Fitotecnia 10:72-79, 1987.

MICROPROPAGACION DE CIRUELO MIROBOLANO (*Prunus cerasifera* L.)

Angel Villegas Monter y Facundo Barrientos Pérez[1]

RESUMEN

El ciruelo Mirobolano (*Prunus cerasifera L.*) es tolerante a suelos pesados y a pudrición de la corona causada por *Phytophthora cactorum* (Leb. y Cohn) Schroet., por lo que es una buena alternativa para utilizarlo como portainjerto de ciruelos europeos y japoneses. Apices de yemas axilares subapicales de brotes en crecimiento activo fueron incubadas para establecimiento en un medio de cultivo que contenía las sales minerales de Murashige y Skoog (MS) al 100%; para proliferación y enraizamiento se utilizó el medio MS al 50% complementado con 100 mg/ℓ de mioinositol, 1 mg/ℓ de tiamina-HCl, 0.3 a 1.0 mg/ℓ de ácido indolbutírico (AIB); 1 mg/ℓ de benciladenina (BA); 162 mg/ℓ de floroglucinol y 30 g/ℓ de sacarosa; el pH se ajustó a 5.5 antes de agregar 5 g/ℓ de agar.

Después de seis semanas en cultivo se obtuvo un promedio de 20 brotes por ápice que al ser transplantados produjeron un promedio de 12.7 brotes/explante en cuatro semanas. Para enraizamiento la utilización de 1 mg/ℓ de AIB más floroglucinol por seis días permitió obtener 100% de enraizamiento. Al transferir las plantas a suelo se logró un establecimiento del 95%.

SUMMARY

The Myrobolan plum (*Prunus cerasifera L.*) is tolerant to clay soils and collar rot {*Phytophthora cactorum* (Leb. y Cohn) Schroet.} and it is a good alternative to be used as rootstock of japanese and european plums. Shoot tips of axillary buds obtained from shoots in active growth were cultured for establishment in a Murashige and Skoog (MS) complete (100%) medium. For proliferation and rooting, a MS medium at 50% strength was suplemented with 100 mg/ℓ of myoinositol, 1 mg/ℓ of thiamine-HCl, 0.3 to 1.0 mg/ℓ of indolbutyric acid (IBA), 1 mg/ℓ of benzyladenine (BA), 162 mg/ℓ of phloroglucinol and 30 g/ℓ of sucrose; pH was adjusted to 5.5 before adding 5 g/ℓ of agar.

An average of 20 shoots per bud were obtained after six weeks in culture. Each explant produced an average of 12.7 shoots after transplanting. In the rooting phase, the addition of IBA at 1 mg/ℓ plus phloroglucinol during six days yielded 100% rooting. Plants survival was 95% when they were transplanted to soil.

[1] Investigador Docente y Profesor Investigador Titular, respectivamente; Centro de Fruticultura del Colegio de Postgraduados, 56230 Chapingo, Méx.

INTRODUCCION

En frutales, el desarrollo de sistemas de producción en los que se emplean altas densidades de árboles requiere gran cantidad de portainjertos (1), por lo que es necesario implementar metodologías que permitan obtener numeroso material vegetativo, en el menor tiempo posible. Una posibilidad es el cultivo de tejidos, el que ha permitido propagar gran número de especies anuales y bianuales (7); sin embargo, cuando esta técnica se ha utilizado para propagar especies leñosas, se presentan serios problemas, sobre todo en las fases de enraizamiento y establecimiento (transplante a suelo).

Algunos investigadores mencionan que la utilización de compuestos fenólicos en el medio de cultivo, promueve la formación de raíces (4,5); sin embargo, otros presentan resultados contradictorios o poco consistentes entre experimentos (11). La temperatura también influye en el enraizamiento; así, Hammerschlag (3) obtuvo mayor porcentaje de enraizamiento cuando empleó 26°C que con 21°C, creciendo brotes de ciruelo Mirobolano en obscuridad; Rosati *et al.* (9) lograron un enraizamiento mayor a 26°C que a 15°C en el ciruelo cv.'Calita'.

