

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE TEMUCO
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y FORESTALES
ESCUELA DE AGRONOMÍA



ESTABLECIMIENTO DE PROTOCOLOS PARA REGENERACIÓN
IN VITRO DE CEREZO DULCE (*Prunus avium* L.)
VAR. LAMBERT

Tesis presentada a la Facultad de
Ciencias Agropecuarias y Forestales
como parte de los requisitos para optar al
título de :

INGENIERO AGRÓNOMO

MARGARITA EMA TORO CARCAMO

TEMUCO – CHILE
2004

A mi familia, especialmente a mi mamita, quien a pesar de nuestras diferencias, ha estado a mi lado en todo momento...

AGRADECIMIENTOS

Gracias Dios mío por darme la oportunidad de crecer en tu amor y poder elegir el camino a seguir; por darme siempre la fuerza necesaria para terminar lo que he emprendido, en este caso, finalizar mi carrera. Te pido que siempre nos acompañes a mi familia y a todos los que nos rodean, a quienes les agradezco con mucho cariño su ayuda, apoyo, compañía y paciencia; a mis padres y hermanos, a mis amigos y compañeros, profesores y laboratoristas, secretarias del departamento y bibliotecarios, a los señores(as) directores, investigadores, laboratoristas y bibliotecarios de INIA Carillanca, al jefe de planta, agrónomos y trabajadores de la empresa David del Curto y a la familia que nos recibió para nuestra práctica rural en Cunco Chico, a mi esposo y a mi querida hijita... a todos...

...MUCHAS GRACIAS.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

CONTENIDOS	PÁGINA
I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	4
2.1 Antecedentes de cultivo <i>in vitro</i> en cerezo	4
2.1.1 Importancia y utilización	4
2.1.2 Variedades, material vegetal y tipo de regeneración utilizadas en cerezo	5
2.2 Cultivo de tejidos <i>in vitro</i>	7
2.2.1 Definición y aspectos generales	7
2.2.2 Equipo de laboratorio	9
2.2.3 Desinfección y esterilización	9
2.2.4 Factores limitantes	11
2.2.4.1 Oxidación de especies leñosas	12
2.2.4.2 Contaminación	14
2.2.4.3 Vitrificación	15
2.2.4.4 Especies recalcitrantes	16
2.3 Micropropagación	17
2.3.1 Ventajas	17
2.3.2 Desventajas	18
2.3.3 Medio de cultivo y sus componentes	19
2.3.3.1 Agentes solidificantes	20
2.3.3.2 Constituyentes minerales	20
2.3.3.3 Fuente de carbohidratos y energía	21
2.3.3.4 Biorreguladores	22

2.3.3.5	Vitaminas y aminoácidos	25
2.3.3.6	Otros	26
2.3.4	Factores físicos	26
2.3.4.1	Iluminación	26
2.3.4.2	Temperatura	27
2.3.4.3	Humedad relativa	27
2.3.4.4	Acidez del medio (pH)	28
2.3.4.5	Subcultivos	28
2.4	Estados de desarrollo	29
2.4.1	Establecimiento de explantes	30
2.4.1.1	Elección del material vegetal	30
2.4.2	Regeneración	35
2.4.2.1	Organogénesis	35
2.4.3	Elongación	37
III.	MATERIAL Y MÉTODO	38
3.1	Lugar de trabajo	38
3.2	Etapas de desarrollo del cultivo <i>in vitro</i>	38
3.2.1	Etapa de establecimiento de explantes	38
3.2.1.1	Selección del material vegetal	38
3.2.1.2	Desinfección previa al cultivo	39
3.2.1.3	Medio de cultivo	39
3.2.1.4	Tratamientos para la etapa de establecimiento de explantes	40
3.2.1.5	Pruebas de evaluación	40
3.2.2	Etapa de proliferación de explantes	40
3.2.2.1	Medio de cultivo	40
3.2.2.2	Tratamientos para la etapa de proliferación de explantes	41
3.2.2.3	Pruebas de evaluación	41

