

PROPAGACION *in vitro* DEL PORTAINJERTO DE MANZANO MM106

Angel Villegas Monter¹ y Francisco Cruz Pizarro²

RESUMEN

En México, el establecimiento de nuevas plantaciones de manzano (*Malus pumila* Mill) obliga a importar anualmente hasta 200 000 portainjertos, por lo que es importante desarrollar metodologías más eficientes de propagación en esta especie. Con tal propósito se realizó un estudio en el que se evaluó el efecto de la dilución de las sales minerales del medio Murashige y Skoog, y de diferentes concentraciones de benciladenina (BA) en la fase de establecimiento de ápices vegetativos cultivados *in vitro* del portainjerto de manzano MM 106. Además, se analizó la influencia del número de trasplantes en la multiplicación de brotes y la respuesta de éstos al enraizamiento. El empleo de un medio con 100% de sales permitió un mayor desarrollo de brotes; resultados similares se obtuvieron al incrementar la concentración de BA de 0.5 a 1.5 mg/l. Del primer trasplante al cuarto existió un incremento de 1.2 a 10.0 brotes/inóculo, indicando posiblemente una mayor adaptación a las condiciones *in vitro*. El empleo de floriglucinol permitió elevar el enraizamiento de 40 a 80%, mientras que el carbón activado lo inhibió totalmente.

SUMMARY

To establish new apple (*Malus pumila* Mill) plantations in Mexico has required to import up to 200 000 rootstocks per year. It is necessary then, to develop better techniques for apple propagations in this country. For this purpose, axillary buds from the MM 106 cultivar were *in vitro* cultured in the Murashige-Skoog (MS) medium to study their responses to different concentrations of mineral salts and benciladenine (BA). The effect of subculturing on shoot proliferation and rooting was also evaluated. Results indicated that the number of shoots per bud increased when the salt concentration in the medium was at 100% or as BA increased from 0.5 to 1.5 mg/l. The number of shoots per explant grew from 1.2 to 10.0 by increasing the number of subcultures from one to four, which may indicate an improved adaptation to the *in vitro* conditions. Rooting was enhanced from 40 to 80% by applying phloroglucinol during the rooting phase, whereas this process was completely inhibited by adding activated charcoal.

^{1/} Investigador Docente. Centro de Fruticultura. Colegio de Postgraduados. 56230 Chapingo, México.

^{2/} Profesor. FES-C. Ingeniería Agrícola. Universidad Nacional Autónoma de México.

INTRODUCCION

Los sistemas de manejo en huertos intensivos y superintensivos, se caracterizan por una elevada densidad de árboles por unidad de superficie permitiendo así incrementar de manera significativa los rendimientos en comparación con los obtenidos en sistemas tradicionales (Obando, 1982).

Actualmente, se estima que en México se llegan a importar hasta 200 000 portainjertos de manzano (*Malus pumila* Mill) por año, especialmente de MM 106, cuyo valor oscila de 1 a 2 dólares cada uno, lo que constituye una fuga de divisas para el país, por lo que es necesario generar metodologías que permitan propagar de manera rápida y masiva portainjertos de manzano. Uno de estos sistemas es la propagación *in vitro*, donde ha quedado demostrado que potencialmente se pueden obtener 60 000 brotes a partir de un solo ápice, en un período de ocho meses, en el portainjerto M 26 (Jones *et al.*, 1977). Sin embargo, el enraizamiento es una de las principales limitantes de la propagación *in vitro* debido a la baja efectividad para lograr la inducción de raíces adventicias.

Los objetivos del presente estudio fueron: evaluar el efecto de la dilución de las sales minerales del medio de cultivo y de la concentración de benciladenina en el establecimiento de ápices vegetativos; así como analizar el efecto de los trasplantes sucesivos en la proliferación de brotes y la respuesta de los mismos a diferentes medios de enraizamiento *in vitro*, del portainjerto de manzano MM 106.