El ciruelo Mirobolano es uno de los portainjertos más empleados en Estados Unidos para injertar cultivares de ciruelos europeos y japoneses, debido a que se adapta a suelos pesados, con excesos de humedad y es resistente a la pudrición de la corona (3). A pesar de eso, se considera que existen pocos trabajos sobre la micropropagación de este portainjerto (2,3) y en México no se conocen resultados publicados al respecto.

Con base en lo anterior, se realizó un estudio cuyos objetivos fueron determinar las condiciones del medio de cultivo más apropiadas para micropropagar al ciruelo Mirobolano; evaluar la respuesta *in vitro* de brotes etiolados y no etiolados en la formación de raíces, y determinar el lapso que deben permanecer los brotes en un medio que contenga auxina más floroglucinol para obtener un enraizamiento mayor.

MATERIALES Y METODOS

La presente investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos del Centro de Fruticultura del Colegio de Postgraduados, en Chapingo, Edo. de México.

Para la fase de establecimiento *in vitro*, se utilizaron ápices de yemas axilares subapicales de brotes en crecimiento activo de ciruelo Mirobolano, para lo

cual se cortaron puntas de 10 cm de largo a las que se eliminaron las hojas y se colocaron en bolsas de polietileno con agua destilada. En el laboratorio, los brotes fueron lavados con agua y se cortaron en fracciones que contenían una yema (1 cm aproximadamente). Las fracciones fueron desinfectadas durante tres minutos en alcohol al 70%; posteriormente, se enjuagaron tres veces con agua destilada esterilizada.

De cada yema se extrajeron ápices de 0.8 a 1 mm de longitud, los que se colocaron en tubos de ensaye de 25 x 120 mm que contenían 10 mℓ de medio de cultivo; estos ápices crecieron en un cuarto de incubación con fotoperíodo de 16 horas y temperatura de 16 ± 1°C. A las seis semanas los brotes obtenidos a partir de los ápices, fueron transplantados a un medio fresco; los transplantes posteriores (tres) se realizaron sucesivamente cada cuatro semanas, empleándose para enraizamiento aquellos brotes que presentaban de 2 a 3 cm, fueran verdes o etiolados (brotes que crecieron en ausencia de luz que no presentaban pigmentación verde).

El medio de cultivo empleado fue el de Murashige y Skoog (7), al 100% para establecimiento y al 50% para proliferación y enraizamiento, complementado con: 100 mg/ℓ de mioniositol, 1 mg/ℓ de tiamina-HCl, 0.3 a 1.0 mg/ℓ de ácido indolbutírico (AIB), 1 mg/ℓ de benciladenina (BA), 162 mg/ℓ de floroglucinol, 30 g/ℓ de sacarosa y 5 g/ℓ de agar; el pH se ajustó a 5.5 antes de agregar el agar.

El arreglo experimental empleado fue completamente al azar con 10 repeticiones para el establecimiento y 10 para cada transplante; la unidad estuvo constituida por un ápice o un brote. A las 72 horas se evaluó la contaminación; posteriormente, se realizaron observaciones cada 8 días y a las cuatro semanas se cuantificó la brotación de ápices, y en los transplantes el número de brotes/explante.

En la fase de enraizamiento, se compararon cuatro tratamientos que fueron: 1) Brotes verdes; 2) Brotes etiolados (que crecieron en ausencia de luz), éstos fueron colocados en un medio que contenía 1 mg/ℓ de AIB para enraizamiento. Posteriormente, en brotes verdes se evaluó el efecto de: 3) Permanencia contínua de los brotes en un medio de cultivo que contenía auxinas más floroglucinol, y 4) Permanencia de los brotes por seis días en un medio con auxina más floroglucinol, para posteriormente transferirlos a un medio sin reguladores del crecimiento por tres semanas. El arreglo experimental fue completamente al azar con 20 repeticiones en los dos primeros casos y 10 en el tercero y cuarto. La unidad experimental estuvo constituida por un brote *in vitro*. A las cuatro semanas de iniciados los tratamientos se evaluó el porcentaje de enraizamiento, y el número y

tamaño de raíces.

