de Fitopatología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

Los objetivos que se plantearon fueron los siguientes:

- Probar diferentes métodos para eliminar la contaminación in vitro.
- Probar diferentes medios para la inducción de brotes.
- Evaluar la respuesta de los diferentes genotipos.

El experimento se dividió en dos etapas; la primera de ellas comprendió el uso de yemas apicales y laterales y de 3 diferentes medios: MS, WPM y α . En esta etapa sólo se presentó contaminación en las yemas; siendo el agente etiológico predominante el hongo Alternaria sp.

En la segunda etapa; el método que dió resultados positivos comprendió el uso de agua bidestilada estéril, etanol al 70/ 30 seg., hipoclorito de sodio al 15% con 20 gotas de tween 20/ 10 min., y 8- hidroxiquinoleína al 0.5%/20 seg. Todos los pasos se efectuaron dentro de la Cámara de Flujo Laminar.

Los parámetros a evaluar para genotipos y medios fueron

los siguientes:

-Longitud de la yema o primordio más grande.

-Número de primordios.

-Formación de callo.

El mejor medio para inducción de brotes resultó ser el WPM; el genotipo que mejor respondió a las condiciones in vitro fué el MM-106 y el que presentó una respuesta pobre fué el Perón.

INTRODUCCION.

El manzano Pyrus malus L. ocupa el primer lugar de frutales en las regiones templadas; se cultiva desde hace más de 4,000 años. En la actualidad se conocen 8,500 variedades debido a su facilidad de hibridización. El manzano se introdujo en México hacia el año de 1670, proveniente de Europa. (Mendoza, M.V. 1965)

A pesar de las serias limitantes que el cultivo del manzano a nivel nacional ha tenido para su desarrollo, ésta es una actividad que representa un renglón económico de magnitud y consideración.

Representa una alta reutilización por unidad de superficie; lo que trae como consecuencia una notable elevación del nivel de vida del campesino.

Derivado de lo anterior, el cultivo del manzano determina un mejor aprovechamiento de la tierra al obtenerse más altos ingresos de la explotación de pequeñas superficies, que representa una buena solución parcial al agudo problema de la escasez de tierras para un mayor número de campesinos, que determina la existencia del minifundio, problema que cada vez se acentúa más en México.

La producción de manzano es permanente durante muchos años.

El campesino al saber que cuenta con un buen patrimonio se

arraiga más a su parcela y con esto se evitan las migraciones a las ciudades y los cinturones de miseria.

Del procesado de la cosecha se obtienen otros productos de la manzana empleados para la dieta nutritiva, industria, etc. por lo que se emplea gran cantidad de mano de obra. (Calderón. A. 1985).

El manzano es un frutal de gran importancia en el Norte de México. En Canatlán, Durango que es una de las principales zonas productoras de manzano en México, se encuentran plantadas más de 10,000 hectáreas, de las cuales aproximadamente 4,500 hectáreas están en producción y el resto en diferentes etapas de desarrollo aún no productivo; esta actividad es remunerativa y demanda gran cantidad de mano de obra durante la mayor parte del año si es bien desarrollada. En el Estado de Nuevo León existen pocas zonas donde se desarrolla el cultivo (apenas 2,127 hectáreas de superficie), debido a sus altas temperaturas; sin embargo, existen algunas variedades de manzano que pueden adaptarse a zonas calientes y se mantienen con escasos requerimientos de horas frío. Actualmente en Israel, para el cultivo del manzano se emplea la técnica del cultivo *in vitro*, utilizando explantes como tallos y yemas; con la finalidad de producir material propagativo libre de fitopatógenos debido a las restricciones cuarentenarias implementadas para evitar la diseminación de material infectado dentro de ese país.

Algunos de los problemas por los que se piensa es importante realizar estudios para desarrollar metodología para establecer cultivos de manzano en diferentes localidades, se enumeran a continuación:

- 1.- Se considera una actividad secundaria, por lo cual no tiene asesoría experimental adecuada.
 - 2.- Existe una falla de selección conveniente de variedades.
 - 3.- No existe una planeación adecuada que beneficie a todos los productores.
 - 4.- La producción regional no tiene una planeación coordinada a escala nacional entre productores, lo que ocasiona exista competencia en lugar de colaboración.
 - 5.- Los frutos no se consideran como fuentes naturales de nutrientes, sino como golosinas, por lo tanto existe poco consumo en fresco de los mismos.
 - 6.- Escasez de profesionistas que asistan al productor.
 - 7.- Las estadísticas no son confiables y no se formulan programas y proyectos adecuados para el desarrollo frutícola en México.
 - 8.- Existe una desventaja comercial y de salarios entre producción y transformación industrial de los frutos.
- (CONAFRUT.1976).

El manzano es propagado injertando yemas o púas en los diferentes cultivares, en portainjertos de semilla o

portainjertos propagados vegetativamente a través de estacas o acodos. (Hartmann. H. T. 1975).

Los patrones para árboles frutales se clasifican en francos (multiplicación generativa) clon y típicos (multiplicación vegetativa).

Los patrones clon y típicos, están unificados genéticamente, porque los esquejes de la plantas madre se multiplican por estaca. Para escoger los patrones influye y predomina el vigor con que se desarrolla la variedad injertada. En un injerto, el metabolismo del patrón y la púa se van modificando por interacciones entre uno y otro (Kramer.S. 1984).

El uso de portainjertos clonales es más recomendable, porque se consigue uniformidad en los árboles y los beneficios de los patrones ya mencionados.

Una de las tendencias más claras en el cultivo del manzano a nivel internacional es la de tratar de optimizar los recursos como tierra, agua y otros insumos de producción con la finalidad de producir más en cantidad y calidad con un menor período improductivo. Esto se logra con plantaciones con densidades medias de 400-800 árboles por ha hasta de 800-5,000 árboles/ha; que se logra con el uso de portainjertos clonales que en su mayoría reducen el vigor del árbol.(SARH, 1985).

En nuestras regiones productoras el uso de portainjertos clonales alcanza hasta un 10% siendo bajo en relación a otros países (90% en promedio) más tecnificados, considerando el uso

de éstos portainjertos como una alternativa para incrementar la producción promedio regional. (SARH. 1985).

El cultivo de tejidos vegetales es una técnica que puede resolver problemas prácticos como resistencia de las plantas a las enfermedades, tolerancia a presiones del ambiente, mejoramiento del valor nutritivo de productos alimenticios, obtención de productos naturales, además de conseguir clones con características deseables. (Sanchez de J. 1985).

Es difícil conseguir portainjertos clonales en el país; éstos se importan del extranjero a costos muy elevados, haciendo limitativo su uso. Se ha observado que muchos patrones que se utilizan para injertar variedades de importancia económica, son de dudable calidad y de características no adecuadas para soportar las condiciones ambientales de nuestro país. El tiempo requerido para obtener patrones de manzano tarda aproximadamente tres años, éstos se obtienen a partir de semillas o por esquejes; con la técnica de cultivo *in vitro* es posible reducir el tiempo de obtención en aproximadamente dos años, así como producir un mayor número de plantas en un menor espacio, aportan además uniformidad genética a los cultivos de manzano.

Por lo antes expuesto, el presente experimento se plantea como una técnica alternativa y relativamente rápida para la obtención de patrones de manzano de alta calidad tan necesarios para incrementar la productividad de éste cultivo. Actualmente

existen pocas investigaciones biotecnológicas encaminadas a mejorar la calidad de especies frutales, por este motivo se hace necesario adoptar técnicas modernas y efectivas para así lograr un incremento en la producción de productos alimenticios para el hombre. La presente investigación se basa en los siguientes objetivos:

- Probar diferentes métodos para eliminar la contaminación de yemas de manzano para establecimiento *in vitro*.
- Probar diferentes medios de cultivo para la inducción de brotes.
- Evaluar la respuesta de diferentes genotipos, a las condiciones de cultivo *in vitro*.

REVISION DE LITERATURA:

ASPECTOS SOBRE EL CULTIVO DEL MANZANO:

Según el sistema de Engler la clasificación del manzano es la siguiente:

DIVISION: EMBRIOPHYTA SIPHONOGAMA..

SUBDIVISION: ANGIOSPERMAE.

CLASE: DICOTYLEDONAE.

FAMILIA: ROSACEAE.

GENERO: Pyrus.

ESPECIE: Pyrus malus L. Malus sylvestris Mill.

Los principales países productores de manzana son:

América: Argentina, Chile, México y Estados Unidos.

Europa: Suecia, Dinamarca, Gran Bretaña, España, Francia, Holanda, Italia, Hungría, Luxemburgo, Suiza, Checoslovaquia, Rumania, Grecia, Yugoslavia y Polonia.

Asia: Turquía y Líbano.

Africa: República Sudafricana.

Oceanía: Nueva Zelanda. (Mapa No. 1)

(Postigo. 1981).

En México, los estados productores son los siguientes:

Baja California Sur, Coahuila, Chiapas, Chihuahua,

Distrito Federal, Durango, Guanajuato, Guerrero, Hidalgo, Jalisco, México, Michoacan, Morelos, Nuevo León, Oaxaca, Puebla, San Luis Potosí, Sonora, Tlaxcala, Veracruz y Zacatecas.(INEGI. 1986). (Mapa No.2)

El censo agrícola más reciente (1985), arrojó los siguientes resultados:

	SUPERFICIE COSECHADA(HA)			RENDIMIENTO	PRODUCCION	VALOR MILES
	TOTAL	RIEGO	TEMPORAL	TON/HA	TON.	DE PESOS.
TOTAL	52 222	31 301	20 921	6.101	423 071	31 162 890
DURANGO	9 064	6 880	2 184	6.411	58 106	4 184 167

(INEGI. 1990).

METODOS TRADICIONALES PARA LA PROPAGACION DE MANZANO.

a) *Uso de semillas:*

El uso de semillas como método de propagación de éste cultivo no es un procedimiento muy idóneo, ya que las variedades de especies frutales no son estables; porque cuando se forma el embrión la composición genética es una combinación de ambos progenitores; por lo tanto sus frutos son diferentes a las plantas que le dieron origen; ocasionando exista segregación genética. No se recomienda éste método para aplicarlo a huertos destinados a la obtención de fruta. La semilla cuando se utiliza se destina a la producción de patrones pero ocasiona heterogeneidad en los huertos. En México

más del 30% de los árboles han sido producidos por vía directa de semilla, lo que ha dado origen a una gran variabilidad genética, ocasionando que dentro de un huerto exista heterogeneidad en la calidad del fruto. (Calderón A. 1985).

El procedimiento para obtener portainjertos por semillas es el siguiente:

- 1.- Seleccionar frutos sanos y maduros.
- 2.- Limpieza de la semilla y almacenamiento en bolsas permeables al aire.
- 3.- Dejar reposar por varios meses sin cambios bruscos de temperatura y espolvorear con plaguicidas.
- 4.- Escarificación (de 30-45 hrs).
- 5.- Siembra en parcelas provisionales que constituyen el semillero.

(Calderón. A. 1985).

b) *Propagación vegetativa:*

Con éste tipo de propagación los árboles frutales conservan su identidad como variedad vegetativa o clon. El proceso actual de la fruticultura depende en gran medida de este tipo de propagación, sin el cual no existirían variedades definidas, siendo un caos la producción frutal. Fundamentalmente son cuatro métodos los que se utilizan:

hijuelos, estacado, acodo e injerto.

c) Propagación por hijuelos:

Es el de menos importancia y se utiliza a escala muy reducida; se aprovechan los retoños que aparecen alrededor de los árboles de una huerta establecida, directamente de la raíz y emergen del suelo. Se extraen con cuidado del suelo y pueden constituir plantas inmediatamente utilizables. El inconveniente de éste método es la transmisión de enfermedades virosas. La ventaja es que poseen la misma composición genética que la planta madre. (Calderón A. 1985).

d) Propagación por estacado:

Consiste en el corte de material vegetativo (varetas o chupones) de uno o dos años de edad, que después se colocan en un medio de suelo propicio donde se logra el enraizamiento y la brotación de la parte aérea; cada porción de la planta es llamada estaca.

Las ventajas de utilizar éste método son:

Simplicidad del procedimiento, obtención de un gran número de árboles a partir de una sólo planta madre, gran rapidéz, homogeneidad de los árboles obtenidos, ausencia de

incompatibilidad de dos partes vegetativas, conservación de características clonales, necesidad de poco espacio, bajo costo de operación.

Los inconvenientes son los siguientes:

Imposibilidad de una resistencia especial de la raíz a condiciones desfavorables, imposibilidad de lograr enanización y precocidad y reducidos porcentajes de prendimiento en algunas variedades. (Calderón. A. 1985).

e) Propagación por acodo:

Consiste en la obtención de raíces en ramas o brotes antes del corte o separación del material vegetativo de la planta madre.

La ventaja de éste método es ser fácil y seguro.

Las desventajas, requiere aplicación de reguladores de crecimiento y es un método lento para obtener un elevado número de plantas. (Calderón. A. 1985).

f) Propagación por injerto:

Es el método que se utiliza con mayor frecuencia, siendo sus ventajas, las siguientes:

Fácil conservación de un clon, gran facilidad de

propagación, uso de poco material vegetativo de la planta madre, rapidéz en la obtención de nuevos individuos, posibilidad de lograr plantas totalmente homogéneas, uso de patrones resistentes a condiciones desfavorables, uso de patrones que transmitan características deseables como enanización, obtención de mayor precocidad y determinación del período juvenil corto, posibilidad de cambio de variedad en árboles ya establecidos, vigorización y rejuvenecimiento de árboles enfermos o caducos, facilidad de estudio y evaluación de nuevas variedades, posibilidad de lograr estructuras fuertes en los árboles.