REVISION DE LITERATURA

En la propagación *in vitro* se pueden diferenciar tres fases o etapas, mismas que tienen características específicas (Murashige, 1974): a) Establecimiento y desarrollo de los ápices, en la que el método de desinfección empleado y el medio de cultivo desempeñan un papel importante; b) Proliferación o multiplicación del propágulo, donde existe un rápido desarrollo de brotes que pueden ser de origen axilar o adventicio; los primeros se originan a partir de las yemas situadas en la axila de las hojas y los segundos a partir del callo de la base del brote, y c) Enraizamiento y aclimatación del material, la que involucra la inducción y diferenciación de raíz en los brotes obtenidos durante la proliferación, debiéndose emplear sustancias que promuevan la rizogénesis, como las auxinas.

Se considera que los métodos de desinfección empleados varían con la especie e investigador; en manzano, uno de los más usados es el propuesto por Jones (1965). Existen, además, otros métodos (Dutcher y Powell, 1972; Snir y Erez, 1980), pero estos autores, al igual que Jones (1965), sólo señalan que sus métodos son efectivos sin indicar el porcentaje de cultivos asépticos; en cambio, Werner y Boe (1980) informan de un método de desinfección que obtuvo 85% de cultivos asépticos en el portainjerto M 7, y el método empleado por Villegas (1982) presentó valores que variaron de 69 a 98%, también en cultivares de manzano.

La composición del medio de cultivo puede variar de acuerdo a la fase en que se encuentre la propagación *in vitro*; en la primera fase, en ocasiones es necesaria la inclusión de antioxidantes; en la segunda, conviene añadir compuestos que estimulen el desarrollo de callos o brotes, mientras que en la tercera se deben agregar auxinas y otros compuestos que estimulen el enraizamiento. En manzano, uno de los medios de cultivo más comunes es el de Murashige y Skoog (1962) empleado por Jones (1967), Jones *et al.* (1977), Werner y Boe (1980), Snir y Erez (1980), Zimmerman y Broome (1981), Morini (1980) y Villegas (1982), al cual se le han realizado modificaciones tanto en el tipo y concentración de reguladores del crecimiento como en la concentración de las sales minerales del medio de cultivo.

En la fase de proliferación se han estudiado diversos factores; así, Abbott y Whiteley (1976), al trabajar con el cv. Cox's Orange Pippin, encontraron que al utilizar ápices juveniles la respuesta a la proliferación es más rápida y se obtienen un mayor número de brotes que en ápices adultos. Por otra parte, señalan que niveles de cinetina superiores a 5.0 mg/l o inferiores a 0.1 mg/l inhiben completamente la proliferación, mientras que a 1.0 mg/l se favorece la formación de brotes.

Jones *et al.* (1977) señalan que en la propagación *in vitro* del portainjerto M 26, potencialmente se puede obtener hasta 60 000 brotes a partir de un solo ápice, en un período de ocho meses, utilizando el medio de cultivo de Murashige y Skoog (1962) complementado con 1.0 mg/l de BA, 0.1 mg/l de AG₃ y 162 mg/l de floriglucinol. Indican, además, que este último compuesto estimula la proliferación y el crecimiento de los brotes.

Snir y Erez (1980) utilizaron ápices de los portainjertos MM 104, MM 106 y

MM 109, en un medio similar al de Jones *et al.* (1977), al que eliminaron el flo-roglucinol pues en experimentos preliminares no presentaba ventajas. Ellos obtuvieron cinco brotes por explante al mes, en cada transplante, y señalan que al utilizar un medio líquido se tiene mayor crecimiento de los brotes que en un medio sólido, lo cual puede ser debido a una mayor absorción de nutrientes y reguladores del crecimiento del medio de cultivo.

