

## PROPAGACIÓN *in vitro* DEL HÍBRIDO ALMENDRO X DURAZNO H1

### *In vitro* PROPAGATION OF ALMOND X PEACH HYBRID H1

Dulce M. Parada Ponce<sup>1,2</sup> y Ángel Villegas Monter<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Programa de Recursos Genéticos y Productividad – Fruticultura, Campus Montecillo, Colegio de Postgraduados. 56230, Montecillo, Texcoco, Edo. de México. <sup>2</sup>Dirección actual: Comisión Nacional Forestal. Av. Insurgentes No. 25, esquina con Leyes de Reforma, Col. Benito Juárez. 39010, Chilpancingo, Gro.

\*Autor para correspondencia (avillega@colpos.mx)

#### RESUMEN

El híbrido almendro x durazno H1 tiene potencial para ser utilizado como portainjerto de durazno (*Prunus persica* L.) debido a que resiste sequía, suelos poco fértiles, presencia de nematodos, asfixia radical y clorosis inducida por deficiencia de Fe. Como el híbrido propagado por semilla daría segregación, se debe multiplicar vegetativamente para retener las características deseables. Una alternativa es el cultivo *in vitro*, con el cual se pueden obtener plantas libres de patógenos y genéticamente uniformes. Para el establecimiento *in vitro* a qui se utilizaron ápices y fracciones de tallo más yema como explantes, obtenidos de una planta adulta, y se evaluaron tiempos de exposición a hipoclorito de sodio para la desinfección. Se emplearon dos medios de cultivo, Woody Plant Medium (WPM) y WPM modificado (WPMm), y durante la etapa de proliferación se probaron cuatro niveles de nitrato de amonio y tres de benciladenina (BA). Para el enraizamiento se probaron cuatro niveles de auxina. El menor porcentaje de contaminación (6.6 %) se logró con ápices, pero el mayor establecimiento (44 %) *in vitro* ocurrió con secciones nodales del tallo en el medio WPM. En la fase de multiplicación, el mayor número de brotes (20.4) se logró en medio WPM adicionado con 2 mM de nitrato de amonio más 2.5 µM de BA. La aplicación de ácido indolbutírico promovió el enraizamiento *in vitro*, pues al aumentar la concentración de auxina se incrementó el número de raíces, pero disminuyó su longitud. El enraizamiento y la aclimatación se pueden realizar simultáneamente si se aplica Radix 10 000® a 20 % (p/p) durante el trasplante, y así se evitaría la fase de enraizamiento *in vitro*. El protocolo aquí empleado permitió la micropropagación del híbrido almendro x durazno H1 a partir de plantas adultas desarrolladas en campo.

**Palabras clave:** *Prunus spp.*, cultivo *in vitro*, portainjerto, híbrido durazno x almendro.

#### SUMMARY

The almond x peach hybrid H1 has the potential to be used as a peach (*Prunus persica* L.) rootstock, because it is highly resistant to drought, dry soils with low fertility, nematodes, root asphyxia, and chlorosis induced by Fe deficiency. Since a hybrid propagated by seeds would produce segregation, for maintaining the desired plant traits the hybrid should be multiplied by vegetative methods. An alternative for commercial vegetative propagation is the *in vitro*

culture, which can be used to obtain free pathogen plants genetically uniform. In this research shoot tips and stem nodal sections from a mature tree were used as explants for the establishment of the *in vitro* cultures. Exposure time to chlorine was evaluated for disinfection. Two culture media were tested: Woody Plant Medium (WPM) and WPM modified (WPMm). During the proliferation stage, four levels of ammonium nitrate and three levels of benzyl adenine were tested, and during the *in vitro* rooting four levels of auxin were tested. The lowest percent of contamination (6.6 %) was accomplished on apices; the best establishment *in vitro* (44 %) was achieved with stem nodal sections growing on the WPM medium. For the *in vitro* multiplication the best treatment was the WPM medium added with 2 mM of ammonium nitrate plus 2.5 µM of BA. For the *in vitro* rooting, indole butyric acid promoted an increase in the number of roots, but this auxin also shortened the roots. The rooting and acclimatization can be performed simultaneously with Radix 10 000® at 20 % (p/p) if it is applied during transplant. The protocol generated here allows the propagation of the hybrid almond x peach H1 of explants obtained from adult plants grown in field conditions.

**Index words:** *Prunus spp.*, *in vitro* culture, rootstock, almond/peach hybrid.

#### INTRODUCCIÓN

La producción de durazno (*Prunus persica* L.) en México se ha visto afectada principalmente por nematodos, y por suelos pobres y alcalinos con problemas de replantación. Esto, aunado a la falta de producción en vivero de plantas de calidad sanitaria y la creciente exigencia del consumidor, ha provocado que la producción de durazno no sea comercialmente competitiva a nivel mundial a pesar de tener potencial para lograrlo (Enríquez, 2001). Además, en México los portainjertos de durazno se propagan a partir de semilla, lo cual ocasiona que la producción resulte heterogénea en la misma plantación. En Europa y Brasil el uso de híbridos de *Prunus* como portainjertos ha resuelto problemas de replantación, asfixia radical, nematodos (Couto *et al.*, 2004), suelos poco fértiles, secos (Salazar y Melgarejo, 2002) y alcalinos

(Valentini *et al.*, 2006); y su propagación comercial se lleva a cabo por medio del cultivo *in vitro* (Tsipouridis y Thomidis, 2003).