Las desventajas de éste método son las siguientes: requiere de ciertas condiciones específicas como son la habilidad del injertador, el método de injertado utilizado, la afinidad de las dos porciones vegetativas, la incompatibilidad y las influencias que ocasiona una porción vegetativa sobre la otra. (Calderón. A. 1985).

-PROPAGACION POR TECNICA DE CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES:

Street en 1977 (Citado por Hurtado M., 1987.) menciona que ésta técnica consiste en cultivar en medios nutritivos adecuados y en forma aséptica, ápices de raíz y de tallo, primordios de hoja, primordios o partes inmaduras de flores,

frutos inmaduros, órganos aislados, embriones maduros o inmaduros, segmentos de órganos de tallo y de hoja y algunas veces ovarios, óvulos anteras y polen.

La facilidad de usar ésta técnica para multiplicación masiva, produce material vegetal *in vitro* para iniciación de brotes adventicios, bulbos, tubérculos, embriones asexuales o por crecimiento de brotes de yemas axilares y producción masiva de plántulas a partir de meristemas.

Al tener un lote comercial de material madre *in vitro* se tiene la ventaja de mantenerlo en un espacio muy reducido con las condiciones ambientales requeridas y la calidad y sanidad deseables; debido al potencial morfogénético que tienen los meristemas y otros tejidos de la planta en la producción masiva de brotes. (Hurtado M. 1987).

La micropropagación se divide en varias fases que son: establecimiento o iniciación, multiplicación, enraizamiento y aclimatación de plántulas, cada una de las cuales tienen necesidades específicas y por lo cual se manejan bajo diferentes condiciones de cultivo.

1) *Establecimiento de un cultivo aséptico:*

El primer paso en cualquier sistema de cultivo *in vitro* es obtener un explante adecuado. Por lo general cualquier tejido u órgano de la planta puede utilizarse, su elección depende del propósito que se persiga y de la especie en cuestión. El tejido es desinfectado superficialmente antes de ponerse en cultivo,

para ello se utilizan soluciones cloradas.

2) *Multiplicación del propágulo:*

Se han utilizado diversas alternativas para la multiplicación clonal en plantas; como son los siguientes:

a).- Desarrollo de yemas terminales y axilares:

Las yemas axilares y terminales pueden ser inducidas al desarrollo *in vitro*; una sólo yema puede producir sólo un brote, aunque en ocasiones, dependiendo del medio y de la especie, una yema puede originar multiples brotes. Algunas veces hay formación de callo y los brotes se forman a partir de las zonas meristemáticas del callo. Si los brotes formados de las yemas producen a su vez nuevas yemas a lo largo de su eje, el proceso puede continuarse indefinidamente. En la propagación por éste método el número de propágulos está limitado al número de yemas disponibles. Este método se emplea especialmente en especies leñosas donde las yemas adventicias y la embriogénesis son difíciles de conseguir.

b).- La propagación a través del cultivo de meristemas:

Esta técnica es una modalidad del anterior; es muy difícil de lograr aislar el domo por lo que generalmente se extrae con dos primordios foliares; a éste tipo de explante se le llama ápice.

c).- Desarrollo de yemas adventicias:

Muchas especies son capaces de producir organogénesis adventicia, esto es, formar órganos como raíces, brotes, etc. a partir de tejidos que normalmente no los producen. Este procedimiento tiene un mayor potencial para la propagación masiva comparado con la inducción de yemas axilares. Una hoja, por ejemplo, puede producir miles de yemas o brotes por éste procedimiento.

d).- Embriogénesis somática:

Es el mecanismo de mayor potencial para la multiplicación clonal, ya que técnicamente una célula aislada es capaz de producir primero un embrión y a partir de éste una planta completa.

La embriogénesis somática se ha utilizado en especies altamente morfogenéticas como la zanahoria y la petunia. La embriogénesis somática puede darse en células en suspensión y eventualmente en callos.

3) *Enraizamiento y fortalecimiento de la planta:*

Los brotes obtenidos *in vitro* pueden producir raíces espontáneamente, pero frecuentemente requieren transferencia a otro medio de cultivo para inducir su enraizamiento.

Una vez obtenida la planta completa se establece en suelo estéril para luego ser plantada en el suelo donde permanecerá

definitivamente. (Chan, C. 1988).

Los factores que influyen en la multiplicación *IN VITRO* son:

1).- *Medio nutritivo.*- Los nutrientes que se necesitan en un medio de cultivo varían con la clase de planta y el tipo de órgano usado, así como los objetivos de producción del cultivo (Hartmann, 1975).

a).- Sales inorgánicas: Los diversos medios de cultivo contienen sales inorgánicas que son elementos mayores y elementos menores, algunos de éstos pueden ser excluidos o sustituidos por otros (Chan. C. 1988).

b).- Sustancias orgánicas: Los principales compuestos orgánicos son: azúcar, sustancias hormonales y vitaminas.

El azúcar es la principal fuente de carbohidratos y proporciona energía, generalmente se usa sacarosa del 2 al 4%.

Los reguladores de crecimiento más utilizados son auxinas y citocininas (ácido naftalenacético, ácido indol-acético y ácido indol-butírico).

La función de las vitaminas es ayudar o estimular los procesos de crecimiento de los

cultivos. Las más utilizadas son tiamina HCl, Ac. Nicotínico y la Piridoxina; otros compuestos que se agregan son: alcohol, myo-inositol y aminoacil-glicina (Chan.C . 1988).

c).- Agar: Es usado como soporte o gelificante.

d).- Antioxidantes: inhiben la acción de compuestos fenólicos.

2).- Medio ambiente:

a).- Luz.- La intensidad de la luz y el fotoperíodo varía según el objetivo que se tenga y el cultivo en particular.

b).- Temperatura.- Las temperaturas del cultivo deben ser iguales a las temperaturas que normalmente tienen las plantas en su hábitat original. La temperatura óptima para plantas de zonas templadas es de 20°C. (Chan.C. 1988).

Las ventajas de utilizar la técnica de propagación de material vegetal in vitro son las siguientes:

1).- Permite la obtención de un gran número de plantas genéticamente uniformes a partir de un pequeño propágulo, lo que hace posible la propagación rápida de variedades importantes cuando se dispone de pocos individuos; se han reportado hasta 4 millones de individuos a partir de un sólo propágulo de Cimbidium

(orquídeas).

- 2).- La propagación *in vitro* es totalmente independiente de la estación del año y las condiciones climáticas, puesto que se controlan en laboratorio. Esta es una ventaja importante si se trata de regiones con condiciones desfavorables para la propagación en el campo.
- 3).- Posibilidad de eliminación de virus en especies que se propagan vegetativamente.
- 4).- El cultivo de tejidos *in vitro* optimiza el espacio para la producción, ya que en una superficie reducida es posible almacenar cientos de miles de plantas, lo que reduce la mano de obra requerida y los riesgos de pérdidas por el ataque de plagas o enfermedades.

La desventaja de ésta técnica es que la metodología es costosa y no es factible en algunos cultivos de interés para el hombre.

El método de propagación *in vitro* tiene ventaja frente al de semilla de producir clones idénticos a los progenitores; frente a los diferentes métodos vegetativos (hijuelos, estacado e injerto) por evitar la transmisión de enfermedades virosas, además de reducir el tiempo de obtención y efectuarse en cualquier época del año.

Las enfermedades que comunmente atacan al manzano producidas por bacterias y hongos son las siguientes:

Hongos:

Venturia inaequalis (sarna de las manzanas). Se hace visible en el follaje después de la floración, en haz y envés manchas redondas y luego contornos irregulares. Las hojas mueren prematuramente y el follaje se pierde en verano.

Podosphaera leucotricha los botones se adelgazan y parecen estar secos; las escamas se presentan algo cubiertas; en primavera los botones brotan después que los sanos, las hojas se vuelven raquíticas; las flores enverdecen y no forman frutos; las hojas se vuelven pardas, se enrollan y se caen.

Monilia fructicola : (Momificado de las frutas): manchas pardas de pudrición, luego presenta teclas blanquecinas formando círculos concéntricos, los frutos se caen antes del cosechado o se momifican en el árbol.

Bacterias:

Agrobacterium tumefaciens (Agalla de la Corona). Se observa un abultamiento como coliflor en las raíces, el árbol se vuelve raquítico y después muere a causa de las excrescencias de la bacteria.

Erwinia amylovora (tizón de fuego). La parte de entrada de la enfermedad son las ramas gruesas con heridas que se han provocado durante la poda y que no son desinfectadas.

Generalidades de cultivos de tejidos *in vitro*:

En 1980 Werner E.M. y A. A. Boe, lograron la propagación de Malus sylvestris usando retoños y explantes primarios en medio MS modificado, para retoños adicionaron 0.5 mg/l de Bencilaminopurina, el enraizamiento por subcultivo de plántulas con 0.27% de agar, 1.0, 2.0 ó 3.0 de Acido Indol Butírico por 28 días.

En 1980 Snir, I. y A. Erez, lograron la propagación rápida de patrones Malling Merton (MM) MM-104, MM-106 y MM-109 (Malus sp.) usando medio basal de Murashige y Sckoog con 1.0 mg/l de 6-BA. y 1 mg/l de IBA para inducción de raíz, seleccionaron dos medios: el primero contenía IBA para iniciación de raíz, el segundo carecía de IBA pero tenía un 25% de Carbón activado para evitar el desarrollo radicular.

En 1982 Rodríguez, A.G., menciona algunos métodos de desinfección de varetas de cítricos para cultivarlos *in vitro* y obtener material vegetal libre de virus, entre éstos destacan la utilización de Benlate, Meneb, Vancomicina y Cámara Bioclimática; menciona además el uso de 8-hidroxiquinoleína.

En 1984 Parra, P. y V., Guerrero realizaron estudios de comportamiento de la variedad "Starkspur Supreme Delicious" sobre diez portainjertos de manzano, obteniendo la mayor producción en EMLA-26 Y P1., observandose además que los que inducen precocidad son MAC-1, CG-24, P-22, EMLA-26 y MAC-39.

En 1984 Sita, L. y B. Shobha, realizaron la propagación *in*

in vitro de segmentos nodales de Eucalyptus grandis en un medio basal MS, suplementado con tiamina, BA y Acido naftalenacético. Ellos obtuvieron la mayor formación de brotes en un medio con 0.5-2.0 mg/l de BA y 0.1-1.0 de NAA; al aumentar la concentración de BA, se aumentó la proliferación de callos, en medios con kinetina y NAA se inhibió la formación de brotes. El medio de enraizamiento fué preparado con la mitad de la dosis de las sales MS, suplementado con IBA y ANA, las concentraciones más bajas fueron las más satisfactorias.

En 1985 Lé, C.L., observó la influencia de la temperatura en la iniciación y desarrollo in vitro de raíces de portainjerto de manzano M-26 obteniendo como resultado que un rango de temperatura de 22 a 25°C fué el mejor para la formación de raíces, mientras que temperaturas de 28°C se inhibió la formación de raíces.

En 1985 Travers, J. N., C. J. Starbuck y N. J. Natarella, estudiaron los efectos del medio de cultivo in vitro de portainjerto de manzano Antonova-313, observando que la raíz aparecía visible en 6-8 días, el medio utilizado fue el MS modificado, suplementado con 0.25 µm de IBA, observando que la sacarosa influyó en la rizogénesis.

En 1987 Fiorino P. y F. Loreti, trabajaron con tres técnicas de propagación in vitro de árboles frutales, siendo estas: formación de meristemas adventicios (organogénesis), embriogénesis somática y multiplicación de brotes axilares;

utilizando como agentes desinfectantes el hipoclorito de sodio, Cloruro de calcio o etanol y limitando el uso de antibióticos y fungicidas; el fotoperíodo que utilizaron fue de 16 h luz/8 h oscuridad, encontrándose que los largos períodos de oscuridad son benéficos para el enraizamiento, también mencionan que el CO₂, etileno o etanol tienen efectos negativos sobre la morfogénesis, así como el PVP (Polivinylylpyrrolidina) que proviene de la polimerización de los compuestos fenólicos; además estos investigadores observaron en su experimento que la producción de etileno aumenta en el stress inicial, decreciendo con esto la pared celular en su lignificación y síntesis de celulosa, presentándose como resultado malformaciones hiperhídricas.

En 1987 Belmares, C., utilizó el medio WPM, conteniendo 58.4 µm de sacarosa y 6 g/l de agar para la proliferación de patrones de manzano MM-106; obteniéndose la proliferación y elongación óptimas con concentraciones de 16 µm de 6-BA, 1 µm de Acido Giberélico y 0.05 µm de AIB, el medio de transferencia que utilizó contenía 5 µm de AGs. También se presentó una mejoría en la respuesta del MM-106 al aumentar la concentración de sacarosa de 2 a 4%.

En 1987 Zimmerman R. H., Yae e I. Fordham, observaron que al establecer cultivares de manzano para enraizamiento, la oscuridad estimulaba éste proceso. Utilizando para ello dos medios, uno sólido y el otro líquido; el mejor resultado con el

medio sólido fué cuando agregaron 1 mM de PG (Phloroglucinol), mientras que en el medio líquido no resultó significativamente mayor. Sin embargo encontraron que un medio líquido con un sistema adaptador para el desarrollo de las raíces ofrece algunas ventajas sobre el medio sólido, como la sencillez de su preparación, los procedimientos asépticos y el manejo del material vegetativo.