Werner y Boe (1980), al trabajar con ápices del portainjerto M 7, lograron obtener 13 brotes por ápice en cada transplante después de 4 a 6 semanas, utilizando un medio diluído al 50% de su concentración y complementado con 0.5 mg/l de BA. Además, mencionan que después de cuatro meses en cultivo los brotes mostraron daños en la parte aérea, aparentemente por toxicidad de la BA pues al sustituirla por isopentiladenina (2iP) los daños desaparecieron, lográndose mantener los brotes en proliferación hasta un año.

Uno de los problemas más serios que se tienen en la propagación *in vitro* de manzano, es el bajo porcentaje de enraizamiento que se logra en la tercera fase, aunque existen trabajos en los que se han obtenido altos porcentajes. En general, para incrementar el enraizamiento se sugiere: 1) Eliminar las citocininas del medio de cultivo y elevar el nivel de auxinas a una concentración tal, que favorezca la aparición y desarrollo de raíces (Feucht y Dausend, 1976); 2) Agregar compuestos fenólicos que actúen en posible sinergismo con los reguladores del crecimiento empleados para enraizamiento (Jones y Hatfield, 1976); 3) Reducir la concentración de las sales minerales en el medio de cultivo (Lane, 1978; Hyndman *et al.*, 1982). Sin embargo, cada cultivar responde de manera diferente y pueden existir variaciones aun entre clones (James, 1981).

Las condiciones de luz y temperatura son importantes para una mayor formación de brotes y rápido crecimiento de los mismos; en manzano, la utilización de 16 hr luz con lámparas fluorescentes y $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ han permitido obtener buenos resultados. En la actualidad, no se conocen informes de daños por luminosidad y temperatura en la incubación *in vitro* de manzano (Abbott y Whiteley, 1976; Jones *et al.*, 1977).

MATERIALES Y METODOS

Se utilizaron ápices vegetativos de yemas axilares de plantas creciendo en

acodo del portainjerto MM 106. En el área de Chapingo este portainjerto se considera medianamente prolífico, con brotes vigorosos, produce un árbol bien anclado, no emite chupones, es poco susceptible a las bajas temperaturas de invierno y es resistente al pulgón lanífero.

El medio de cultivo empleado fue el de Murashige y Skoog (MS) (1962) con algunas modificaciones, el cual ha sido utilizado comúnmente para la propagación *in vitro* de manzano, empleando diferentes concentraciones de los componentes del medio y reguladores del crecimiento, en cada una de las fases de la propagación *in vitro*, como se indica a continuación:

Establecimiento. Se utilizaron las sales minerales del medio MS al 50 y 100% de su concentración, complementado con 1.0 mg/l de tiamina; 100 mg/l de mioinositol; 0.5, 1.0 y 1.5 mg/l de benciladenina (BA); 0.2 mg/l de ácido indolbutírico (AIB), 30 g/l de sacarosa y 5 g/l de agar; ajustándose el pH a 5.5 con NaOH o HCl 1 N.

Proliferación. En el primer trasplante se emplearon los tratamientos que formaron la mayor cantidad de brotes durante el establecimiento; dichos tratamientos correspondieron a 1.5 mg/l de BA y 50 y 100% de sales, respectivamente (Figura 1). En los trasplantes 2, 3 y 4 se utilizó únicamente 1.5 mg/l de BA y 50% de sales, debido a que la respuesta del material vegetativo a este medio fue la mejor.

Enraizamiento. Se emplearon las sales de MS al 50% complementado con: 100 mg/l de mioinositol, 1 mg/l de tiamina, 0.2 y 0.5 mg/l de AIB, 162 mg/l de floriglucinol, 1 g/l de agar, 1 g/l de carbón activado y 30 g/l de sacarosa; el pH se ajustó a 5.5.

En el mes de junio de 1982 se cortaron varetas de 20 a 30 cm de longitud; para evitar su deshidratación se eliminaron las hojas y se colocaron en bolsas de polietileno que contenían agua destilada, transportándolas así al laboratorio.