Debido a que los requerimientos para micropropagar son específicos para cada genotipo, es necesario establecer protocolos para cada portainjerto (George, 1993; Hartmann *et al.*, 2002). Así, en la etapa "0", en la que se acondicionan las plantas madre (donadoras de explantes), los tratamientos que se utilizan dependen de las condiciones en las cuales se desarrollan las plantas; si se encuentran en campo la posibilidad de contaminación es mayor que si se mantienen en invernadero, mientras que las plántulas derivadas de semilla han estado menos expuestas a los contaminantes (Villegas, 1990). Comúnmente se hacen aplicaciones de fungicidas y bactericidas sistémicos con el fin de disminuir la contaminación, aunque no siempre con buenos resultados (Rodrigues *et al.*, 2003).

Para el establecimiento *in vitro* de *Prunus*, como explantes se han utilizado ápices (Tabachnik y Kester, 1977; Deogratias *et al.*, 1986; Theiler- Hedtrich y Feucht, 1985) y secciones nodales de tallo (Rodrigues *et al.*, 2003; Couto *et al.*, 2004). La fecha de establecimiento también es determinante en la adaptación a las condiciones *in vitro*; así, en verano la contaminación es baja mientras que en otoño es alta (Rodrigues *et al.*, 2003). Los porcentajes de establecimiento y brotación obtenidos en *Prunus* han sido variables; p. e., Rodrigues *et al.* (2003) reportaron 15 % mientras que Da Silva *et al.* (2003) lograron 63 %. Otro factor importante es el medio de cultivo utilizado; según Pérez-Tornero y Burgos (2000), las especies de *Prunus* son sensibles a altas concentraciones de amonio en el medio de cultivo, mientras que para Couto *et al.* (2004) no existe influencia del medio.

Para la fase de multiplicación, en *Prunus* se han utilizado concentraciones variables de citocininas (0 a 17.76  $\mu\text{M}$ ) (Channuntapipat *et al.*, 2003; Fotopoulos y Sotiropoulos, 2004). Comúnmente se utiliza benciladenina (BA), que Rogalski *et al.* (2003) reportan como la más efectiva, aunque aplicada en altas concentraciones (17.76  $\mu\text{M}$ ) inhibe la elongación de brotes y promueve hiperhidratación (Tabachnik y Kester, 1977; Channuntapipat *et al.*, 2003). De ahí surge la importancia de combinar dosis adecuadas de citocininas con dosis bajas de auxinas (0.01  $\mu\text{M}$ ). Las tasas de multiplicación registradas en *Prunus* han variado tanto que se ha concluido que la respuesta depende del genotipo (Rogalski *et al.*, 2003; Espinosa *et al.*, 2006).

Para la multiplicación *in vitro* se ha utilizado el medio de cultivo de Murahige y Skoog (MS) (1962), pero con

modificaciones en el contenido de nitrógeno, debido a que el nivel de amonio en el medio ha sido excesivo para el cultivo de chabacano (*Prunus armeniaca*) (Pérez-Tornero y Burgos, 2000). Durante el enraizamiento se han utilizado auxinas como ácido indolbutírico (AIB), ácido indolacético (AIA) y ácido naftalenacético (ANA) (Channuntapipat *et al.*, 2003; Espinosa *et al.*, 2006), en diversas concentraciones, pero evitando aplicar niveles mayores de 4.42  $\mu\text{M}$  de AIB porque afectan negativamente la formación de raíces.

La aclimatación a condiciones *ex vitro* ha resultado la fase más complicada debido a que en ella ocurren las mayores pérdidas (Marin, 2003); el éxito depende de los tratamientos aplicados en las etapas previas *in vitro*, además de la capacidad de los brotes para adaptarse a las condiciones *ex vitro* (Rogalski *et al.*, 2003). Es importante considerar que la mayoría de trabajos publicados se han llevado a cabo con explantes provenientes de semilla, debido a la respuesta restringida que se obtiene con materiales adultos de *Prunus*. Por ello, el objetivo de este trabajo fue establecer un protocolo eficiente de propagación *in vitro* para plantas adultas del híbrido almendro x durazno H1, en cuanto a tipos de explante, épocas de establecimiento y medios de cultivo.

## MATERIALES Y MÉTODOS

El híbrido H1 es una cruce de los cultivares 'Dulce Marrakech' x 'Flordaguard', con amplias posibilidades de ser utilizado como portainjerto de durazno en suelos pobres, alcalinos y con problemas de replantación. El híbrido H1 es un ejemplar único que se encuentra en el huerto experimental del Colegio de Postgraduados, en Texcoco, Edo. de México.