En 1987, Pasqualetto, P.L. , R. H. Zimmerman e I. Fordham, observaron la influencia del agar sobre el medio, encontrando que el Gelrite provoca vitrificación del tejido debido a la presencia de potasio y magnesio, mientras que el Bactoagar, no afecta el tejido.

Chan, C. en 1988 cita a (Gautheret, 1939; Nobecourt, 1939 y White, 1939) que fueron los primeros en lograr cultivos exitosos *in vitro* de plantas, los primeros dos autores trabajaron con zanahoria y White con tabaco. (Morel, 1950) utilizó la técnica para propagar especies ornamentales; (Baux et al. 1977) propagaron fresa.

Chan, C. 1988., menciona que el medio de Murashige y Skoog ha sido utilizado para propagar frutales por Chatuverdi y Mitra, en 1974; Tabachnick y Kester en 1977; Eichnoltz et al 1979; Hamnershlag en 1982; Cheng en 1978 y Anderson en 1980.

En 1988, Pasqualetto P.L., Wergin y R.H. Zimmerman, observaron el efecto del Gelrite sobre hojas, encontrando células hipertrofiadas, degeneración del tejido en empalizada y

mesófilo esponjoso, además de grandes espacios intercelulares y número de estomas, no se encontraron efectos negativos al utilizar el Bactoagar.

En 1988 Martínez R., observó la relación portainjerto cultivar sobre el crecimiento, precocidad y contenido nutrimental del manzano, obteniendo que el MM-106 mostró altos contenidos de calcio y cobre; pero el MM-111 lo superó en contenido de zinc y manganeso.

En 1991 Reyes L. y R. Alonso, observaron la distribución radical y la capacidad de osmorregulación de cuatro portainjertos de manzano, obteniendo que la relación diámetro de copa de grosor del tronco y altura del árbol fueron mayores en portainjerto standar, el MM-109 tuvo respuesta similar y el MM-106 y MM-111 presentaron menor vigorosidad, el portainjerto MM-111 presentó más capacidad osmorreguladora bajo condiciones de stress hídrico.

En 1991. Hogue E.J. y D. Neilsen, desarrollaron un sistema para la producción rápida de patrones y ramas vivero de manzano Ottawa-3. Ocupando un tiempo de aproximadamente un año, utilizaron esquejes derivados de tejidos de cultivo *in vitro* y de plantas normales, el tamaño de los obtenidos *in vitro* superó a los normales, además se observó un mayor número de ramas en los patrones obtenidos *in vitro*.

En 1991 Zimmerman R.H., observó que los patrones obtenidos de la técnica *in vitro* presentaron más tolerancia a la

infestación de nemátodos (en la manzana blanca de asturias, MM-108 y M-26).

HIPOTESIS DE TRABAJO:

La hipótesis de trabajo planteada en el experimento es la siguiente:

Los tejidos vegetales obtenidos en el campo, tendrán organismos patógenos que dificultarán el establecimiento del cultivo *in vitro*.

Los medios de cultivo con concentraciones altas de citocininas inducirán la formación de brotes.

Al utilizar el cultivo *in vitro*, el tiempo y espacio de producción de plantas se verá reducido.

MATERIALES Y METODOS:

El material vegetal se obtuvo de la región frutícola de Canatlán, Durango; localizada entre los paralelos 24°00' - 24°55' N y los meridianos 104° 40' - 105° 10' W Greenwich; (Mapa No.1).

El material se trabajó en la Unidad de Biotecnología Vegetal del Laboratorio de Fitopatología Vegetal (donde se realizó la desinfestación, siembra e incubación de las yemas) y en el Laboratorio de Fitopatología (donde se mantuvieron las yemas en cámara bioclimática) de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

La primer colecta se realizó el 3 de abril de 1991 (yemas de invierno). El material se procesó 3 semanas después de permanecer en refrigeración.

La segunda colecta se realizó el 23 de Julio de 1991 y el material se procesó a partir del 13 de Agosto de 1991. (yemas de verano).

La tercer colecta se realizó el 20 de enero de 1992 (Yemas de invierno), las cuales se procesaron a partir del 27 de febrero de 1992.

La cuarta colecta se realizó el 22 de julio de 1992 (Yemas de verano), las cuales se procesaron a partir del 17 de Agosto de 1992.

Los cultivares empleados fueron los siguientes:

- Manzana Blanca de Asturias (perón).
- MM-106.
- MM-109.
- MM-111.
- EM-26.
- Manzano San Miguel.

- **Manzana blanca de Asturias:** Es un patrón bastante vigoroso, muy homogéneo y rústico; tiene además buena compatibilidad con todas las variedades comerciales. Las desventajas de este patrón es que es susceptible al ataque de Erisoma lanigerum (pulgón lanígero). (Calderón A. 1985).

Es un patrón resistente a la sequía, a la salinidad, heladas y nemátodos; siendo una desventaja ser hospedero de plagas como Carpocapsa pomonella (Palomilla del manzano).*

El material vegetativo de éste cultivar fué donado por la Huerta "La Lupe"; localizada en Potrero de Barreras, Canatlán, Durango. (Mapas No.3 y 4).

Los patrones clonales de la serie MM (Malling Merton) provienen de dieciséis patrones de diversos grados de vigor y resistencia al pulgón lanígero, de los cuales sólo 4 se consideraron importantes (MM-104, MM-106, MM-109 y MM-111). (Calderón A. 1985).

*(Comunicación personal: dada por el M.C Alfredo Luis Aguilar).

El material vegetativo de los cultivares: MM-106, MM-109, MM-111 fueron donados por el Centro de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias Durango; Campo Experimental #3, Canatlán, Durango, (CIFAP).(Mapas No.3 y 4).

- **Malling Merton 106 (MM- 106):** Se originó de hibridación entre Northern Spy por EM-I. Se le considera un patrón semienano, de comportamiento variable respectó a vigor de acuerdo al tipo de suelos. Determina sobre la variedad una gran precocidad y una alta productividad, teniendo además buen anclaje. Es bastante sensible a la sequía.(Calderón A. 1985).

Es un patrón semienano (70 a 80% respecto al perón o manzana blanca de Asturias); su producción se presenta hasta los 7 u 8 años y es susceptible a la pudrición del cuello.*

- **Malling Merton 109 (MM-109).** Fue obtenido por hibridación entre EM-II por Northern Spy. Es un patrón vigoroso, que dá lugar a árboles de mayor desarrollo que el MM-106. Este transmite a la variedad una gran productividad, y su sistema radical aunque no es muy potente dá lugar a un anclaje suficiente. Es bastante resistente a la sequía y sensible al exceso de humedad. (Calderón A. 1985).

- **Malling Merton 111 (MM-111).** Se obtuvo por hibridación entre Northern Spy por Merton 743, habiéndose originado primero éste último entre Northern Spy por EM-II. Es un patrón vigoroso muy semejante al EM-II, pero de mejores características. Se

*(Comunicación personal: dada por el M.C Alfredo Luis Aguilar).

caracteriza por ser sumamente productivo, a pesar de su vigor, y por inducir a una entrada en fructificación bastante rápida. Se adapta bien a suelos diversos, considerándose hoy en día como uno de los patrones que deben ser objeto de mayor recomendación. (Calderón A. 1985). Además es un patrón semienano, precoz (su producción se presenta a los 4 años) emisión de pocos chupones; el tamaño representa un 70 a 80% del tamaño del perón o manzana blanca de Asturias.*

*(Comunicación personal dada por el M.C. Luis Aguilar).

Medios de cultivo:

Los medios que se emplearon en la presente investigación fueron los siguientes:

- Medio Murashige-skoog (MS).
- Medio WPM.
- Medio α .

MEDIO MS:

Se utilizaron las sales inorgánicas de MS a la mitad de la concentración; 20 gr/l de Sacarosa, Agar Gelrite al 2% que después se sustituyó por el Bactoagar al 8%, 0.5 mg/l de BA y el pH se ajustó a 5.7. (Observar la tabla No.1).

MEDIO WPM:

Su preparación se efectuó de la siguiente manera:

Se agregó a un litro de agua bidestilada 0.40 gr/l de NH_4NO_3 .

Se colocaron también 10 ml de las soluciones Stock B, C, D, E, F y G (observar tabla No.2).

Originalmente se le adicionaron 20 g/l de Sacarosa, y 2 g/l de Agar Gelrite además de Carbón Activado; posteriormente la Sacarosa se sustituyó por Sacarosa grado reactivo, el agar por 8 g/l de Agar Agar Difco (Bactoagar); el carbón activado se eliminó para la segunda etapa.

Además se le adicionaron las siguientes hormonas:

BA: 1.0 mg/l; para medio inicial.

Para el medio de elongación y proliferación de brotes se adicionó la siguiente concentración de hormonas:

BA: 4 mg/l.

AGs: 2.9 mg/l.

AIB: 2.2 mg/l.

Se le adicionó además 100 mg/l de Ac. Ascórbico y 150 mg/l de Ac. Cítrico.

El pH se ajustó a 5.8.

MEDIO a:

Es una modificación del medio MS; aplicándose las sales MS a 1 1/2 de su dosis. (Ver tabla No.3).

El medio se preparó colocando un litro de agua bidestilada a la cual se agregaron las soluciones stock:

La solución stock 1 se adicionó directamente; mientras que de las soluciones stock 2, 3, 4 y 5 se adicionaron 10 ml de cada una.

Originalmente se agregaron 20 g/l de sacarosa, 2 g/l de Agar Gelrite y carbón activado; posteriormente la sacarosa se sustituyó por Sacarosa grado reactivo y el Agar por 8 g/l Agar Agar Difco (Bactoagar); el carbón activado se eliminó para la segunda etapa.

La concentración de hormonas que se utilizó fue de 0.5 mg/l de BA.

Se le adicionó además 100 mg/l de Ac Ascórbico y 150 mg/l de Ac. Cítrico.

El pH se ajustó a 5.7.

Las diferentes soluciones se pesaron con una balanza analítica marca Sertorius y una balanza digital marca Otlaus rango 150g/1500 g 1500 D.

Material biológico:

La colecta del material biológico se llevó a cabo de la siguiente manera:

Se seleccionaron los chupones de los patrones Manzana Blanca de Asturias, MM-106, MM-109 y MM-111 del área ya mencionada.

Posteriormente se colocaron en papel periódico húmedo envuelto en papel aluminio; de esta forma se trasladaron al Laboratorio de Biotecnología en la F.C.B. donde se procesó el material.

En la primera etapa de la investigación se utilizaron yemas de invierno y de verano de las colectas 1, 2 y 3; las cuales no se lograron aislar asépticamente; todas las varetas se colocaron durante tres semanas en refrigeración y todos los patrones se utilizaron en ésta etapa.

En la segunda etapa de la investigación se utilizaron yemas de verano; las varetas una vez en el Laboratorio se colocaron la mitad en la cámara bioclimática directamente y la otra mitad se colocó durante 3 semanas en refrigeración a una temperatura de 5° C durante un período de 3 semanas. Sólo se utilizaron las varetas de los patrones: Manzana Blanca de Asturias, MM-106, MM-109 y MM-111; de la colecta No. 4.

El explante utilizado para la primera etapa fueron yemas apicales y yemas laterales. En la segunda etapa del experimento se utilizaron yemas laterales únicamente (sólo yemas de verano).

Los métodos de desinfestación durante la primera etapa (para yemas de invierno y yemas de verano) fueron los siguientes:

Método I:

- 1.- Se lavaron las varetas con agua corriente y jabón, tallando las yemas con un cepillo de dientes de cerdas suaves.
- 2.- Se colocaron en benzal (al 1%) durante 5 minutos,
- 3.- Se colocaron en hipoclorito de sodio al 10% más 20 gotas de tween 20,
- 4.- En la Cámara de Flujo Laminar se lavaron con alcohol al 70 por 10 seg.
- 5.- Se enjuagaron con agua destilada estéril.

Método II:

La diferencia con el método I es que en lugar de utilizar hipoclorito de sodio se utilizó hipoclorito de calcio.

Método III:

Se siguió un procedimiento similar al método I, sólo que al tener las yemas en el hipoclorito de sodio y tween 20 se sometieron a vacío durante 5 minutos.

Método IV:

Basicamente fué el método I, exepcto que se adicionó una tableta de Grisovin FP 500 mg (Griseofulvina) por litro de medio nutritivo previamente disuelta en acetona y alcohol 96.

Método V:

Consistió en adicionar al medio una tableta de Micostatin 500 mg (Nistatina) por litro previamente disuelta en acetona y alcohol 96. El método de desinfestación fué el I.

En esta etapa se realizaron pruebas de antibiosis *in vitro* con Grisovin 1000 mg/l, Micostatin 1000 mg/l, Benlate 50 mg/l (Benomil de caracter sistémico, 2-Benzimidazol) , Benlate 100 mg/l, y Agua destilada estéril como testigo.

La prueba consistió en empapar discos de papel secante en cada uno de los plaguicidas ya mencionados; los cuales se colocaron en una placa de PDA donde se sembraron los hongos Alternaria sp y Rhizopus sp.

Método VI:

Se utilizó el método de desinfestación No. I, pero antes de sembrar las yemas se pasaron por una solución de Benlate a una concentración de 100 mg/l (0.1%).