Para la desinfección se empleó el método citado por Villegas (1982), el cual consiste en lavar las varetas con jabón y estropajo, las que en seguida se cortan en segmentos de 1.0 a 1.5 cm que contengan una yema, colocándolas en un vaso de precipitados (150 ml) con agua destilada y se enjuagan por tres o cuatro ocasiones. Bajo la campana de flujo laminar, se vierte alcohol etílico al 70% (durante tres

minutos) en el vaso con las fracciones de vareta, retirando posteriormente el alcohol y agregando una solución de hipoclorito de calcio al 4% durante 30 minutos; finalmente se enjuagan cuatro veces con agua destilada esterilizada.

La implantación se realizó en la campana de flujo laminar utilizando ápices de 2 a 3 mm incubados en un cuarto con temperatura controlada a $27\pm 1^{\circ}\text{C}$; el fotoperíodo se reguló a 16 hr con luz emitida por lámparas fluorescentes. Todos los tratamientos se establecieron el 28 de junio de 1982, y los brotes obtenidos fueron transplantados individualmente cada cuatro o cinco semanas por cuatro ocasiones sucesivas; posteriormente, se realizaron los experimentos para enraizamiento con los brotes obtenidos durante la proliferación.

Los seis tratamientos evaluados en la fase de establecimiento se analizaron con base en un diseño completamente al azar con cuatro repeticiones; la unidad experimental estuvo constituida por cinco ápices, cada ápice contenido en un tubo de ensaye; el total de tubos fue 120. Los ápices que generaron brotes fueron transplantados sucesivamente durante cuatro ocasiones, empleándose en esta fase un diseño completamente al azar con diez repeticiones; la unidad experimental la constituyó un brote por tubo de ensaye; el total de tubos en cada transplante fue de 10. Para enraizamiento se emplearon los brotes obtenidos en proliferación usando seis tratamientos en un diseño completamente al azar con 10 repeticiones; la unidad experimental la constituyó un brote por tubo de ensaye; el total de tubos fue 60.

Las variables estudiadas fueron: porcentaje de cultivos asépticos; porcentaje de ápices que formaron callo, brotes con o sin desarrollo; número de brotes por explante en cada transplante; y porcentaje de enraizamiento.

RESULTADOS Y DISCUSION

Establecimiento

El porcentaje de cultivos asépticos, promedio de los seis medios de cultivo empleados, fue 96% lo cual indica que el método de desinfección empleado fue efectivo. La formación de brotes o callo a partir de los ápices estuvo influenciada por la concentración de sales del medio de cultivo y de los reguladores del crecimiento; es decir, hubo interacción entre ambos componentes del medio. De esta forma, la

mayor proporción de brotes ocurrió en el medio con 100% de concentración de sales y 1.5 mg/l de BA (Figura 1); estos resultados no coinciden con los obtenidos en un experimento anterior (Villegas, 1982) al trabajar con ápices de cinco cultivares en producción, donde los mayores porcentajes se obtuvieron en un medio diluido al 50%; sin embargo, permite aclarar lo encontrado por Bould (1970) quien menciona que la acumulación de reservas en una planta juvenil es mínima, haciéndose necesario añadir una mayor cantidad de nutrientes.

La obtención de plantas a partir de ápices u otras estructuras es un fenómeno de gran importancia para los viveristas, debido a que sus órganos constituyen los medios de propagación de diversas especies; sin embargo, Vasil y Vasil (1972) mencionan que en una misma planta tales órganos pueden llegar a tener un comportamiento variable, que se refleja en diferencias en cuanto a la formación de brotes, callo o bien ápices no desarrollados. Además, como las yemas dentro de una vareta tienen diferente posición y por tanto, un gradiente fisiológico, se tiene un factor más de variación que sería importante cuantificar.

En relación al efecto de BA, se observa que al aumentar su concentración el porcentaje de ápices que desarrollaron brotes, tendió a incrementarse, tanto en el medio con 100% de sales como en el diluido al 50%, coincidiendo con lo observado por Villegas (1982). Por el contrario, la formación de callo tendió a disminuir debiéndose probablemente al desarrollo de brotes, que correlativamente inhiben la formación de callo. El porcentaje de ápices no desarrollados fue menor al 10% (Figura 1), sin presentar una tendencia definida por efecto de la concentración del medio de cultivo o de la citocinina.