RESULTADOS Y DISCUSION

El porcentaje de contaminación durante el establecimiento de los brotes, fue bajo (3 a 5%), por lo que se considera que el método de desinfección empleado fue efectivo; además indica que el uso de brotes de crecimiento activo, con poco tiempo de exposición a las condiciones ambientales (4 a 6 semanas) acumulan pocos contaminantes y pueden ser fácilmente desinfectados.

A las 6 semanas de establecidos los ápices, se obtuvo un promedio de 20 brotes por ápice sembrado, lográndose un máximo de 30 y un mínimo de 14 brotes/explante; estos valores, en general, coinciden con lo publicado para el ciruelo cv. 'Calita' (9), donde se obtuvieron de 10 a 20 brotes/yema.

Al transplantar los brotes de ciruelo cada 4 semanas, durante 3 veces, se logró un promedio de 13 brotes/explante, con un máximo de 18 y un mínimo de 9; sin embargo, con frecuencia los explantes presentaron de 10 a 12 brotes (Figura 1). Al respecto, Hammerschlag (3) obtuvo un promedio de 10 brotes/explantes, en el mismo portainjerto.

Los resultados indican que en la fase de multiplicación (transplantes) disminuyó el número de brotes por ápice, respecto al producido durante la fase de establecimiento (13 vs 20, respectivamente). Esto pudo deberse a que en el establecimiento no existió alargamiento de los brotes (todos fueron de 5 mm aproximadamente) no existiendo dominacia apical entre ellos; mientras que en los transplantes, debido a que se desarrollaron brotes de 2 a 3 cm, el número obtenido por explante fue más reducido, sugieriendo que al existir alargamiento se inhibe el desarrollo de yemas adventicias y axilares limitándose la proliferación. Por otra parte, Lane (6) menciona que el crecimiento y el número de brotes es influenciado por la concentración de BA, pues concentraciones altas de BA (10 µM) estimulan la proliferación de brotes axilares en *Spirea bumalda* y *Prunus cisteina*. Además, observó que en algunos casos (5%) se presentó formación de raíces en los brotes cuando se encontraban en proliferación.

En lo que se refiere a la fase de enraizamiento, en los tratamientos 1 y 2 se obtuvo el mismo porcentaje de brotes con raíz (85%), pero se observó que en promedio, el número y tamaño de raíces de los brotes etiolados fueron menores que en los brotes verdes (Cuadro 1), lo que sugiere que la presencia de hojas verdes estimula el enraizamiento, o bien, que los brotes verdes poseen mayor cantidad de

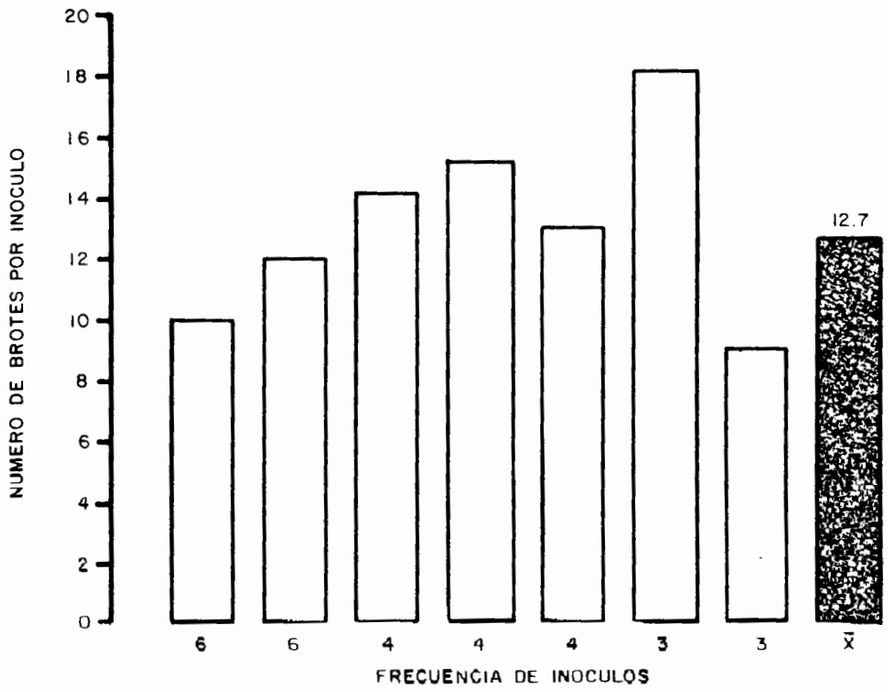

Figura 1. Número de brotes por explante y frecuencia de los mismos en ciruelo Mirobolano.