Método VII:

Se procedió de la misma forma que el método VI excepto que la solución por la que se bañaron las yemas fué de Micostatin a 500 mg/l.

Método VIII:

Se procedió de la misma forma que el método VI excepto que la solución utilizada fue 8-hidrixiquinoleína al 0.5%, 1.0%, 2.5% y 5.0%.

Método IX:

Se llevó a cabo el mismo procedimiento que el método I; pero las varetas se lavaron y se colocaron en una solución de sacarosa al 1% estéril que se cambiaba cada tercer día en una Cámara bioclimática; en el punto óptimo se descascararon las yemas bajo microscopio estereoscópico y se colocaron en 8-hidroxiquinoleína al 0.5%; se bañaron con solución antioxidante y después se sembraron en los medios WPM y α ; todos los pasos se realizaron bajo la cámara de flujo laminar.

Método X:

Se realizó el mismo procedimiento del método IX; pero el

agua que se utilizó fue bidestilada tanto en los pasos de desinfestación como en la preparación de los medios.; la concentración que se utilizó de hipoclorito fue de 15% y se manejaron tres concentraciones de 8-hidroxiquinoleína: 0.25%, 0.5% y 1.0%; al preparar el medio se adicionó 10 mg/l de ac. Ascórbico y 15 mg/l de ac. cítrico.

El procesamiento de yemas en la segunda etapa fué el siguiente: (con yemas de verano), la mitad de las yemas se colocaron durante tres semanas en refrigeración, la otra mitad se colocaron en la cámara bioclimática en agua bidestilada estéril; la cual se cambiaba cada tercer día. Después de un período de 3 semanas que fue el tiempo en que tardaron las yemas en tener su desarrollo óptimo para colocarse en el medio de cultivo, se procedió a desinfestarlas y sembrarlas.

El método utilizado en esta segunda etapa fue el siguiente:

- 1.- Se lavaron las yemas con agua de la llave, jabón detergente y cepillo de dientes de cerdas suaves.
- 2.- Se descascararon las yemas bajo el microscopio estereoscopio dentro del cuarto de siembra.
- 3.- Se colocaron las yemas en agua bisdestilada estéril.
- 4.- Se lavaron las yemas con etanol al 70 por 30 seg. bajo la Cámara de flujo laminar (CFL).
- 5.- Se colocaron en hipoclorito de sodio al 15% más 20

gotas de Tween 20 durante 10 minutos en la CFL.

- 6.- Las yemas se lavaron tres veces con agua bidestilada estéril en la CFL.
- 7.- Se colocaron en una solución de 8-hidroxiquinoleína al 0.25%, 0.5% y 1.0% durante 20 segundos.
- 8.- Las yemas se enjuagaron con agua bidestilada estéril.
- 9.- Se sembraron en los medios.

Las condiciones de microclima que se crearon en la Cámara Bioclimática fueron las siguientes:

Temperatura: $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$.

Fotoperíodo: 16 h. luz/ 8 h. oscuridad.

Las condiciones de microclima del cuarto de incubación fueron las siguientes:

Temperatura: $25^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$.

Fotoperíodo: 16 h. luz/ 8 h. oscuridad.

La iluminación recibida por las plantas se produjo mediante lámparas solar A instantáneo, luz de día; 75 watts/T12/A1/LD 75 W. La intensidad lumínica fue de aproximadamente 2000 lux.

La temperatura se reguló con un clima marca Goldstar de 1 ton. de capacidad.

Los datos que se tomaron en las dos etapas del experimento fueron los siguientes:

- a) Respuesta del material inoculado.

b) Contaminación.

b.1.) Tipo de contaminación.

c) Grado de desarrollo (en mm).

d) Inducción de brotes.

d.1.) Longitud de brotes (mm).

d.2.) Número de brotes por yema.

e) Formación de callo.

Diseño experimental:

Completamente al azar con arreglo bifactorial con 10 repeticiones.

Se realizaron dos tipos de bioensayos; con yemas de invierno y yemas de verano; sin embargo, sólo los bioensayos de yemas de verano se sometieron a análisis estadístico.

Modelo estadístico:

$$Y_{ijk} = \mu + V_i + M_j + VM_{ij} + E_{ijk}.$$

Donde:

Y_{ijk} = Efecto obtenido de la ijk ésima observación.

μ = Media del experimento.

V_i = Efecto del i -ésimo genotipo.

M_j = Efecto del j -ésimo medio de cultivo.

VM_{ij} = Efecto de la ij -ésima interacción genotipo/ medio de cultivo.

E_{ijk} = Error experimental.

i = 4 genotipos o variedades.

j = 2 medios de cultivo.

K = 10 repeticiones.

15K = 80.

Se observó el efecto que tuvieron los plaguicidas sobre el crecimiento de hongos en la placa de PDA en la prueba de antibiosis *in vitro* realizada.

Se observó la respuesta del material inoculado, se registraron los diferentes tipos de contaminación y tamaño de las colonias en los medios de cultivo MS, WPM y α .

Diseño experimental:

En la segunda etapa el grado de desarrollo de las yemas se registró cada semana a partir de la fecha de siembra; tomándose para el análisis estadístico sólo las fechas de 7, 21 y 35 días. Se tomaron datos de número de primordios de cada una de las yemas así como su tamaño y formación de callo.

El número de repeticiones que se sometieron a análisis fueron 10 debido a que existía desuniformidad en número de repeticiones; en los casos que se presentaron más de 10 repeticiones se seleccionaron 10 en forma aleatoria.

Los métodos estadísticos utilizados fueron ANOVA bifactorial y comparación de medias por el método de Tukey.

Los factores para realizar el análisis estadístico bifactorial fueron los siguientes:

El factor A se manejó como los medios; sólo incluyendo el medio WPM y α porque sólo las yemas de la segunda etapa (de la cuarta colecta) se sometieron al análisis estadístico ya que en

estas si se logro eliminar la contaminación.

El factor B se manejó como los diferentes genotipos utilizados (sólo de la segunda etapa: Manzana Blanca de Asturias, MM-106, MM-109 y MM-111).

El número de repeticiones fue de 10.

El individuo en este caso fue una yema y la unidad experimental fue un frasco; la población total fue de 180 individuos en total; distribuyendose de la siguiente manera:

10 individuos de cada genotipo en cada uno de los medios (es decir 20) y esto se toma duplicado por las condiciones de refrigeración y no refrigeración a las que se sometieron las yemas.

Los tratamientos en la etapa dos fueron los siguientes:

a) previo a introducción en cámara bioclimática se colocaron las varetas por 3 semanas en refrigeración.

b) el resto de las varetas se colocaron directamente en la cámara bioclimática.

c) ambos grupos de varetas se establecieron *in vitro* una vez que las yemas estaban llenas o listas para brotar.

Las variables que se utilizaron fueron:

- Tiempo (7,21 y 35 días).
- Longitud de la yema o primordio más grande.
- Número de primordios o brotes por explante.
- Formación de callo.
- La escala utilizada fue en mm.

RESULTADOS Y DISCUSION:

En la presente investigación se lograron todos los objetivos planteados; en la primera etapa del experimento cuando se trabajó con yemas de invierno y verano, se observó contaminación en todos los explantes. (Ver tabla No. 4).

Las pruebas de antibiosis *in vitro* se realizaron el 4 de julio de 1991, sólo para los hongos Alternaria sp y Rhizopus sp. (Observar tabla No. 5 para resultados.)

El medio MS se utilizó sólo en la primera etapa ya que fué el que presentó mayor contaminación y se eliminó para la segunda etapa.

El medio donde se presentó mayor inducción de brote fué el α (material de la colecta 3).

El método de desinfestación con mejores resultados en la primer fase de la investigación fue el número 9: consistió en colocar las varetas en sacarosa al 1% en la Cámara de Flujo Laminar, el uso de hipoclorito de sodio al 10% más 20 gotas de Tween 20 por 10 minutos, alcohol al 70 por 10 segundos, descascarado de yemas bajo estereoscopio, uso de 8-hidroxiquinoleína al 0.5% y solución antioxidante.

De las yemas que se colocaron en cámara bioclimática al colocarlas en diferentes soluciones: benlate 100 mg/l, sacarosa 1%, agua destilada y agua bidestilada; el agua bidestilada fue la que resultó mejor y es la que se utilizó en la segunda etapa

del experimento.

El patrón que presentó menor índice de contaminación fue el manzano San Miguel.

El explante que presentó menor índice de contaminación fueron las yemas laterales; por lo que en la segunda etapa de la investigación se utilizaron sólo explantes de éste tipo.

Las variedades EM-28 y Manzano San Miguel se eliminaron en la segunda etapa del experimento debido a la dificultad para conseguirlas.

En el experimento se sustituyó la sacarosa por sacarosa grado reactivo para disminuir las fuentes de contaminación.

Las yemas que se lograron establecer con Gelrite presentaron vitrificación; anulándose ésta con el bactoagar; por ésta razón se sustituyó dicha sustancia.

En la segunda fase del experimento (yemas de verano); se logró la brotación y para la interpretación de resultados estadísticos en el ANOVA Y ONEWAY se consideró el valor de F calculada y la probabilidad bajo la curva; cuando la probabilidad fue menor de 0.05; se consideró que sí existió diferencia significativa. Sólo se incluyen los resultados que fueron significativos.

De los diferentes métodos de desinfestación para yemas de manzano; el de mejor resultado fué el que empleó agua bidestilada estéril, etanol al 70 por 30 segundos, hipoclorito

de sodio al 15% más 20 gotas de tween 20 por 10 minutos y el uso de 8- hidroxiquinoleína al 0.5% por 20 segundos antes de sembrar.

Se logró también inducir la bortación de yemas de manzano con ambos medios; dando los mejores resultados el WPM.

Aunque dentro de los objetivos no se contempló probar las yemas a diferentes condiciones de pretaratamiento para la inducción de brotes; éste se realizó debido a la gran dificultad que se presentó para lograr dicha inducción.

En la segunda etapa del experimento cuando se logró estabilizar el tejido en el medio; se observó una vitrificación del tejido; por lo que se optó por sustituir el agar Gelrite a Bactoagar y se pudo comprobar lo encontrado por Pasqualetto P.L., R. H., Zimmerman e I. Fordham 1987; aunque no se realizaron cortes de las hojas se sospecha que el Gelrite pudo también provocar malformaciones hiperhídricas sobre las mismas; como lo mencionan Pasqualetto P.L., R.H., Zimmerman e I. Fordham. en 1988; este es un punto interesante que se puede tratar en investigaciones futuras.

En el presente experimento se logró la proliferación de brotes de Pyrus malus en un medio de MS con concentraciones de sales a uno y medio de la concentración basal y de 0.5 mg/l de BA y con una concentración de agar de 8% (se maneja como medio α); las concentraciones del medio difieren notablemente de las utilizadas por Werner E. M. y A. A. Boe en 1980 y por Snir I

y A Erez en 1980 ya que los primeros mencionan que utilizaron el medio MS basal, una concentración de BA de 0.5 mg/l y 0.27% de agar; y los segundos utilizaron el medio MS basal con una concentración de 6-BA de 1.0 mg/l para inducción de brotes; ellos utilizarón IBA para inducción de raíz y 25% de Carbón activado para evitar el desarrollo de las mismas; en éste experimento; con el medio MS con concentración de uno y medio de sales y 0.5% mg/lt se logró inducir brotación por lo que el medio α aquí probado puede utilizarse como un medio para inducción de callo; la concentración de agar difiere notablemente con la de los autores debido al cambio realizado para evitar la vitrificación de yemas antes mencionada; sin embargo, en el presente experimento no se indujó la formación de raíz; y el carbón activado se utilizó como un medio para disminuir la concentración de fenoles producidos por las yemas en los medios.

Sita y B. Shobha en 1984 utilizaron el medio basal de MS suplementado con tiamina, BAP y NAA; obtuvieron una mayor brotación con concentraciones de 0.5-2.0 mg/l de BA y observaron que al incrementar las concentraciones de BA se aumentaba la proliferación de callos; en éste experimento se obtuvo buena brotación con una concentración de BA de 0.5 mg/l y se observó un porcentaje regular de proliferación de callos pero significativo.

De los métodos reportados por Rodríguez A. G. en 1982 para

- 1º Impacto ó aplicación de la técnica in vitro en mercurio.
- 2 - Ventajas de la técnica con respecto a la tradicional
- 3 - efecto la fase de transf. a suelo.
- 4 - Microorganismos del campo
- 5 - formación de lulo

desinfestación de varetas de cítricos sólo el uso de la Cámara Bioclimática dió resultado en este experimento; además el uso de la 8-hidroxiquinoleína al 0.05%.

En el trabajo expuesto por Fiorino P. y F. Loreti en 1987 se mencionan tres técnicas de propagación *in vitro* de árboles frutales; ellos utilizaron para desinfestación los siguientes compuestos: NaClO, CaCl₂O₂ y etanol; limitaron el uso de antibióticos y fungicidas y utilizaron un fotoperíodo de 16 h. luz y 8 h. oscuridad; observaron además que el CO₂ y el etileno producen efectos negativos en morfogénesis y malformaciones hiperhídricas. En este experimento el NaClO y etanol fueron los únicos agentes desinfestantes de los reportados por los autores que arrojaron resultados positivos; también se limitó el uso de antibióticos y fungicidas porque no dieron buenos resultados y en cuanto al CO₂ y etileno; no es posible realizar un conclusión contundente; por lo que se recomienda un estudio más amplio en este sentido.