Multiplicación

En el Cuadro 1, se observa una tendencia a incrementar el número de brotes por explante de 1.2 a 10.0, del primero al cuarto transplante, lo cual podría ser consecuencia de una mayor aclimatación *in vitro* que permite tener una mejor respuesta a proliferación; esto coincide con lo encontrado por Villegas (1982), al estudiar cinco cultivares de manzano, y con McCow y Amos (citados por Zimmerman y Broome, 1981), quienes además mencionan que si la aclimatación no se favorece, la proliferación se reduce, y que los ápices de árboles adultos tardan más en aclimatarse.

Aunque no todos los cultivares de manzano responden igual, en general, la

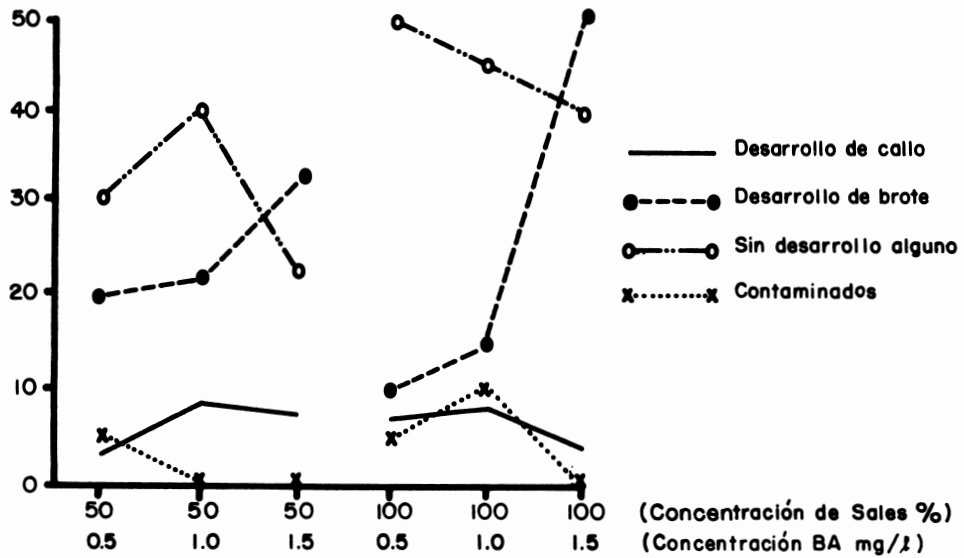


Figura 1. Comportamiento de ápices vegetativos del portainjerto de manzano MM 106 al establecimiento in vitro. La diferencia a 100%, corresponde a ápices muertos, pero no contaminados.