3.2.3	Etapa de elongación de explantes	41
3.2.3.1	Medio de cultivo	41
3.2.3.2	Tratamientos para la etapa de elongación de explantes	42
3.2.3.3	Pruebas de evaluación	42
3.2.4	Etapa de radicación de explantes	43
3.2.4.1	Medio de cultivo	43
3.2.4.2	Tratamientos para la etapa de radicación de explantes	43
3.2.4.3	Pruebas de evaluación	43
3.2.5	Etapa de elongación de la raíz	44
3.2.5.1	Medio de cultivo	44
3.2.5.2	Tratamientos para la etapa de elongación de la raíz	44
3.2.5.3	Pruebas de evaluación	44
3.3	Análisis estadístico	45
IV.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	47
4.1	Medio de cultivo	47
4.2	Etapa de establecimiento de explantes	48
4.2.1	Elección del material	48
4.2.2	Contaminación	49
4.2.3	Oxidación	51
4.3	Etapa de proliferación de explantes	51
4.3.1	Brotación	51
4.3.2	Vitrificación en la etapa de proliferación de explantes	55
4.4	Etapa de elongación de explantes	56
4.4.1	Elongación	56
4.4.2	Vitrificación en la etapa de elongación de explantes	58
4.5	Etapa de radicación de explantes	60
4.6	Etapa de elongación de la raíz	63

V.	CONCLUSIONES	65
VI.	RESUMEN	67
	SUMMARY	68
VII.	LITERATURA CITADA	69
VIII.	ANEXOS	74

ÍNDICE DE CUADROS

CUADRO		PÁGINA
1	Porcentaje de explantes contaminados según tratamientos con hipoclorito de sodio	50
2	Porcentaje de explantes muertos según distintos tratamientos con BAP	52
3	Características presentes en plántulas según los distintos tratamientos hormonales durante la etapa de brotación	52
4	Efecto de diferentes tratamientos hormonales sobre el número de brotes en <i>Prunus avium</i> L. var. Lambert <i>in vitro</i>	53
5	Características presentes en plántulas según los distintos tratamientos hormonales durante la etapa de crecimiento del ápice	56
6	Efecto de diferentes tratamientos hormonales sobre el largo del brote (cm) en <i>Prunus avium</i> L. var. Lambert <i>in vitro</i>	57
7	Porcentaje de vitrificación durante la etapa de elongación de explantes según distintos tratamientos hormonales y avance del tiempo	59

8	Efecto de diferentes tratamientos hormonales sobre el número de raíces en <i>Prunus avium</i> L. var. Lambert <i>in vitro</i>	61
9	Porcentaje de radicación según distintos tratamientos hormonales	62
10	Efecto de diferentes tratamientos hormonales sobre la longitud de raíces (cm) en <i>Prunus avium</i> L. var. Lambert <i>in vitro</i>	63

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA		PÁGINA
2	Porcentaje de contaminación según tratamientos con hipoclorito de sodio	50
2	Efecto de diferentes tratamientos hormonales sobre la variable número de brotes	54
3	Porcentaje de vitrificación durante la etapa de brotación según los distintos tratamientos hormonales	55
4	Efecto de diferentes tratamientos hormonales sobre la variable largo del brote	58
5	Porcentaje de vitrificación durante la etapa de elongación de explantes según tratamientos hormonales y avance de días	59
6	Efecto de diferentes tratamientos hormonales sobre la variable número de raíces	61
7	Porcentaje de radicación según distintos tratamientos hormonales	62
8	Efecto de diferentes tratamientos hormonales sobre la variable longitud de raíces	64

I INTRODUCCIÓN

El cerezo es considerado un frutal rústico sin grandes exigencias climáticas y agronómicas cuyo consumo es un mercado global en expansión en el que Chile se caracteriza por su pequeño tamaño (1 a 2 % de la producción mundial) y por ser el principal exportador de contraestación de los grandes centros compradores, exportando actualmente a más de 40 países.

La superficie nacional plantada con huerto de cerezo ha ido incrementando en los últimos años en un 70% debido a las buenas perspectivas económicas que presenta. Es así como en 1997 según el VI Censo Agropecuario, la superficie plantada llegaba a 4.830 há, concentrándose principalmente entre la VI y VIII Región (90% de las plantaciones) representadas principalmente por pequeños productores con promedio regional de 1 há por propietario.

El impulso de las exportaciones y los aumentos de las exigencias en el mercado interno, implican entregar productos de excelente calidad. Ello origina la necesidad de optimizar procesos de producción con tecnologías de alto nivel, que permitan resolver problemas concretos de propagación y saneamientos de plantas. La biotecnología provee herramientas para enfrentar dicha problemática, siendo el cultivo *in vitro* a través de micropropagación y regeneración vegetal una de las de mayor desarrollo en la actualidad.