### Establecimiento *in Vitro*

Para esta fase se cortaron varetas de 2 a 4 meses provenientes del árbol adulto en producción. Para su desinfección, en el laboratorio las varetas se lavaron con agua y detergente; posteriormente se cortaron en secciones de 4 a 5 cm, se colocaron en un frasco en donde se les aplicó 30 mL de jabón antibacterial y se agitaron durante 15 min a 250 rpm. Enseguida se enjuagaron con agua corriente y se colocaron en solución con 2 g L<sup>-1</sup> de fungicida Captán® y 2 g L<sup>-1</sup> de bactericida Agygent plus 800® por 15 min, en agitación a 250 rpm. Después los explantes se enjuagaron con agua corriente y se colocaron en una solución con 3 g L<sup>-1</sup> de Timsen®. En la campana de flujo laminar, los explantes se trataron con alcohol a 70 % durante 1 min, y después las secciones nodales se mantuvieron en hipoclorito de sodio (Cloralex®) a 10 % (v/v) durante 5, 10 y 15 min, mientras que los ápices

obtenidos de las varetas sólo se trataron durante 5 min. Por último, se dieron cuatro enjuagues con agua destilada estéril y se procedió a sembrar los ápices y secciones nodales en el medio de cultivo para inducir la brotación.

Se evaluaron dos medios de cultivo (Cuadro 1), WPM (Lloyd y McCown, 1980) y WPM modificado, debido a que el CaCl<sub>2</sub> es considerado tóxico (Villegas *et al.*, 1992). En todos los casos el medio fue complementado con: tiamina 0.4, mioinositol 100, agar 6000 y sacarosa 30000 (en mg L<sup>-1</sup>). El experimento se repitió en dos fechas (22 de marzo y 25 de mayo de 2005) y para cada tratamiento se utilizaron tres repeticiones de cinco explantes cada una. Los explantes se establecieron en tubos de ensayo que contenían 10 mL de medio de cultivo, que se mantuvieron en cuarto de incubación con fotoperiodo de 16 h, intensidad lumínica de 76  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  y 8 h de oscuridad, con temperatura de 25  $\pm$  2 °C. La evaluación de los porcentajes de contaminación, explantes vivos, muertos y brotados, se hizo a las cuatro semanas después del establecimiento.

### Multiplicación *in vitro*

Durante esta fase se utilizaron brotes desarrollados *in vitro* y subcultivados seis o más veces; se evaluaron cuatro concentraciones de NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> (0.0, 2.0, 4.0 y 8.0 mM) y tres de benciladenina BA (2.5, 5.0 y 10  $\mu\text{M}$ ), para un total de 12 tratamientos. Para cada tratamiento se utilizaron cuatro frascos de vidrio con capacidad de 100 mL que contenían 20 mL del medio de cultivo WPM (Cuadro 1), con cuatro explantes cada uno. El pH del medio de cultivo se ajustó a 5.5 antes de adicionar el NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> o la BA. Después de cuatro semanas se evaluó: número, longitud y porcentaje de agua en todos los brotes de cada tratamiento. El experimento se repitió cuatro veces.

### Enraizamiento *in Vitro*

Para esta etapa se probaron cuatro concentraciones de AIB (0, 0.1, 2.1 y 3.4  $\mu\text{M}$ ) y se utilizaron brotes de 1.5 a 2 cm de longitud que provenían de siete o más subcultivos. En cada tratamiento se utilizaron cinco frascos de vidrio de 100 mL que contenían 20 mL del medio de cultivo para enraizamiento (ME) (Villegas *et al.*, 1992; Cuadro 1), con cuatro explantes cada uno. El experimento se repitió en dos ocasiones y en ellos se evaluó número y longitud de raíces. En la primera repetición el registro de datos se hizo a la cuarta semana, y en la segunda a la tercera semana, debido a que la producción de callo se incrementó considerablemente en la cuarta semana. Las raíces largas dificultaron el trasplante a suelo. Las condiciones de incubación fueron las mismas que para el establecimiento *in vitro*.

**Cuadro 1. Composición de los medios de cultivo Woody Plant Medium (WPM) y Woody Plant Medium modificado (WPMm) y medio para enraizamiento (ME).**

	WPM (mg L <sup>-1</sup> )	WPMm (mg L <sup>-1</sup> )	ME (mg L <sup>-1</sup> )
<b>Nutrimiento</b>			
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	400	400	960
Mg SO <sub>4</sub>	370	370	370
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170	170	170
CaCl <sub>2</sub> . 2H <sub>2</sub> O	96		
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> . 4H <sub>2</sub> O	556	695	354
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	990		
KNO <sub>3</sub>			1011
<b>Quelatos</b>			
Na <sub>2</sub> EDTA. 2H <sub>2</sub> O	37.2	37.2	37.2
FeSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	27.8	27.8	27.8
<b>Microelementos</b>			
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6.2	6.2	6.2
Mn SO <sub>4</sub> . 4H <sub>2</sub> O	22.3	22.3	8.4
ZnSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	8.6	8.6	8.6
Na <sub>2</sub> Mo O <sub>4</sub> . 2H <sub>2</sub> O	0.25	0.25	0.25
CuSO <sub>4</sub> . 5H <sub>2</sub> O	0.25	0.25	0.025
CoCl <sub>2</sub> . 6H <sub>2</sub> O			0.025