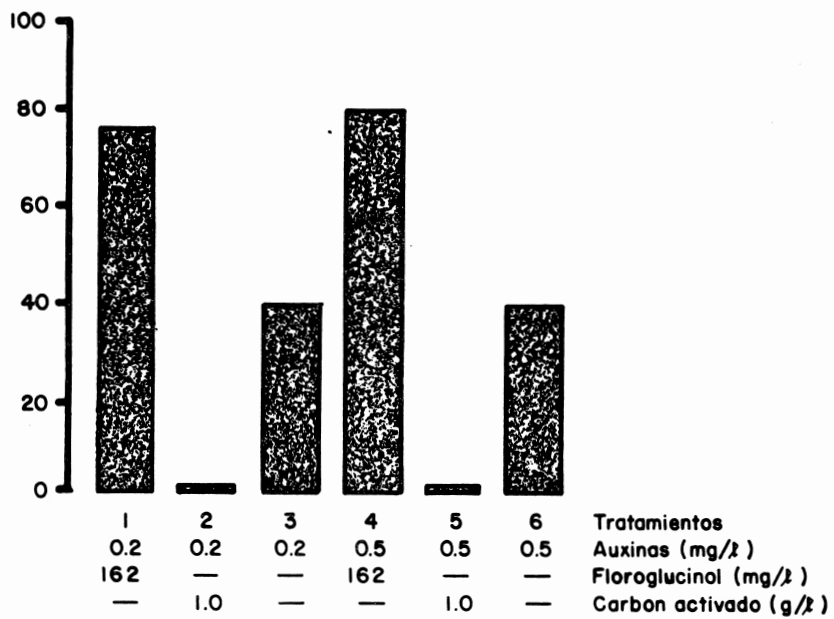


Figura 2. Respuesta de brotes del portainjerto MM 106 al enraizamiento in vitro.

mayor proliferación ocurre en plantas cuyos brotes no presentan alargamiento. Al respecto, Wareing (1970) menciona que si los brotes son vigorosos se reduce la proliferación; esto se presentó en la presente investigación, donde la mayoría de los brotes (80%) fueron vigorosos y de origen axilar.

Cuadro 1. Promedio del número de brotes del portainjerto MM 106 en cada transplante.

Transplante	Número de brotes ^{1/}
1	1.2 c ^{2/}
2	3.4 c
3	6.7 b
4	10.0 a

^{1/}Promedio de 60 observaciones para el primer transplante y 40 en el resto.

^{2/}Valores con la misma letra no son estadísticamente diferentes (Tukey, $\alpha = 0.05$).

Enraizamiento

Según experiencias anteriores, el empleo de 1 mg/l de AIB en el medio de cultivo promueve un desarrollo excesivo del callo y defoliación en los brotes; además, había que transferir los brotes a un medio libre de reguladores del crecimiento. Para evitar estos problemas, se procedió a emplear concentraciones más bajas (0.2 y 0.5 mg/l de AIB), observándose 40% de enraizamiento en ambos casos (tratamientos 3 y 6, Figura 2), pero sin defoliación de brotes ni desarrollo excesivo de callo.

La inclusión de floriglucinol en el medio de cultivo (tratamientos 1 y 4, Figura 2) permitió incrementar el enraizamiento a 70 y 80%, respectivamente, observándose un efecto sinérgico en la combinación auxina-floriglucinol. Estos resultados coinciden con lo informado por Jones y Hatfield (1976), pero difieren con Zimmerman y Broome (1981), quienes no encontraron una respuesta consistente del floriglucinol en la estimulación del enraizamiento, pero consideran benéfica su inclusión en el medio pues limita el desarrollo de callo en la base de los brotes.

La utilización de carbón activado en el medio de cultivo impidió la formación

de raíces (tratamientos 2 y 5, Figura 2). Esto puede deberse a que el carbón activado adsorbe las auxinas existentes en el medio reduciendo su nivel a una concentración tal que ya no estimulen la inducción de raíces, lo que obligaría a emplear dosis de auxinas más elevadas. Estos resultados coinciden con lo encontrado por Fridborg y Eriksson (1975), Constantin *et al.* (1977) y Snir y Erez (1980); además, todos ellos mencionan que el carbón activado adsorbe algunos componentes del medio.

CONCLUSIONES

1. El método de desinfección empleado en la fase de establecimiento de la propagación *in vitro* permitió obtener un promedio de 96% de cultivos asépticos.
2. Al emplear el medio MS con 100% de sales minerales, adicionando 1.5 mg/l de bencladenina, se obtuvo el 50% de brotes formados a partir de yemas, durante la fase de establecimiento.
3. A medida que los brotes se transplantaron sucesivamente de una a cuatro veces, el número de brotes por explante se incrementó de 1.2 a 10.0.
4. En el enraizamiento, al emplear auxina sola se obtuvo 40% de enraizamiento; cuando se adicionó floroglucinol (162 mg/l) se obtuvo 80%.
5. El utilizar 1.0 g/l de carbón activado en el medio de enraizamiento complementado con auxina, no hubo respuesta en el enraizamiento del portainjerto MM 106.
6. Es posible obtener plantas del portainjerto de manzano MM 106, a partir de yemas cultivadas *in vitro*, con una alta eficiencia.