El medio WPM, utilizado por Belmares en 1987 para proliferación de brotes de patrones de manzano MM-106 a partir de tallos con concentraciones de 58.4 µm de sacarosa, 6 g/l de agar, 16 µm de BA, 1 µm de AGs y 0.05 µm de AIB; en general fue satisfactorio para la proliferación de brotes de yemas de manzano; variando sólomente la cantidad de agar utilizada.

De acuerdo a lo obtenido en el análisis de varianza en los períodos de 7 y 21 días en las yemas sometidas a refrigeración

observamos que si existe diferencia en longitud de yemas (mm); mientras que en el número de primordios y en formación de callo no hay diferencia significativa. (Observar tablas No. 6 y 7 y gráficas No.1 y 2). A los 7 días los genotipos MM-111, MM-109 y MM-106 respondieron favorablemente al medio WPM. En el período de 21 días existe diferencia significativa entre el perón y MM-109 contra el MM-106 y MM-111. En el período de 21 días los genotipos MM-111 y MM-106 respondieron favorablemente al medio WPM.

En el período de 35 días se observa diferencia significativa en la respuesta de longitud de yema (mm) así como en el número de primordios foliares en los genotipos sin embargo no existe diferencia significativa en formación de callo en ningún aspecto.

(Observar tabla No. 8 y gráficas No.1 y 2). Los genotipos MM-111 y MM-106 respondieron favorablemente al medio WPM. Los genotipos MM-109, MM-111 y MM-106 respondieron favorablemente al medio WPM. En las yemas sembradas en el medio α ; no se observó diferencia significativa en ninguna fecha ni para ningún parámetro; se omiten los análisis debido a que no fueron significativos.

En las yemas que no se sometieron a refrigeración; no existe una diferencia significativa en ninguna de las fechas de días respecto a ningún parámetro. (Se omiten análisis estadísticos ya que no resultaron significativos).

CONCLUSION:

- En la fase de desinfestación los patógenos observados fueron: Alternaria sp., Penicillium sp. y en menor grado Aspergillus sp. y Rhizopus sp.

- El fungicida Micostatin actuó sobre Alternaria sp. y Rhizopus sp.

- En esta fase el método más efectivo consistió en colocar las varetas en sacarosa al 1% en la Cámara Bioclimática, el uso de hipoclorito de sodio al 10% más 20 gotas de Tween 20 por 10 minutos, alcohol al 70 por 10 segundos, desbracteado de yemas bajo estereoscopio, uso de 8- hidroxiquinoleína al 0.5% y solución antioxidante.

- El explante de yemas laterales y el patrón de Manzano San Miguel, presentaron menor índice de contaminación en el Medio α .

- Las yemas brotaron mejor en cámara bioclimática con agua bidestilada estéril como sustrato.

- En la fase de brotación el método de desinfestación consistió en aplicar: agua bidestilada estéril, etanol al 70 por 30 seg, hipoclorito de sodio al 15% más 20 gotas de tween 20 por 10 minutos y el uso de 8-hidroxiquinoleína al 0.5%/ 20 segundos antes de sembrar.

- El genotipo que mostró mejor respuesta a las condiciones in vitro fue el MM-106 y el que respondió menos satisfactoriamente fue el perón.

- En el medio WPM las yemas lograron una mayor longitud y un mayor número de primordios, bajo condiciones de refrigeración las fechas 7, 21 y 35 días mostraron diferencias significativas estadísticamente, en yemas no refrigeradas no existió diferencia significativa.

LITERATURA CITADA:

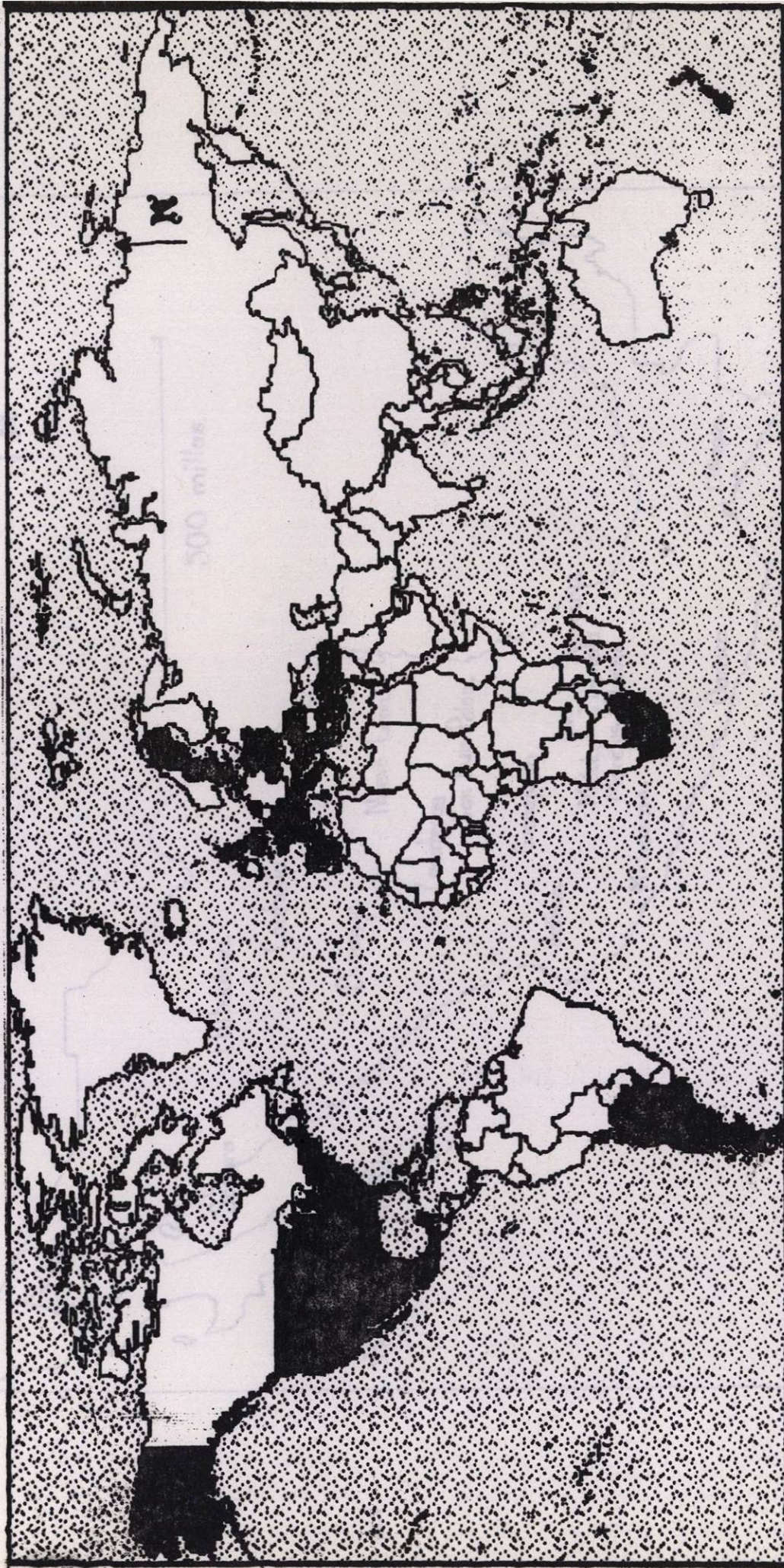
- Belmares C., F. A., 1987. Proliferación de tallos de manzano "MM-106" y del ciruelo "Marianna-2426" *in vitro*. Tesis Profesional. División de Agronomía. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. 48 p. Coahuila, México.
- Calderón A. E., 1985. Fruticultura General. El esfuerzo del hombre. Tercera Edición. Editorial LIMUSA. México, D.F. p. 3-260.
- Chan C. J. L., 1988. El durazno. Universidad Autónoma de Zacatecas p.p. 334-345.
- CONAFRUT., 1976. Plan Nacional de Desarrollo Frutícola. 1971-1976. p.p. 3-20.
- Hartmann. H. T. y D. E. Krestler., 1975. Propagación de plantas. Principios y prácticas. 3a. Edición. Editorial CECSA. México. p.p. 15-234.
- Hogue, J. y D. Neilsen, 1991. Rapid production methods for Ottawa-3 rootstock and branched apple nursery stock. HortScience. 26(11): 1416-1419.
- Hurtado M., 1987. Cultivo de tejidos vegetales. Edit. Trillas. México. D.F. p.p. 130-135.
- INEGI., 1986. Anuario de estadísticas estatales. México. p. 171.
- INEGI., 1990. Anuario estadístico de los Estados Unidos Mexicanos. 1988-1989. México. p. p. 574-576.

- Kramer. J.R. 1984. Relaciones hídricas de suelos y plantas. Una síntesis moderna. Edutex S.A., México p. 230-235.
- Lé C. L., 1985. Influence of temperature on *in vitro* root initiation and development of apple rootstock M26. HortScience 20(3):451-452.
- Martínez R. O. A., 1982. Relación de portainjerto/cultivar sobre el crecimiento, precocidad y contenido nutrimental en manzano (*Malus domestica* B.). Resumen del Congreso de Horticultura. Saltillo Coahuila, México, p. 98.
- Mendoza. M. V., 1965. El cultivo de la manzana. Centro Nacional de Productividad, México. p. p. 1-9.
- Parra Q. R., 1991. Comportamiento de "Starkpur supreme delicious" sobre diez portainjertos de manzano. Resumen Congreso de Horticultura. Saltillo Coahuila, México. p. 104.
- Pasqualetto. L., R. H. Zimmerman e I. Fordham., 1987. The influence of cation and gelling agent concentrations on vitrification of apple cultivars *in vitro*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 14(31): 31-40.
- Pascualetto. L., W.P. Wergin y R.H. Zimmerman., 1988. Changes in structure and elemental composition of Vitrified Leaves of "Gala" apple *in vitro*. Acta Holticulturae, Vegetative Propagation Woody species. 227: 352-357.
- Postigo. L., 1981. Geografía Universal Ilustrada Sopena. Edit. Ramón Sopena S.A. Barcelona, España. Vol. II y Vol. III.

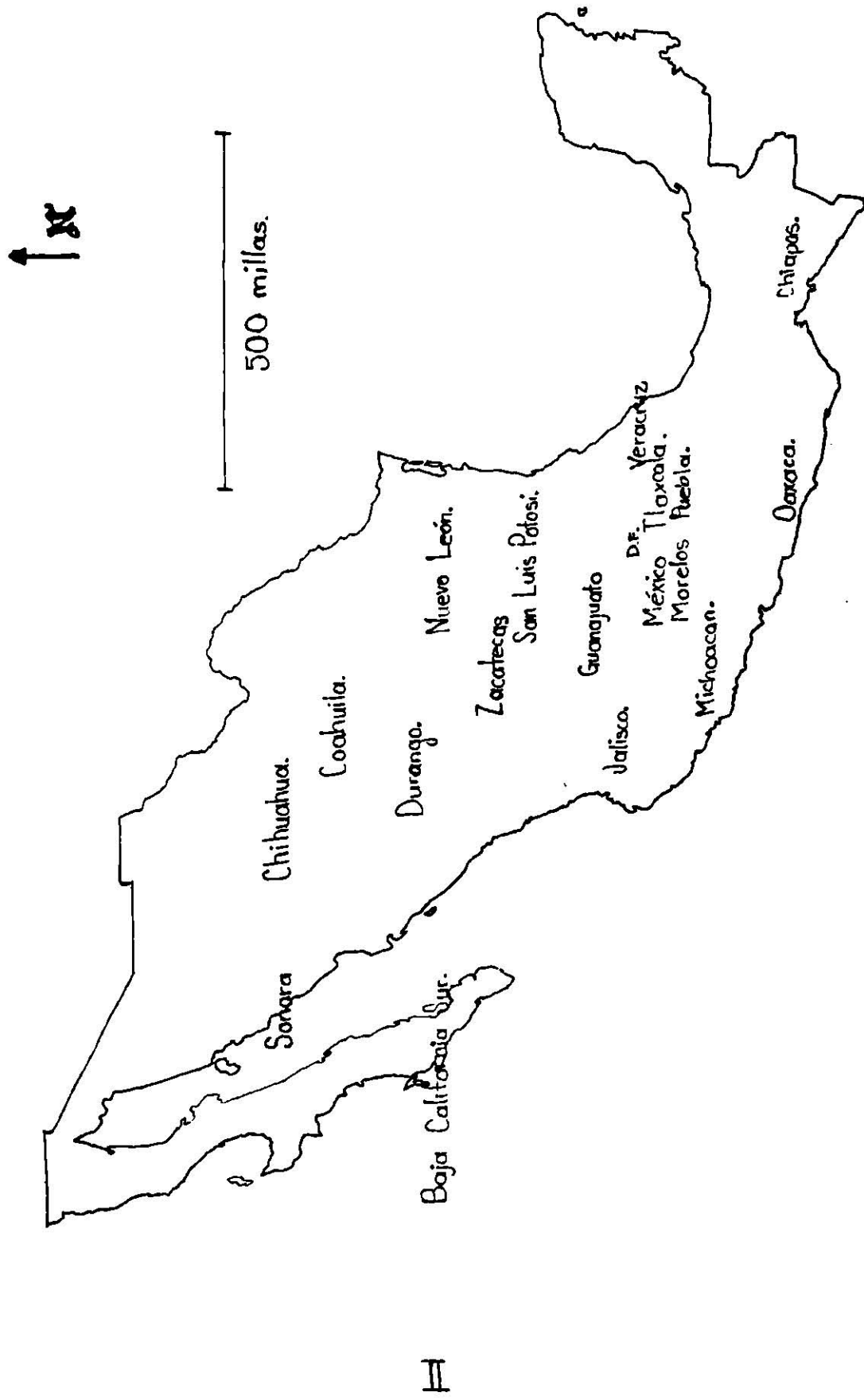
527p.