### Aclimatación

Los explantes provenientes de la fase de enraizamiento fueron trasplantados a charolas de 70 cavidades rellenas con "peat moss" humedecido a capacidad de campo. Para eliminar por completo el medio de cultivo, los brotes fueron lavados con agua tibia, y a los que no enraizaron se les aplicó en la base Radix 10 000® a 20 % (p/p). Las charolas se taparon con cubiertas plásticas y se colocaron en una cámara de crecimiento con humedad relativa de 90 % y 34 °C de temperatura en el sustrato. Después de tres semanas se retiró la cubierta y permanecieron ahí durante un mes más. Posteriormente se colocaron en invernadero con malla sombra de 30 %, y después de dos meses se evaluó el porcentaje de sobrevivencia. Las condiciones del invernadero fueron: humedad relativa promedio de 77 % y temperatura promedio de 22.6 °C, mínima de 15 °C y máxima de 41.5 °C. El riego se hizo con agua destilada.

### Análisis estadístico

En todos los experimentos el diseño experimental empleado fue completamente al azar con arreglo factorial de tratamientos. El análisis de los datos consistió de análisis de varianza y pruebas de medias de Tukey ( $\alpha=0.05$ ), con excepción de la aclimatación donde se empleó coeficiente de correlación. En las variables de porcentaje se procedió a la transformación arcoseno de los valores previo al análisis respectivo, con el programa SAS, versión 9.1.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Establecimiento *in Vitro*

El análisis de varianza mostró efectos significativos ( $P \leq 0.05$ ) para las interacciones tipo de explante x tiempo de exposición al hipoclorito de sodio, y tipo de explante x fecha de establecimiento. En el uso de ápices como explantes, la fecha de establecimiento influyó en la contaminación por hongos; así, en la fecha 1 (22 de marzo) la contaminación por hongos fue mayor (5.5 %) que en la fecha 2 (25 de mayo, 1.1 %). En la contaminación por bacterias no hubo diferencias estadísticas entre fechas (Cuadro 2). Estos resultados confirman que la contaminación puede variar entre épocas del año y entre edades de las plantas madre (Theiler-Hedtrich y Feucht, 1985; Kamali *et al.*, 2001). Estos porcentajes de contaminación fueron bajos al compararlos con los de otros estudios: 14.8 % obtenido por Da Silva *et al.* (2003), 50 % por Rodrigues *et al.* (2003) y 70 % en yemas en letargo (Hammerschlag, 1982), en los cuales no se especifica el tipo de contaminante. Por tanto, el protocolo de desinfección aquí empleado fue eficiente para plantas desarrolladas en campo.

El porcentaje de explantes que sobrevivieron y brotaron durante el establecimiento *in vitro*, fueron mayores en la primera fecha (22 de marzo) con 28.9 % que en la segunda (Cuadro 2), lo que evidencia la importancia de la época de colecta de estos explantes. Kamali *et al.* (2001) y Hammerschlag (1982) recomiendan que la colecta se realice durante el crecimiento vegetativo activo. Con base en lo aquí observado, la colecta de explantes en plantas adultas del híbrido H1 que crecen en campo se debe hacer al inicio de la brotación (22 de marzo).

**Cuadro 2. Efecto de la fecha de establecimiento *in vitro* en el comportamiento de ápices del híbrido almendro x durazno H1.**

Fecha	Contaminación (%)		Estado de los explantes (%)		
	Hongos	Bacterias	Vivos	Brotados	Muertos
22/03/05	5.5 a	0.0 a	28.9 a	28.9 a	65.5 b
25/05/05	1.1 b	2.2 a	14.4 b	14.4 b	83.3 a
DMS	3.9	3.2	3.2	3.2	3.9

Medias con letras iguales en la misma columna, no presentan diferencias significativas (Tukey, 0.05). DMS = Diferencia mínima significativa.

Entre los dos medios de cultivo hubo diferencias ( $P \leq 0.05$ ) en cuanto a las variables explantes vivos, brotados, muertos y contaminados por hongos y bacterias. Los mayores porcentajes de explantes que produjeron brotes (43.4 %) se obtuvieron con el medio WPM (Cuadro 3). Esta respuesta es superior a la reportada por Rodrigues

*et al.* (2003), quienes obtuvieron de 18 a 40 % con el híbrido almendro x durazno GF-677.

**Cuadro 3. Efecto del medio de cultivo en el porcentaje de contaminación y brotación de secciones nodales del híbrido almendro x durazno H1, establecidos *in vitro*.**

Medio	Contaminación (%)		Estado de los explantes (%)		
	Hongos	Bacterias	Vivos	Brotados	Muertos
WPM	18.5 a	20.4 a	44.1 a	43.3 a	17.4 b
WPMm	5.2 b	4.1 b	20.4 b	20.4 b	70.4 a
DMS	3.9	3.4	4.0	3.9	4.4

Medias con letras iguales en la misma columna, no presentan diferencias significativas (Tukey, 0.05). DMS = Diferencia mínima significativa. WPM = Woody Plant Medium; WPMm = Woody Plant Medium, modificado.