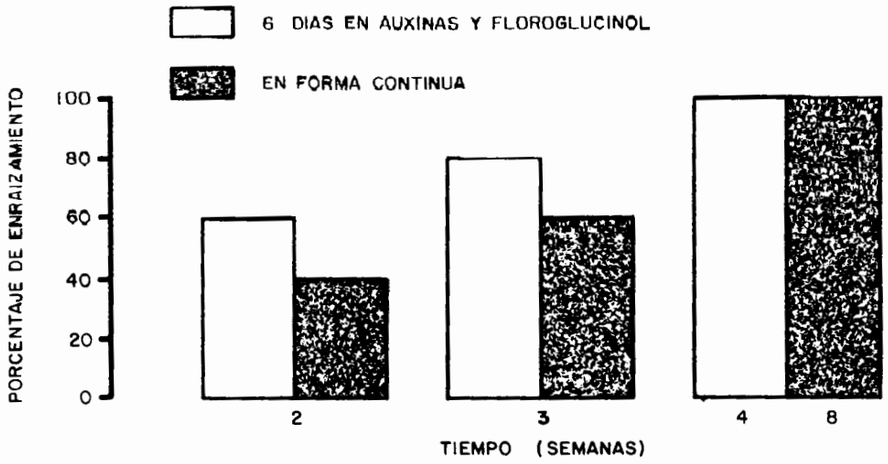

Figura 2. Enraizamiento en brotes de ciruelo Mirobolano expuestos por 6 días, y en forma continua, a un medio con auxinas y floroglucinol.

Cuadro 1. Número y tamaño de raíces en brotes verdes y etiolados de ciruelo Mirobolano.

Repetición	Brotes etiolados		Brotes verdes	
	Número de raíces	Tamaño de raíces (cm)	Número de raíces	Tamaño de raíces (cm)
1	-	-	-	-*
2	1	3*	4	5
3	1	3	2	3**
4	1	3*	2	3**
5	2	2*	-	-
6	2	2.5*	3	5
7	1	3	4	3
8	-	-	-	-
9	1	4	1	5**
10	1	2	1	4**
11	1	1.5*	6	4
12	3	1.5	2	2
13	1	3	2	4
14	2	2**	5	2
15	2	3*	2	5
16	1	2*	1	6**
17	5	4*	4	5
18	1	1*	5	3
19	1	1**	2	3
20	-	-	3	5**
$\bar{X}$	1.3	2.1	2.4	3.3

* Presentaron daños en el ápice
** Con raíces laterales

energía disponible para ese proceso. Además, el 45% de los brotes etiolados presentó daño en el ápice debido probablemente a una mayor sensibilidad del tejido a la dosis de auxina exógena empleada (1 mg/ℓ); efectos similares se han observado en brotes de manzano expuestos en forma contínua a la acción de las auxinas (10). En consecuencia, es recomendable que cuando se utilicen brotes etiolados el nivel de auxina empleado debe ser menor que cuando se emplean brotes verdes.

Cuando se utilizó AIB más floroglucinol en el medio de cultivo, en forma permanente (tratamiento 3) o por sólo 6 días (tratamiento 4), se elevó el porcentaje de enraizamiento a 100% (Figura 2), indicando que el floroglucinol favorece el enraizamiento de ciruelo. Esto coincide con lo observado en manzano por Jones (5), quien menciona que los compuestos fenólicos funcionan como cofactores de enraizamiento. Aunque en general el floroglucinol estimuló el enraizamiento de los

brotes, cuando éstos permanecieron en forma contínua el número y tamaño de raíces fue menor que cuando fueron transferidos a un medio sin reguladores del crecimiento (Cuadro 2), lo que indica que las auxinas inducen la formación de raíces pero inhiben su crecimiento. En relación a la velocidad de enraizamiento (Figura 2), se observó que en el tratamiento 3 a las dos semanas se presentó el 60%, a las tres semanas 80% y en cuatro 100% de enraizamiento, mientras que en el tratamiento 4, se requirieron ocho semanas para lograr el 100% pero las raíces eran de menos de 2 cm. Esto coincide con lo encontrado por James y Thurbon (4) quienes mencionan que la presencia contínua de AIB más floroglucinol en el medio de cultivo, puede limitar el desarrollo posterior de raíces en brotes de manzano, por la contínua división celular que origina la formación del callo; sin embargo, cuando los brotes fueron transferidos después de cuatro días a un medio sin reguladores del crecimiento, se mostró un efecto sinergístico, incrementando el número de raíces.