- Reyes L., A. 1991. Distribución radical y capacidad de osmorregulación de cuatro portainjertos de manzano. Resumen del Congreso de Horticultura, Saltillo, Coah. México. p. 238.
- Rodríguez A. G., 1982. Producción de brotes de varetas de cítricos in vitro técnica auxiliar de microinjerto. Tesis profesional. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Autónoma de Nuevo León. México. 50p.
- Sanchez de J., 1985. El cultivo de tejidos vegetales en la investigación básica. El cultivo de tejidos vegetales en México. Centro de Investigaciones Científicas de Yucatán. Congreso Nacional de Ciencia y Tecnología. México. p.p 111- 124.
- SARH., 1985. Investigación en frutales para la Sierra de Chihuahua. 1984-1985, SARH., INIA., CIANE., Campo Agrícola Experimental Sierra de Chihuahua. p. 30-37.
- Sita L.G. y Shobha R., 1984 In vitro propagation of Eucalyptus grandis L. by tissue culture. Springer Veilag. p. 13-14
- Snir. I. y A. Erez., 1980. In vitro propagation of Malling Merton apple rootstocks 1,2. HortScience. 15(5): 597-598.
- Travers J.N., C.J. Starbuck y N.J. Ntarella., 1985. Effects of culture medium on in vitro rooting of Antonovka 313 apple. HortScience 20(6): 1051-1052.

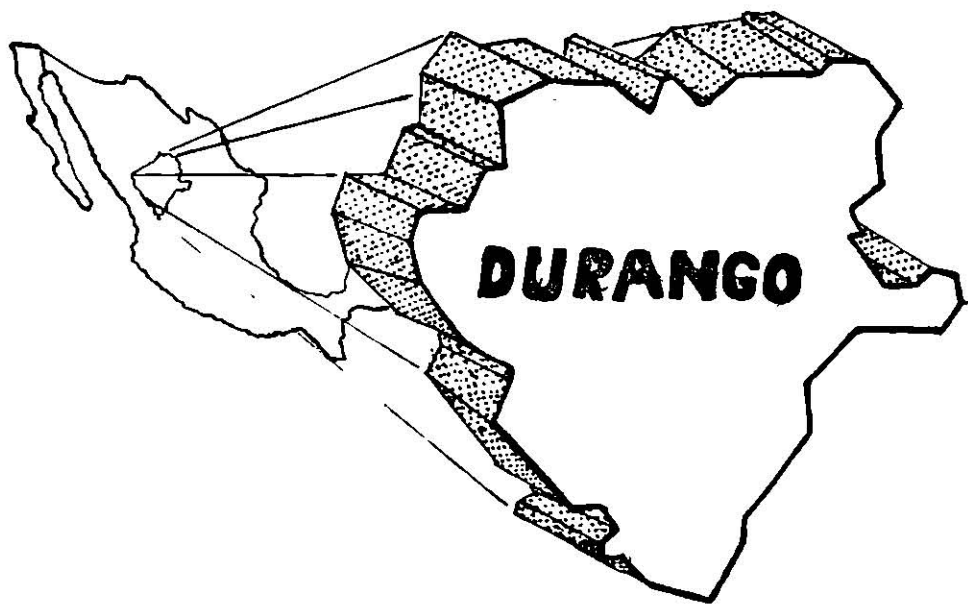
- Werner E. M. y A. A. Boe., 1980. *In vitro* Propagation of
Malling apple Rootstock. HortScience 15(4): 509-510.
- Zimmerman. R. H., B. W. Yae e I. Fordham., 1987. Comparasion of
rooting methods for apple cultivars *in vitro*. Acta
Horticulturae 212:304-310.
- Zimmerman.R.H. 1991. Micropropagation of temperate zone fruit
and nut crops. Micropropagation. Klouwer Academic
Publishers.Netherlands. 231-246.



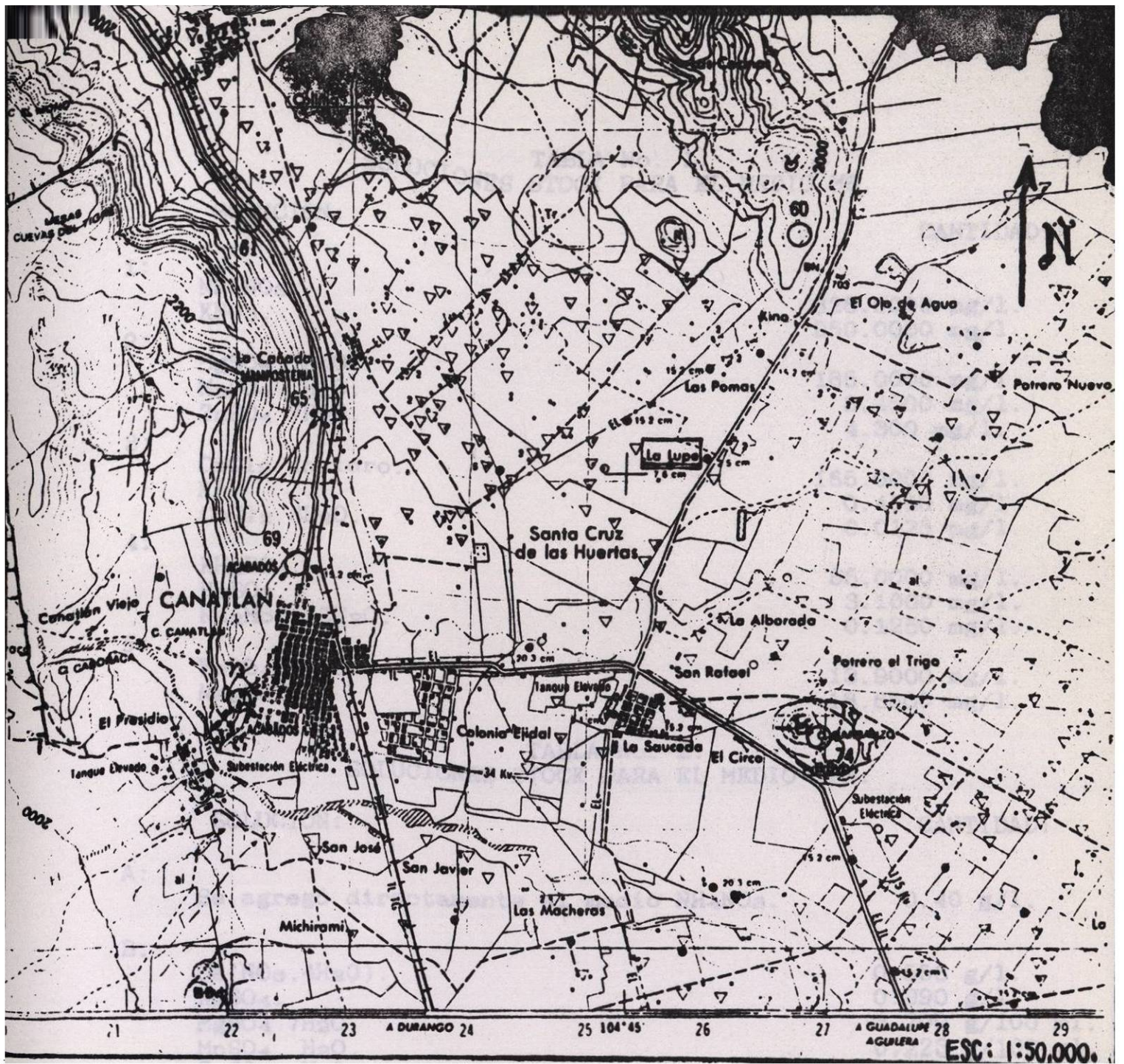
MAPA No. 14 DISTRIBUCION MUNDIAL DEL MANZANO.



MAPA No. 2. Estados productores de manzanas en la República Mexicana.



MAPA No. 3. LOCALIZACION DE LA ZONA DE COLECTA.
ESTADO DE DURANGO.



EN PRODUCCION •

ABANDONADO ✦

NORIAS ▼

MAPA No. 4: Localización del área de colecta: Huerta "La Lupe" y Centro de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias Durango; Campo Experimental # 3, Canatlán Durango (CIFAP).
 Coordenadas: Paralelo: $24^{\circ} 32.5'$; Meridiano $104^{\circ} 44.9'$.
 (DETENAL, 1978).

TABLA No. 1.
SOLUCIONES STOCK PARA EL MEDIO MS.

SOLUCION:	CANTIDAD:
1:	
NH ₄ NO ₃ .	825.0000 mg/l.
KNO ₃ .	950.0000 mg/l.
2:	
MgSO ₄ 7H ₂ O.	185.0000 mg/l.
MnSO ₄ H ₂ O.	8.4500 mg/l.
ZnSO ₄ 7H ₂ O.	4.300 mg/l.
3:	
CaCl ₂ anhidro.	165.0000 mg/l.
KI.	0.4150 mg/l.
CoCl ₂ 6H ₂ O.	0.0125 mg/l.
4:	
KH ₂ PO ₄ .	85.0000 mg/l.
H ₃ BO ₃ .	3.1000 mg/l.
Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ O.	0.1250 mg/l.
5:	
FeSO ₄ 7H ₂ O.	13.9000 mg/l.
Na ₂ EDTA.	18.6500 mg/l.

TABLA No. 2.
SOLUCIONES STOCK PARA EL MEDIO WPM.

SOLUCION:	CANTIDAD:
A:	
Se agregó directamente al medio NH ₄ NO ₃ .	0.40 g/l.
B:	
Ca(NO ₃ .4H ₂ O).	0.558 g/l.
K ₂ SO ₄ .	0.990 g/l.
MgSO ₄ 7H ₂ O.	3.700 g/100 ml.
MnSO ₄ H ₂ O.	0.223 g/100 ml.
ZnSO ₄ H ₂ O.	0.086 g/100 ml.
CuSO ₄ 5H ₂ O.	0.25 mg/100 ml.
C:	
CaCl ₂ 2H ₂ O.	0.96 g/100 ml.
D:	
KH ₂ PO ₄ .	1.700 g/100 ml.
H ₃ BO ₃ .	0.620 g/100 ml.
Na ₂ MO ₄ 2H ₂ O.	0.0025 g/100 ml.
E:	
FeSO ₄ 7H ₂ O.	0.278 g/100 ml.
F:	
Thiamina HCl.	0.010 g/100 ml.
Ac. Nicotínico.	0.005 g/100 ml.
Piridoxina HCl.	0.005 g/100 ml.
Glicina.	0.020 g/100 ml.
G:	
Mioinositol.	1.000 mg/l.

TABLA No. 3.
SOLUCIONES STOCK PARA EL MEDIO α.

SOLUCION:	CANTIDAD:
1:	
NH ₄ NO ₃ .	2,475.0000 mg/l.
KNO ₃ .	2,850.0000 mg/l.
2:	
MgSO ₄ 7H ₂ O.	555.0000 mg/l.
MnSO ₄ H ₂ O.	25.3500 mg/l.
ZnSO ₄ 7H ₂ O.	12.9000 mg/l.
3:	
CaCl ₂ anhidro.	495.0000 mg/l.
KI.	1.2450 mg/l.
CoCl ₂ 6H ₂ O.	0.0375 mg/l.
4:	
H ₂ PO ₄ .	255.0000 mg/l.
H ₃ BO ₃ .	9.3000 mg/l.
Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ O.	0.3750 mg/l.
5:	
FeSO ₄ 7H ₂ O.	41.7000 mg/l.
Na ₂ EDTA.	55.9500 mg/l.

TABLA No. 4.
AGENTES CONTAMINANTES ENCONTRADOS:

HONGOS:	BACTERIAS:	OTROS:
<u>Aspergillus</u> sp.*	Transparente. **	Levaduras.*
<u>Alternaria</u> sp. ***	Blancas. ***	
<u>Penicillium</u> sp. **	Rosas.*	
<u>Rhizopus</u> sp. *		

*** ABUNDANTE.
** MEDIO.
* ESCASO.

TABLA No 5.
PRUEBA DE ANTIBIOSIS:

HONGO:	PLAGUICIDA:				TESTIGO AGUA DECT. EST.
	1000 mg MICOSTATIN	1000 mg GRISOVIN	50 mg BENLATE	100 mg BENLATE	
<u>Alternaria</u> sp	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)
<u>Rhizopus</u> sp.	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)

(-).- El hongo no presentó crecimiento.
(+).- El hongo presentó crecimiento.

TABLAS DE RESULTADOS DE ANOVA SEGUNDA ETAPA DEL EXPERIMENTO.

MEDIO: WPM.
CONDICION: CON REFRIGERACION.
TIEMPO: 7 DIAS.

GRUPO DE MEDIAS:

LONGITUD DE YEMA (MM).

GENOTIPOS.

MEDIA TOTAL DE LA POBLACION: 8.80

GENOTIPOS:

PERON	MM-111	MM-109	MM-106
8.20	7.80	8.30	12.90

OBSERVAR GRAFICA No. 1.