Al analizar la efectividad de los tres tiempos de exposición de secciones nodales al hipoclorito de sodio (Cloralex®), se encontró que este factor únicamente influyó en la incidencia de hongos, y que los tiempos más efectivos fueron 10 y 15 min, con 10 y 9.4 % de contaminación. Las variables restantes (contaminación por bacterias, brotación, explantes vivos y muertos) no presentaron diferencias ( $P = 0.37$ ) entre medios de cultivo. Finalmente, al comparar el desempeño de ambos tipos de explante al ser expuestos por 5 min al hipoclorito de sodio, se observó que los ápices se contaminaron menos ( $P \leq 0.05$ ) que las secciones nodales, tanto por hongos como por bacterias; esto sugiere que a menor tamaño de explante, menor contaminación. En cuanto a sobrevivencia y brotación, las secciones nodales del tallo presentaron porcentajes mayores que los ápices. Los ápices murieron en mayor proporción (74.4 %) que las secciones nodales (Cuadro 4). Esto implica que se pueden utilizar ápices para obtener plantas con prueba negativa para algún virus de interés, o usar secciones nodales para multiplicar los explantes.

**Cuadro 4. Efecto del tipo de explante (ápices y secciones nodales) en el porcentaje de contaminación y brotación *in vitro* del híbrido almendro x durazno H1.**

Explante	Contaminación (%)		Estado de los explantes (%)		
	Hongos	Bacterias	Vivos	Brotados	Muertos
Ápice	3.3 b	1.1 b	21.7 b	21.7 b	74.4 a
S. nodal	16.1 a	10.5 a	33.3 a	33.3 a	40.0 b
DMS	3.8	3.1	3.7	3.7	4.6

Medias con letras iguales en la misma columna, no presentan diferencias significativas (Tukey, 0.05). DMS = Diferencia mínima significativa.

Al tomar en cuenta que la contaminación reportada en *Prunus* varía de 3 % (Rodrigues *et al.*, 2003) a 90 % (Hammerschlag, 1982; Couto *et al.*, 2004), se infiere que el protocolo de desinfección empleado fue apropiado para plantas adultas del híbrido H1 desarrolladas en campo.

**Multiplicación *in vitro***

El análisis de varianza mostró diferencias significativas entre tratamientos para número y longitud de brotes y contenido de agua ( $P \leq 0.01$ ) durante la etapa de proliferación. Al comparar los promedios de diversas concentraciones de  $NH_4NO_3$  y BA, se detectaron diferencias ( $P \leq 0.05$ ) entre tratamientos (Cuadro 5). En el número de brotes hubo efecto significativo del nitrato de amonio, pero no de citocininas ni de la interacción nitrato x citocinina. El mayor número de brotes (20.4) se obtuvo en el tratamiento con 2 mM de  $NH_4NO_3$  y 2.5  $\mu M$  de BA, que fue estadísticamente igual a los tratamientos 5, 6, 9 y 12 (Cuadro 5). Puesto que los medios con 2 mM de  $NH_4NO_3$  obtuvieron mayor número de brotes independientemente de la concentración de BA, no se justifica el uso de medios de cultivo con altos niveles de amonio (10 a 20 mM) que además han resultado tóxicos para *Prunus* (Pérez-Tornero y Burgos, 2000). El menor número de brotes se presentó en los medios sin  $NH_4NO_3$ , independientemente de la concentración de BA, lo que pone en evidencia la importancia de este nutrimento en la multiplicación *in vitro*. Al respecto, en la literatura consultada la proliferación solamente es atribuida a la concentración de citocininas (Tabachnik y Kester, 1977; Hartmann *et al.*, 2002; Posser *et al.*, 2001), y estos resultados demuestran que se debe considerar también la interacción entre  $NH_4NO_3$  y BA, así como otros componentes del medio de cultivo (Villegas *et al.*, 1992; Pérez-Tornero y Burgos, 2000).

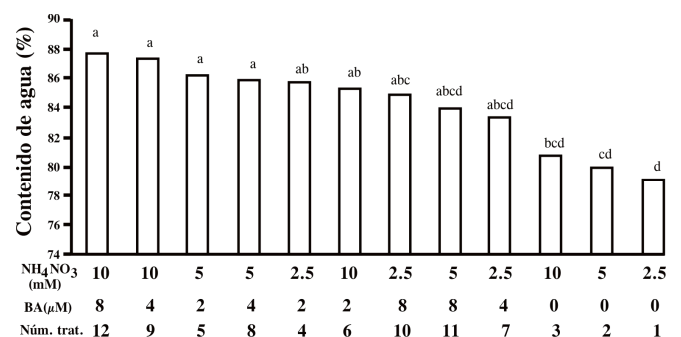
En la longitud de brotes también hubo efecto de los tratamientos (Cuadro 5). Los de mayor longitud fueron los que crecieron con 2.5 y 5.0  $\mu M$  de BA, independientemente de la concentración de  $NH_4NO_3$ . Así, en el tratamiento 4 (10  $\mu M$  de BA + 4 mM de  $NH_4NO_3$ ) los brotes fueron de menor tamaño y en el tratamiento 7 (2.5  $\mu M$  de BA + 4 mM de  $NH_4NO_3$ ) los de mayor tamaño (Cuadro 5). Lo anterior confirma nuevamente la importancia de la interacción  $NH_4NO_3$  x BA durante la proliferación del híbrido H1. Dado que las concentraciones de  $NH_4NO_3$  que generalmente se utilizan en los medios de cultivo para la micropropagación de *Prunus* son de 10 a 20 mM, los resultados aquí obtenidos indican que tales concentraciones se deberían reducir, según la especie o cultivar, como también señalan Vieitez *et al.* (1985), Ruzic *et al.* (2000) y Pérez-Tornero y Burgos (2000), para lograr mayor número de brotes y, como se mostrará adelante, para reducir problemas de hiperhidratación.