BIBLIOGRAFIA

- Abbott, A. J., and E. Whiteley. 1976. Culture of *Malus* tissues *in vitro*. I. Multiplication of apple plants from isolated shoot apices. *Scientia Horticulturae* 4: 183-195.
- Bould, C. 1970. The nutrition of fruit trees. In: *Physiology of Tree Crops*. L. C. Luckwill and C. V. Cutting (eds.). Acad. Press. London, New York. p. 233-237.
- Constantin, J. J., R. R. Henke, and M. A. Mansur. 1977. Effect of activated charcoal on callus growth and shoot organogenesis in tobacco. *In vitro* 13: 296.

- Dutcher, R. D., and L. E. Powell. 1972. Culture of apple shoots from buds *in vitro*. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 97: 511-514.
- Feucht, W., and B. Dausend. 1976. Root induction *in vitro* of easy-to-root *Prunus pseudoceraus* and difficult-to-root *Prunus avium*. Scientia Horticulturae 4: 49-54.
- Fridborg, G., and T. Eriksson. 1975. Effects of activated charcoal on growth and morphogenesis in cell cultures. Physiol. Plant. 34: 306-308.
- Hyndman, S.E., P. M. Hasegawa, and R. A. Bressan. 1982. Stimulation of root initiation from cultured rose shoots through the use of reduced concentration of mineral salts. Hort. Sci. 17 (1): 82-83.
- James, D. J. 1981. Shoot and root initiation *in vitro* in the apple rootstock M 9 and the promotive effects of phloroglucinol. Scientia Horticulturae 12: 313-319.
- Jones, O. P. 1965. Observation on the growth effects of xylem sap from apple trees. Rep. E. Malling Res. Stn. p. 119-122.
- _____. 1967. Effect of benzyladenine on isolated apple shoots. Nature 215: 1514-15.
- _____, and S. G. S. Hatfield. 1976. Root initiation in apple shoots cultured *in vitro* with auxins and phenolic compounds. J. Hort. Sci. 51: 495-499.
- _____, M. E. Hopgood, and D. O'Farrell. 1977. Propagation *in vitro* of M 26 apple rootstocks. J. Hort. Sci. 52: 235-238.
- Lane, W. D. 1978. Regeneration of apple plants from shoot meristem tips. Plant. Sci. Lett. 13: 281-285.
- Morini, S. 1980. Preliminary trial on micropropagation of apple trees. Riv. Ortoflorofrutt. 64: 41-50.
- Murashige, T. 1974. Plant propagation through tissue cultures. Ann. Rev. Plant. Physiol. 25: 135-166.
- _____, and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15: 473-492.
- Obando R., R. 1982. Logros y aportaciones de la investigación agrícola en los frutales de hoja caduca. INIA, SARH. Folleto Especial No. 91. p. 5-17.
- Snir, I., and A. Erez. 1980. *In vitro* propagation of Malling Merton apple rootstocks. HortSci. 15 (5): 597-598.
- Vasil, L. K., and V. Vasil. 1972. Totipotency and embryogenesis in plant cell and tissue cultures. *In vitro* 8: 117-125.
- Villegas M., A. 1982. Propagación de cultivares de manzano (*Malus pumila* Mill) *in vitro*. Tesis M.C. Colegio de Postgraduados. Chapingo, México.

- Wareing, P. F. 1970. Growth and its coordination in trees. Physiology of the tree crops. L. C. Luckwill and C. V. Cutting (eds.). Acad. Press. London, New York. p. 3-15.
- Werner, E. M., and A. A. Boe. 1980. *In vitro* propagation of Malling 7 apple rootstock. HortSci. 15: 503-510.
- 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.