NUMERO DE PRIMORDIOS.
GENOTIPOS.

MEDIA TOTAL DE LA POBLACION: .40

GENOTIPOS:

PERON	MM-111	MM-109	MM-106
.40	1.00	.00	.20

OBSERVAR GRAFICA No. 2.

TABLA No.6:

*** ANALISIS DE VARIANZA ***

MEDIO: WPM.
TIEMPO: 7 DIAS.
CONDICION: YEMAS SOMETIDAS A REFRIGERACION.
LONGITUD DE YEMA (mm)
GENOTIPOS

Superficie de variación:	Suma De Cuadrados	GL	Cuadrado Medio	F	p
Genotipos:	248.200	3	82.733	4.405	.010
Residual	676.200	36	18.783		
Total	924.400	39	23.703		

Gran Media = 8.800
 Multiple R Cuadrado .268
 Multiple R .518

- - - - - O N E W A Y - - - - -

LONGITUD DE YEMA (mm)

GENOTIPOS

Analisis de Varianza

Superficie	D.F.	Suma de Cuadrados	Cuadrado Medios	F	P
Entre Grupos	3	248.2000	82.7333	4.4046	.0097
Con Grupos	36	676.2000	18.7833		
Total	39	924.4000			

- - - - - O N E W A Y - - - - -

Group	Total	Media	Desviación Standard	Error Standard	95 % Conf Int	Media
Grp 1	10	6.2000	1.3166	.4163	5.2582 a	7.1418
Grp 2	10	7.8000	4.4920	1.4205	4.5866 a	11.0134
Grp 3	10	8.3000	3.5292	1.1160	5.7753 a	10.8247
Grp 4	10	12.9000	6.3849	2.0191	8.3325 a	17.4675
Total	40	8.8000	4.8685	.7698	7.2430 a	10.3570
Efectos fijos modelo			4.3340	.6853	7.4102 a	10.1898
Efectos de probab.				1.4382	4.2232 a	13.3768

Efectos de probabilidad del modelo - Varianza estimada entre componentes: 6.3950

- - - - - O N E W A Y - - - - -

Grupo	Minimo	Maximo
Grp 1 (perón)	4.0000	8.0000
Grp 2 (MM-111)	3.0000	17.0000
Grp 3 (MM-109)	5.0000	16.0000
Grp 4 (MM-106)	3.0000	22.0000
Total	3.0000	22.0000

Pruebas para homogeneidad de varianzas:
 Cochrans C = Max. Varianza/Sum(Varianzas) = .5426,
 P = .020 (Approx.)
 Bartlett-Box F = 5.816 , P = .001
 Maxima Varianza / Minima Varianza 23.519

----- O N E W A Y -----

LONGITUD DE YEMA (mm)
 GENOTIPOS

Prueba Multiple de Rangos:

Procedimiento de Tukey-HSD
 Rangos para el nivel .050 -
 3.81 3.81 3.81

Los rangos se observan en tabla correspondiente.

El valor comparado entre medias (J)- (I) fue..

3.0846 * Rango * Cuadrado(1/N(I) + 1/N(J))

(*) Denota pares de grupos significantivamente diferente al nivel .050.

----- O N E W A Y -----

LONGITUD DE YEMA (mm)

		G G G G	
		r r r r	
		P P P P	
Media	Grupo	1 2 3 4	
6.2000	Grp 1		Grupo 1= perón.
7.8000	Grp 2		Grupo 2= MM-111.
8.3000	Grp 3		Grupo 3= MM-109.
12.9000	Grp 4	*	Grupo 4= MM-108.

Subgrupos Homogeneos (Subgrupos de grupos, que son las mayores y menores medias y no difieren significativamente en los rangos para el tamaño del subgrupo).

SUBGRUPO 1

Grupo	Grp 1(Perón)	Grp 2 (MM-111)	Grp 3 (MM-109)
Media	6.2000	7.8000	8.3000

SUBGRUPO 2

Grupo	Grp 2 (MM-111)	Grp 3(MM-109)	Grp 4 (MM-108)
Media	7.8000	8.3000	12.9000

MEDIO: WPM.
 CONDICION: CON REFRIGERACION.
 TIEMPO: 21 DIAS.

GRUPO DE MEDIAS:

LONGITUD DE YEMA (MM).

GENOTIPOS.

MEDIA TOTAL DE LA POBLACION: 14.43.

GENOTIPOS:

PERON	MM-111	MM-109	MM-106
8.10	13.90	11.40	24.30

OBSERVAR GRAFICA No. 1.

NUMERO DE PRIMORDIOS.
 GENOTIPOS.

MEDIA TOTAL DE LA POBLACION: 1.33

GENOTIPOS:

PERON	MM-111	MM-109	MM-106
1.20	1.40	.60	2.10

OBSERVAR GRAFICA NO. 2.

TABLA No.7.

*** ANALISIS DE VARIANZA ***

MEDIO: WPM.
 TIEMPO: 21 DIAS.
 CONDICON: YEMAS SOMETIDAS A REFRIGERACION.

LONGITUD DE YEMA (mm)
 GENOTIPOS

Superficie de variación:	Suma De Cuadrados	GL	Cuadrado Medio	F	P
Genotipos:	1469.475	3	489.825	6.084	.002
Residual:	2898.300	36	80.508		
Total:	4367.775	39	111.994		

R Cuadrado Multiple	.336
Multiple R	.580

- - - - - O N E W A Y - - - - -

LONGITUD DE YEMA (mm)

GENOTIPOS

Análisis de Varianza

Superficie	D.F.	Suma de Cuadrados	Cuadrado Medios	F	P
Entre Grupos	3	1489.4750	489.8250	6.0842	.0019
Con Grupos	36	2898.3000	80.5083		
Total	39	4387.7750			

- - - - - O N E W A Y - - - - -

Group	Total	Media	Desviación Standard	Error Standard	95 % Conf Int	Media
Grp 1	10	8.1000	1.5951	.5044	6.9589 a	9.2411
Grp 2	10	13.9000	9.8257	3.1072	6.8711 a	20.9289
Grp 3	10	11.4000	7.3515	2.3247	6.1411 a	16.6589
Grp 4	10	24.3000	12.9962	7.1097	15.0031 a	33.5969
Total	40	14.4250	10.5827	1.6733	11.0405 a	17.8095
Efectos fijos modelo			8.9726	1.4187	11.5477 a	17.3023
Efectos de probab.				3.4994	3.2886 a	25.5614
Efectos de probabilidad del modelo - Varianza estimada entre componentes: 40.9317.						

- - - - - O N E W A Y - - - - -

Grupo	Minimo	Maximo
Grp 1 (Perón)	6.0000	10.0000
Grp 2 (MM-111)	0.0000	30.0000
Grp 3 (MM-109)	0.0000	23.0000
Grp 4 (MM-108)	8.0000	40.0000
Total	3.0000	40.0000

Pruebas para homogeneidad de varianzas:
 Cochran's C = Max. Varianza/Sum(Varianzas) = .5245,
 P = .030 (Approx.)
 Bartlett-Box F = 8.483 , P = .000
 Maxima Varianza / Minima Varianza 66.380

- - - - - O N E W A Y - - - - -

LONGITUD DE YEMA (mm)
GENOTIPOS

Prueba Multiple de Rangos:

Procedimiento de Tukey-HSD
Rangos para el nivel .050 -
3.81 3.81 3.81

Los rangos se observan en tabla correspondiente.

El valor comparado entre medias (J)- (I) fue..
 $6.3448 * \text{Rango} * \text{Cuadrado}(1/N(I) + 1/N(J))$

(*) Denota pares de grupos significantivamente diferente al nivel .050.

- - - - - O N E W A Y - - - - -

LONGITUD DE YEMA (mm)

Media	Grupo	G G G G	
		r r r r	
		P P P P	
		1 3 2 4	
8.1000	Grp 1		Grupo 1= perón.
11.4000	Grp 3		Grupo 2= MM-111.
13.9000	Grp 2		Grupo 3= MM-109.
24.3000	Grp 4	* *	Grupo 4= MM-106.

Subgrupos Homogeneos (Subgrupos de grupos, que son las mayores y menores medias y no difieren significantivamente en los rangos para el tamaño del subgrupo).

SUBGRUPO 1

Grupo	Grp 1 (perón)	Grp 3 (MM-109)	Grp 2 (MM-111)
Media	8.1000	11.4000	13.9000

SUBGRUPO 2

Grupo	Grp 2 (MM-111)	Grp 4 (MM-106).
Media	13.9000	24.3000

MEDIO: WPM.
 CONDICION: CON REFRIGERACION.
 TIEMPO: 35 DIAS.

GRUPO DE MEDIAS:

LONGITUD DE YEMA (MM).

GENOTIPOS.

MEDIA TOTAL DE LA POBLACION: 15.50

GENOTIPOS:

PERON	MM-111	MM-109	MM-106
5.40	15.70	11.00	29.90

OBSERVAR GRAFICA No. 1 .

NUMERO DE PRIMORDIOS.
 GENOTIPOS.

MEDIA TOTAL DE LA POBLACION: 1.63

GENOTIPOS:

PERON	MM-111	MM-109	MM-106
.40	1.50	1.20	3.40

OBSERVAR GRAFICA No. 2 .

TABLA No. 8.

*** ANALISIS DE VARIANZA ***

MEDIO: WPM.
 TIEMPO: 35 DIAS.
 CONDICION: YEMAS SOMETIDAS A REFRIGERACION.
 LONGITUD DE YEMA (mm)
 GENOTIPOS

Superficie de variación:	Suma De Cuadrados	GL	Cuadrado Medio	F	P
Genotipos:	3296.600	3	1098.867	6.169	.002
Residual	6417.400	36	178.610		
Total	9714.000	39	249.077		

Gran Media = 1.63
 GENOTIPOS

Prueba Multiple de Rangos:

Procedimiento de Tukey-HSD
 Rangos para el nivel .050 -
 3.81 3.81 3.81

Los rangos se observan en tabla correspondiente.

El valor comparado entre medias (J)- (I) fue..

$$9.4409 * \text{Rango} * \text{Cuadrado}(1/N(I) + 1/N(J))$$

(*) Denota pares de grupos significantivamente diferente al nivel .050.

----- O N E W A Y -----

LONGITUD DE YEMA (mm)

		G G G G	
		r r r r	
		P P P P	
Media	Grupo	1 3 2 4	
5.4000	Grp 1		Grupo 1= Perón.
11.0000	Grp 3		Grupo 2= MM-111.
15.7000	Grp 2		Grupo 3= MM-109.
29.9000	Grp 4	* *	Grupo 4= MM-106.

Subgrupos Homogeneos (Subgrupos de grupos, que son las mayores y menores medias y no difieren significantivamente en los rangos para el tamaño del subgrupo).

SUBGRUPO 1

Grupo	Grp 1 (Perón)	Grp 3 (MM-109)	Grp 2 (MM-111)
Media	5.4000	11.0000	15.7000

SUBGRUPO 2

Grupo	Grp 2 (MM-111)	Grp 4 (MM-106)
Media	15.7000	29.9000

- - - - - O N E W A Y - - - - -

NUMERO DE PRIMORDIOS.

GENOTIPOS

Análisis de Varianza

Superficie	D.F.	Suma de Cuadrados	Cuadrado Medios	F	P
Entre Grupos	3	48.4750	16.1583	4.5128	.0087
Con Grupos	36	128.9000	3.5808		
Total	39	177.3750			

- - - - - O N E W A Y - - - - -

Group	Total	Media	Desviación Standard	Error Standard	95 % Conf Int	Media
Grp 1	10	0.4000	0.833	0.2667	-0.2032 a	1.0032
Grp 2	10	1.5000	1.9579	0.6191	0.0994 a	2.9006
Grp 3	10	1.2000	1.3168	0.4163	0.2582 a	2.1418
Grp 4	10	3.4000	2.8363	0.8969	1.3711 a	5.4289
Total	40	1.6250	2.1328	0.3372	0.9430 a	2.3070
Efectos fijos modelo			1.8922	0.2292	1.0182 a	2.2318
Efectos de probab.				0.6356	-0.3977 a	3.6477
Efectos de probabilidad del modelo - Varianza estimada entre componentes: 1.2578						

- - - - - O N E W A Y - - - - -

Grupo	Minimo	Maximo
Grp 1 (Perón)	0.0000	2.0000
Grp 2 (MM-111)	0.0000	6.0000
Grp 3 (MM-109)	0.0000	3.0000
Grp 4 (MM-106)	0.0000	10.0000
Total	0.0000	10.0000

Pruebas para homogeneidad de varianzas:
 Cochrans C = Max. Varianza/Sum(Varianzas) = .5617,
 P = .012 (Approx.)
 Bartlett-Box F = 4.216 , P = .006
 Maxima Varianza / Minima Varianza 11.313

- - - - - O N E W A Y - - - - -

NUMERO DE PRIMORDIOS.
GENOTIPOS

Prueba Multiple de Rangos:

Procedimiento de Tukey-HSD
Rangos para el nivel .050 -
3.81 3.81 3.81

Los rangos se observan en tabla correspondiente.
El valor comparado entre medias (J)- (I) fue..

$$1.3380 * \text{Rango} * \text{Cuadrado}(1/N(I) + 1/N(J))$$

(*) Denota pares de grupos significantivamente diferente al nivel .050.