Cuadro 2. Número y tamaño de raíces por brotes de ciruelo Mirobolano en dos tiempos de permanencia en un medio con auxinas más floroglucinol.

Repetición	Seis días		Permanente	
	Número de raíces	Tamaño de raíces (cm)	Número de raíces	Tamaño de raíces (cm)
1	3	3	2	0.5
2	3	4	2	1
3	4	4	4	1.5
4	5	5	2	1.5
5	4	4	2	1
6	6	5	3	1
7	3	5	2	2
8	2	5	3	2
9	3	5	3	1
10	7	3	2	2
$\bar{X}$	4.0	4.3	2.5	1.3

Finalmente, cuando los brotes enraizados que se obtuvieron en los tratamientos 1, 2, 3 y 4, fueron transplantados a tierra, se logró establecer el 95% de los mismos. Como se indicó, estos brotes inicialmente tenían diferente número y tamaño de raíces, por lo que se deduce que tales características no fueron determinantes para el transplante final.

CONCLUSIONES

1. El número de brotes por explante es mayor en brotes pequeños que en grandes.

2. El número y tamaño de raíces de brotes etiolados es menor que en brotes verdes; además, en los primeros se presentan daños en el ápice.

3. La exposición de brotes por seis días a un medio con AIB más floroglucinol y luego colocarlos a un medio sin reguladores del crecimiento, permite que el crecimiento de raíces sea más acelerado que cuando permanecen en forma contínua.

4. El número y tamaño de raíces de los brotes de ciruelo Mirobolano no es determinante en el establecimiento a tierra.

BIBLIOGRAFIA

1. Abbott, A. J., and E. Whiteley. 1976. Culture of *Malus* tissues *in vitro*. I. Multiplication of apple plants from isolated shoot apices. Sci. Hort. 4: 183-189.

2. Cheng, T. V. 1978. Clonal propagation of woody species through tissue culture techniques. Proc. Intern. Plant Prop. Soc. 28: 139-155.

3. Hammerschlag, F. 1982. Factors influencing *in vitro* multiplication and rooting of the plum rootstock Myrobolan (*Prunus cerasifera* Ehrh.). J. Amer Soc. Hort. Sci. 107 (1): 44-47.

4. James, D. J., and I. J. Thurbon. 1979. Rapid *in vitro* rooting of the apple rootstock M 9. J. Hort. Sci. 59: 309-311.

5. Jones, O. P., and S. G. S. Harfield. 1976. Root initiation in apple shoots cultured *in vitro* with auxins and phenolic compounds. J. Hort. Sci. 51: 495-499.

6. Lane, W. D. 1978. Regeneration of *Spirea bumalda* and *Prunus cisteina* from shoot apices. Can. J. Plant Sci. 59: 1025-1029.

7. Murashige, T. 1974. Plant propagation through tissue cultures. Ann. Rev. Plant Physiol. 25: 136-166.

8. _____, and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tabacco tissue cultures. Ann. Rev. Plant Physiol. 15: 473-492.

9. Rosati, P., A. Marino, and Ch. Swierczewiski. 1980. *In vitro* propagation of japanese plum (*Prunus salicina* Lindl) cv. Calita. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 105 (1): 126-129.

10. Villegas M., A. 1982. Propagación de cultivares de manzano (*Malus pumila* Mill) *in vitro*. Tesis M. C. Colegio de Postgraduados. Chapingo, Méx.

11. Zimmerman, R. H., and O. C. Broome. 1981. Phloroglucinol and *in vitro* rooting of apple cultivar cuttings. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 106 (5): 648-652.