**Cuadro 5. Efecto de la concentración del  $NH_4NO_3$  y BA en el número y longitud de brotes del híbrido almendro x durazno H1 cultivados *in vitro*.**

Núm.	Tratamientos		Brotes	
	$NH_4NO_3$ (mM)	BA ( $\mu M$ )	Número	Longitud (cm)
4	2	2.5	20.4 a	1.4 ab
5	2	5.0	19.6 ab	1.1 abc
6	2	10.0	14.5 abc	0.9 bc
9	4	10.0	14.4 abc	0.9 c
12	8	10.0	10.9 abc	0.9 bc
8	4	5.0	9.9 bc	1.2 abc
7	4	2.5	9.6 bc	1.4 a
11	8	5.0	9.1 c	1.1 abc
10	8	2.5	7.5 c	1.3 abc
2	0	5.0	7.0 c	1.3 abc
1	0	2.5	6.7 c	1.3 abc
3	0	10.0	5.5 c	1.4 abc
DMS			10.44	0.44

Medias con letras iguales en la misma columna, no presentan diferencias significativas (Tukey, 0.05). DMS = Diferencia mínima significativa.

Un aspecto poco considerado durante la etapa de proliferación es el contenido de agua en los tejidos, a pesar de que está asociado con la hiperhidratación (Channuntapitat *et al.*, 2003; Rogalski *et al.*, 2003). En la Figura 1 se muestra que el contenido de agua en los tejidos varió de 79.0 a 87.7 %. En los tratamientos sin  $NH_4NO_3$  (1, 2 y 3) los contenidos de agua fueron inferiores y diferentes ( $P \leq 0.05$ ) a los tratamientos 12 y 9 que contenían 4 y 8 mM de  $NH_4NO_3$  respectivamente, más 10  $\mu M$  de BA. En estas condiciones (Tratamientos 8, 9, 10, 11 y 12) los explantes mostraron síntomas de hiperhidratación, por lo que es necesario reducir la cantidad de esta sal en el medio y así evitar la hiperhidratación como la observada en chabacano cvs. 'Currot' y 'Helena' (Pérez-Tornero y Burgos, 2000) y en almendro cv. 'Nonpareil', cultivados en medios de cultivo con 10  $\mu M$  de BA (Channuntapitat *et al.*, 2003).



**Figura 1. Efecto de la concentración de  $NH_4NO_3$  y BA en el contenido de agua en brotes del híbrido almendro x durazno H1 desarrollados *in vitro*. DMS = 5.1.**

### Enraizamiento *in vitro*

Las concentraciones de AIB tuvieron efecto en el número de raíces producidas por brote ( $P \leq 0.05$ ), ya que con 2.1 y 3.4  $\mu\text{M}$  de esta auxina se maximizó esta variable, mientras que en ausencia de auxina no hubo enraizamiento (Cuadro 6). Para longitud de raíces, con el tratamiento 0.1  $\mu\text{M}$  de AIB se logró el mayor tamaño ( $P \leq 0.05$ ) que con 3.4  $\mu\text{M}$  que dio el menor tamaño. Se encontró que a mayor concentración de AIB, se aumentó el número de raíces pero disminuyó la longitud de éstas, lo que demuestra el efecto inhibitorio de las auxinas en la elongación de raíces; esto podría explicar la dificultad que presentan las especies de *Prunus* para enraizar *in vitro*, y que ha obligado a los investigadores a colocar los explantes por 3 ó 5 d en medio para enraizamiento para luego transferirlos a medio sin auxinas (Espinosa *et al.*, 2006; Channuntapipat *et al.*, 2003). En el presente trabajo el enraizamiento se llevó a cabo sin cambiar de medio a los explantes.

**Cuadro 6. Efecto de la concentración de la auxina AIB en la longitud y número de raíces, durante el enraizamiento *in vitro* del híbrido almendro x durazno H1.**

Variables	AIB ( $\mu\text{M}$ )				DMS
	0	0.1	2.1	3.4	
Longitud de raíces (cm)	0.0 c	0.9 a	0.9 ab	0.5 b	0.46
Número de raíces	0.0 b	0.5 b	1.4 a	1.7 a	0.52

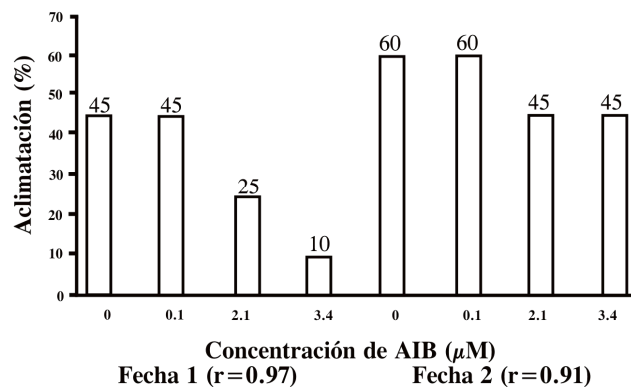
Medias con letras iguales en la misma hilera, no presentan diferencias significativas (Tukey, 0.05). DMS = Diferencia mínima significativa.