- - - - - O N E W A Y - - - - -

LONGITUD DE YEMA (mm)

		G G G G	
		r r r r	
		P P P P	
Media	Grupo	1 3 2 4	
0.4000	Grp 1		Grupo 1= Perón
1.2000	Grp 3		Grupo 2= MM-111.
1.5000	Grp 2		Grupo 3= MM-109.
3.4000	Grp 4	*	Grupo 4= mm-106.

Subgrupos Homogeneos (Subgrupos de grupos, que son las mayores y menores medias y no difieren significativamente en los rangos para el tamaño del subgrupo).

SUBGRUPO 1

Grupo	Grp 1(Perón)	Grp 3 (MM-109)	Grp 2 (MM-111)
Media	0.4000	1.2000	1.5000

- - - - -

SUBGRUPO 2

Grupo	Grp 3 (MM-109)	Grp 2(MM-111)	Grp 4 (MM-106)
Media	1.2000	1.5000	3.4000

- - - - -

RELACION DE TABLAS DE MEDIAS ENTRE GENOTIPOS Y MEDIOS DE CULTIVO SEGUN NUMERO DE PRIMORDIOS, LONGITUD DE YEMA (mm) Y FORMACION DE CALLO:

CONDICION: REFRIGERACION:

TABLA No.9:

LONGITUD DE YEMA (MM):

7 DIAS	PERON	MM-111	MM-109	MM-106
MEDIO WPM:	6.20*	7.80*	8.30*	12.90*
MEDIO α :	6.30	9.50	6.80	5.80

Gráfica No. 1.

NUMERO DE PRIMORDIOS:

7 DIAS:	PERON	MM-111	MM-109	MM-106
MEDIO WPM:	0.4*	1.00*	0.0*	0.2*
MEDIO α :	0.7	0.4	0.4	1.30

Gráfica No. 2.

TABLA No. 10:

LONGITUD DE YEMA O PRIMORDIO MAS GRANDE:

21 DIAS	PERON	MM-111	MM-109	MM-106
MEDIO WPM:	8.10*	13.90*	11.40*	24.30*
MEDIO α :	8.90	13.60	10.40	9.50

Gráfica No. 1.

NUMERO DE PRIMORDIOS:

21 DIAS:	PERON	MM-111	MM-109	MM-106
MEDIO WPM:	1.2*	1.40*	0.8*	2.10*
MEDIO α :	1.1	1.6	1.2	2.40

Gráfica No. 2.

TABLA No. 11:

LONGITUD DE YEMA O PRIMORDIO MAS GRANDE:

35 DIAS	PERON	MM-111	MM-109	MM-106
MEDIO WPM:	5.40*	15.70*	11.00*	29.90*
MEDIO α :	9.90	18.00	13.30	11.20

Gráfica No. 1.

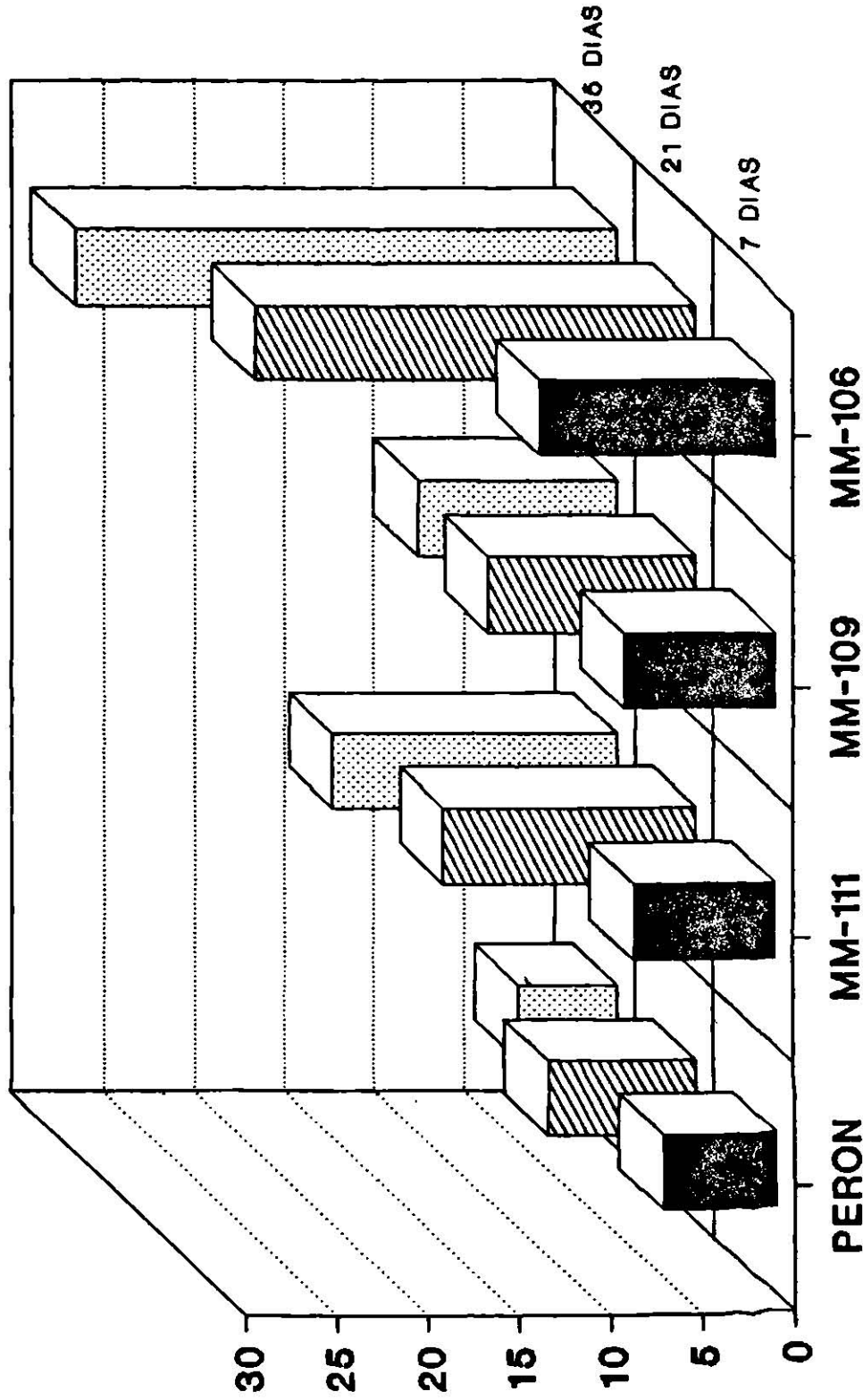
NUMERO DE PRIMORDIOS:

35 DIAS:	PERON	MM-111	MM-109	MM-106
MEDIO WPM:	0.4*	1.50*	1.2*	3.40*
MEDIO α :	1.1	2.0	1.2	2.30

Gráfica No. 2.

MEDIO WPM
CONDICION:3 SEMANAS EN REFRIGERACION

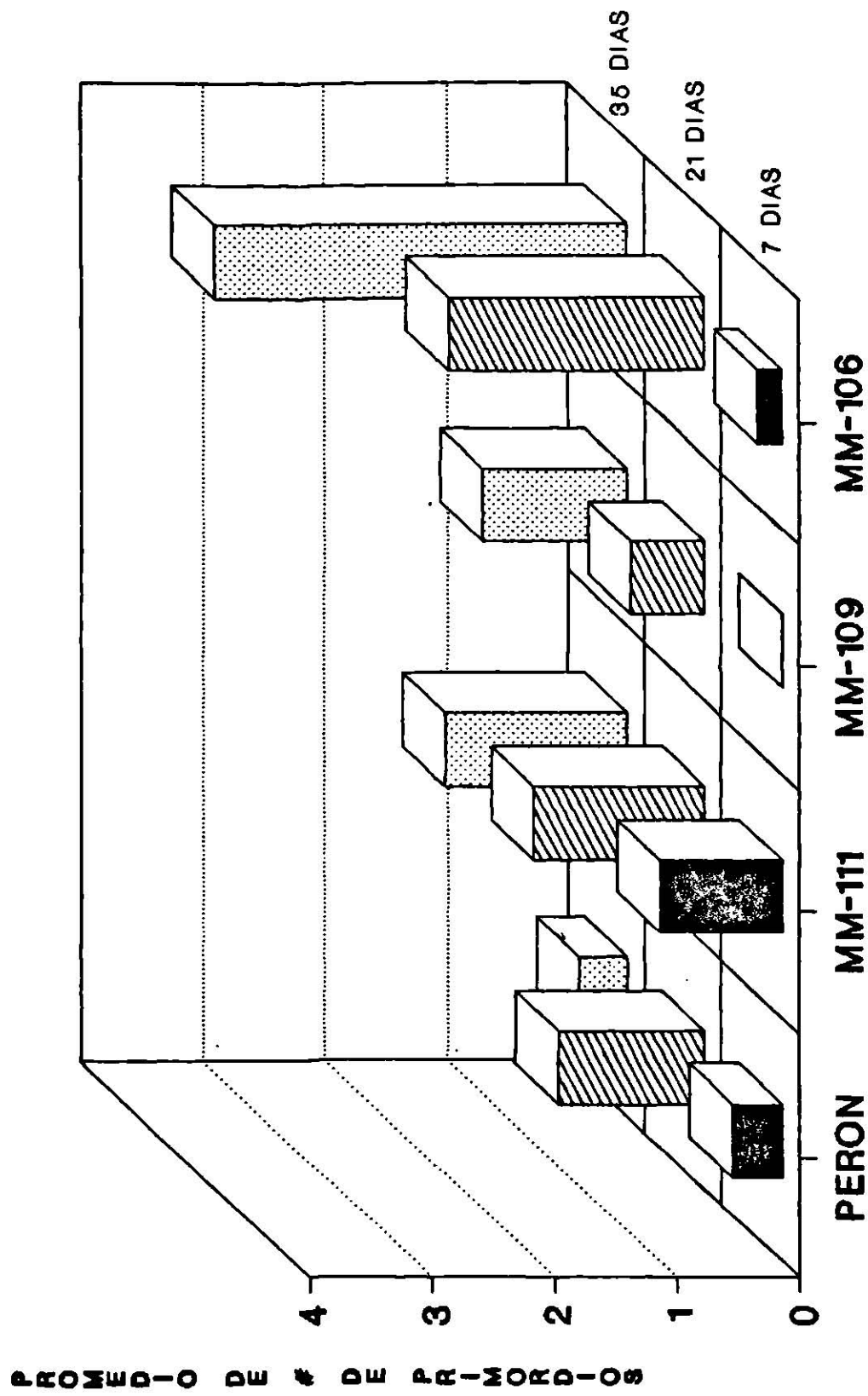
JÓNE · DE YEMA O PR-INCIP-IO MAS GRANDE



Gráfica No. 1. Comparación entre longitud de yemas
GENOTIPOS

MEDIO WPM

CONDICION:3 SEMANAS EN REFRIGERACION



Gráfica No. 2. Comparación entre número de primordios.

GLOSARIO DE TERMINOS:

CALLO.- Crecimiento indiferenciado de tejido.

CLON.- Descendencia vegetativa de una planta común a ella.

CLON TIPICO.- Descendientes vegetativos de varias plantas congéneres semejantes.

ESCARIFICACION.- Procesos cuya finalidad es hacer que el endocarpio y otras capas protectoras de la semilla sean más permeables al agua y aire de modo que no interfieran en el desarrollo de la germinación como función normal.

EXPLANTE.- Porción de tejido que se va a cultivar.

INJERTO.- Es la unión de partes de plantas que se ligan y continúan su crecimiento como una sólo planta.

PORTAINJERTO.- Es la porción baja de la planta.

PUA.- Es la copa o parte superior de la nueva planta.

SEGREGACION GENETICA.- Aparición por vía sexual de nuevos individuos distintos entre sí y distintos de los progenitores, cada uno con sus características propias.

ABREVIATURAS :

AG₃: Acido giberélico.

AIA: Acido indol-3-acético.

AIB: Acido indolbutírico.

ANA: Acido Naftalenacético. (es sinónimo de NAA).

BA: 6- Bencilaminopurina o benciladenina.

CaCl₂ anhidro: Cloruro de Calcio.

CaCl₂ 2H₂O: Cloruro de calcio dihidratado.

Ca(NO₃.4H₂O): Nitrato de Calcio tetrahidratado.

CoCl₂ 8H₂O: Cloruro de Cobalto hexahidratado.

CuSO₄ 5H₂O: Sulfato de cobre pentahidratado.

FeSO₄ 7H₂O: Sulfato de Fierro heptahidratado.

g: gramo.

H₃BO₃: Acido bórico.

HCl: Acido clorhídrico.

KH₂PO₄: Fosfato de potasio.

KI: Ioduro de Potasio.

KNO₃: Nitrato de potasio.

K₂SO₄: Sulfato de potasio.

l: litro.

mg: miligramos.

MgSO₄ 7H₂O: Sulfato de Magnesio Heptahidratado.

MnSO₄ H₂O: Sulfato de Manganeso hidratado.

M.S: Murashige y Skoog.

Na₂EDTA: Acido etilendiaminatetracético.

$\text{Na}_2\text{MO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: Molibdato de Sodio.

NH_4NO_3 : Nitrato de Amonio.

PG: Floroglucinol (phloroglucinol $\text{C}_6\text{H}_3(\text{OH})_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$).

ppm: partes por millon.

sp.: especie.

$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: Sulfato de Zinc heptahidratado.

μ : Micra.