A los brotes que no produjeron raíces (p. e., en el testigo), al ser trasplantados a suelo se les aplicó Radix 10 000® a 20 % (p/p) y así también se logró el enraizamiento; es decir, es posible evitar la fase de enraizamiento *in vitro* toda vez que también puede lograrse *ex vitro*.

### Aclimatación

La sobrevivencia de plantas en esta fase se analizó con base en los tratamientos de auxinas que recibieron durante el enraizamiento *in vitro*. El mayor porcentaje de plantas aclimatadas en la primera fecha fue de 45 %, en el tratamiento con 0.1  $\mu\text{M}$  de auxina y en el testigo al que se aplicó Radix 10 000® a 20 % (p/p) al momento del trasplante debido a que no tenían raíces (Figura 2). El hecho de que los explantes sin raíces hayan sobrevivido, implica que tenían primordios de raíz o que el tratamiento con Radix® estimuló el enraizamiento lo que confirma que en el híbrido H1 la formación de raíces puede hacerse directamente en suelo y así ahorrar tiempo y dinero, como se ha observado en otras especies (Hartmann *et al.*, 2002).

En el segundo experimento, nuevamente los brotes del testigo y los tratados con 0.1  $\mu\text{M}$  de auxina fueron los que presentaron mayor aclimatación con 60 % (Figura 2); estos resultados son considerados aceptables, de acuerdo con lo indicado por Espinosa *et al.* (2006), y muestran que el protocolo aquí utilizado es apropiado para la micropropagación del híbrido H1. La mayor sobrevivencia en la segunda fecha (Figura 2), se atribuye a la disminución del periodo al que fueron sometidos los brotes a los tratamientos con auxina (tres semanas), ya que en la primera fecha que se cultivo por cuatro semanas hubo formación de callo que limitó el desarrollo de raíces, y comprueba que los explantes no requieren de 28 d para ser trasplantados. El tiempo de permanencia en el medio para enraizamiento está en función del tamaño de raíz, el cual depende a la vez de la concentración de auxina empleada en el medio y de la especie. Esto podría explicar el porqué algunos investigadores (Espinosa *et al.*, 2006; Channuntapipat *et al.*, 2003) utilizan dos medios de cultivo para enraizar *Prunus*.



**Figura 2. Porcentaje de aclimatación en plantas propagadas *in vitro* del híbrido almendro x durazno H1, en dos fechas y cuatro concentraciones de AIB.**

Con el fin de conocer la relación que existe entre los tratamientos empleados durante el enraizamiento y el porcentaje de aclimatación, se determinó la correlación entre ambas respuestas. En las dos fechas los coeficientes fueron altos y negativos (Figura 2), lo que indica que a mayor concentración de auxina durante el enraizamiento, menor será el porcentaje de aclimatación. Por tanto, no conviene utilizar concentraciones de auxina mayores a 0.1  $\mu\text{M}$  durante el enraizamiento del híbrido H1.

### CONCLUSIONES

La época de establecimiento *in vitro* influyó en la contaminación por hongos, porcentajes de brotación, sobrevivencia y muerte de explantes. El establecimiento

óptimo ocurrió con explantes obtenidos al inicio de la brotación (22 de marzo).

Para la multiplicación de brotes, el medio de cultivo WPM adicionado con 2 mM de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  más 2.5  $\mu\text{M}$  de BA, produjo el máximo número de brotes (20.4), los brotes más largos (13.7 mm) y sin problemas de hiperhidratación, por lo que fue el mejor medio para esta fase.

La auxina AIB indujo el enraizamiento *in vitro* al incrementar el número de raíces, pero disminuyó la longitud de las mismas. El enraizamiento directo en suelo también es viable si los de explantes son tratados con Radix 10 000® a 20 % (p/p) al momento del trasplante.

El protocolo aquí generado permite la micropropagación del híbrido almendro X durazno H1 a partir de explantes obtenidos de plantas adultas desarrolladas en campo.

### BIBLIOGRAFÍA

- Channuntapipat C, M Sedgley, G Collins (2003) Micropropagation of almond cultivars Nonpareil and Plus Ultra and hybrid rootstock Titan x Nemaguard. *Sci. Hort.* 98:473-484.
- Couto M, R Ucker, R Pedroso de Oliveira (2004) Establecimiento *in vitro* de porta-enxertos de *Prunus* sp. *Rev. Bras. Frutic.* 26:561-563.
- Da Silva D A, M Rogalski, L K Antunes, C Felisbino, L Crestani, M P Guerra (2003) Establecimiento e multiplicação *in vitro* de porta-enxertos de *Prunus*. *Rev. Bras. Frutic.* 25:297-300.
- Deogratias J M, A Lutz, F Dosba (1986) *In vitro* micropropagation of shoot tips from juvenile and adult *Prunus avium* L. and *Prunus persica* (L.) Batsch to produce virus free plants. *Acta Hort.* 193:139-144.
- Enríquez J A (2001) Rescate de germoplasma de durazno *Prunus persica* L. Batsch., establecido en Zacatecas. *In: Memoria 5ª Jornada de Investigación. Universidad Autónoma de Zacatecas.* pp:23-28.
- Espinosa A, P M Pijut, CH H Michler (2006) Adventitious shoot regeneration and rooting of *Prunus serotina in vitro* cultures. *HortScience* 41:193-201.
- Fotopoulos S, T E Sotiropoulos (2004) *In vitro* propagation of the PR 2004/84 peach rootstock (*Prunus persica* x *P. amygdalus*): the effect of BAP, NAA, and GA<sub>3</sub> on shoot proliferation. *Adv. Hort. Sci.* 18:101-104.
- George E F (1993) Plant Propagation by Tissue Culture, Part 1. 2nd ed. Exegetics Ltd. Somerton. UK. 345 p.
- Hammerschlag F (1982) Factors affecting establishment and growth of peach shoots *in vitro*. *HortScience* 17:85-86.
- Hartmann H T, D E Kester, F T Davies Jr, R L Geneve (2002) Plant Propagation. Principles and Practices. Prentice Hall. Upper Saddle River, New Jersey. 645 p.
- Kamali K, E Majidi, R Zarghami (2001) Micropropagation of GF-677 rootstocks (*Prunus amygdalus* x *P. persica*). *Seed and Plant* 17:175-177.
- Lloyd G, B McCown (1980) Commercially feasible micropropagation of mountain laurel *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. *Int. Plant Prop. Soc. Comb. Proc.* 30:421-427.
- Marin J A (2003) High survival rates during acclimatization of micropropagated fruit tree rootstocks by increasing exposures to low relative humidity. *Acta Hort.* 616:139-142.
- Murashige T, F Skoog (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15:473-497.
- Perez-Tornero O, L Burgos (2000) Different media requirements for micropropagation of apricot cultivars. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 63:133-141.
- Posser S C A, J C Fachinello, G R L Fortes, I Citadin, A C Rodriguez, A C Quezada, J B Silva (2001) Multiplicação *in vitro* de porta-enxertos do genero *Prunus* sob diferentes concentrações de BAP em dois meios de cultura. *Rev. Bras. Frutic.* 23:488-492.
- Rodrigues C, C A Posser, G R De Lucas, J C Fachinello, J Baptista (2003) Establecimiento e multiplicação *in vitro* de *Prunus* sp. em diferentes meios de cultivo. *Rev. Bras. Frutic.* 25:131-133.
- Rogalski M, L K Antunes, C Felisbino, L Crestani, M P Guerra, A Lima (2003) Acclimatização de porta-enxertos de *Prunus* sp. micropropagados. *Rev. Bras. Frutic.* 25:279-281.
- Ruzic D, M Saric, R Cerovic, L Culatif (2000) Relationship between the concentration of macroelements, their uptake and multiplication of cherry rootstock Gisela 5 *in vitro*. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 63:9-14.
- Salazar D M, P Melgarejo (2002) El Cultivo del Almendro. Ed. Mundi-Prensa. Madrid. 234 p.
- Tabachnik L, D E Kester (1977) Shoot culture for almond and almond - peach hybrid clones *in vitro*. *HortScience* 12:545-547.
- Theiler-Hedtrich C M, W Feucht (1985) Micropropagation of *Prunus cerasus* rootstocks - Influence of culture medium constituents on growth in stage I and II. *Acta Hort.* 169:335-340.
- Tsipouridis C, T Thomidis (2003) Methods to improve the *in vitro* culture of GF677 (peach x almond) peach rootstock. *New Zealand J. Crop Hort. Sci.* 31:361-364.
- Valentini G H, R E Murray, L E Arroyo (2006) Evaluación de los efectos de distintos portainjertos sobre la calidad de los frutos de dos variedades de duraznero cultivadas en el nordeste de la provincia de Buenos Aires (Argentina). *RIA* 35:71-89.
- Vieitez A M, A Ballester, M C San-José, E Vieitez (1985) Anatomical and chemical studies of vitrified shorts of chesnut regenerated *in vitro*. *Physiol. Plant.* 65:177-184.
- Villegas A (1990) Métodos asepticos. *In: Fundamentos Teórico-Prácticos del Cultivo de Tejidos Vegetales.* C H Rossell y V M Villalobos (ed). FAO. No.105 Roma. pp:21-27.
- Villegas M A, C Mazuelos, M Cantos, A Troncoso (1992) Influencia del nitrógeno sobre el desarrollo *in vitro* del portainjerto de vid 161-49. *Suelo y Planta* 2:529-539.