La micropropagación es una técnica que viene realizándose masivamente desde la década de los setenta y que en los últimos años se ha convertido en un método práctico y rentable, con el cual se está dando un paso para el

establecimiento del programa de certificación de plantas y semillas frutales tan necesario para nuestra fruticultura.

Por ser el cerezo una especie arbórea de fruto de relevancia nacional, se estudia a través de métodos de mejoramiento clásico su largo período de improductividad y la autoincompatibilidad. La aplicación de biotecnología resulta indispensable para el mejoramiento de la especie, en cuanto a que concierne la introducción de nuevos caracteres ya seleccionados.

En cerezo dulce, por ejemplo, el control del vigor es de gran importancia, ya que este permite la reducción del costo del cultivo al facilitar el manejo agronómico del huerto particularmente al disminuir el costo durante la recolección, es por esto que es necesario corregir el hábito vegetativo de la planta a través del cultivo *in vitro*.

En base a lo antes expuesto, el principal objetivo de la presente investigación es lograr el establecimiento de protocolos para la regeneración de cerezo dulce, evaluando la respuesta a diferentes tratamientos durante las diversas etapas de desarrollo de los explantes.

Los tratamientos específicos a evaluar en la investigación son los siguientes :

- Determinación de la concentración de hipoclorito de sodio para evitar la contaminación en la etapa de establecimiento de explantes.
- Determinación de la concentración de PVP (Polyvinilpolypyrrolidona) para evitar oxidación en la etapa de establecimiento de explantes.

- Determinación de la concentración e interacción de citoquininas, giberelinas y auxinas para la etapa de proliferación de explantes.
- Determinación de la incidencia de las citoquininas en la aparición de vitrificación para la etapa de proliferación de explantes.
- Determinación de la concentración e interacción de citoquininas, giberelinas y auxinas para la etapa de elongación de explantes.
- Determinación de la incidencia de las citoquininas en la aparición de vitrificación para la etapa de elongación de explantes.
- Determinación de la concentración e interacción de auxinas y citoquininas para la etapa de radicación de explantes.
- Determinación de la concentración e interacción de auxinas y citoquininas para la etapa de elongación de la raíz.

II REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

9.1 Antecedentes de cultivo *in vitro* en cerezo.

2.1.1 Importancia y utilización

El cultivo *in vitro* en cerezo, además de constituir un instrumento de propagación masal del cultivar o portainjerto, es empleado en el programa de mejoramiento genético tradicional, por ejemplo en la selección precoz para la constitución de plantas transgénicas, en cuyo caso es necesario obtener regeneración de brotes del tejido transformado y en el cultivo de embriones en variedades tempranas que presentan una corta vida de los embriones. (PIAGNANI *et al.*, 1996).

A fin de evaluar protocolos de regeneración, es indispensable para la sucesiva fase de transferencia genética, que el tejido somático de los cultivares en estudio sean sometidos a diversas condiciones de cultivo *in vitro*, donde posteriormente se efectúa un estudio histológico para identificar el tipo de regeneración en el tejido investigado (NEGRI *et al.*, 1996).

El cerezo es una especie que puede traer ventajas al utilizar transferencia de genes en cuanto a reducción del tamaño de la planta enfatizando la experimentación en todo el mundo sobre su tradicional sistema de control del vigor a través del portainjerto enanizante. Sin embargo esto no es suficiente, ya que no se resuelve completamente el problema pues en algunos casos se necesita de la confirmación del ambiente de cultivo (NEGRI *et al.*, 1998).

En Italia, por ejemplo, la partida del proyecto nacional de investigación sobre cerezo no existiendo antecedentes de transformación genética de tejido somático de origen no embrional y tampoco de drupáceas y aún con información bibliográfica relativa en base al cultivo *in vitro* (de micropropagación y regeneración), no fue fructífera. En consideración a esto la transformación genética del cerezo se afronta en tres fases que son la elección del cultivar y portainjerto a utilizar en transgénesis, puesta a punto de protocolos de regeneración (para las variedades de interés) y transferencia génica (NEGRI *et al.*, 1998).

9.1.0 Variedades, material vegetal y tipo de regeneración utilizadas en cerezo.

NEGRI *et al.* (1998), utilizaron para transgénesis y establecimiento de protocolos los genotipos de cerezo Burlat C1; Colt; VG1 y las variedades de *P. avium*, Vittoria y Hedelfinger. Para lo cual se definieron las características por las cuales se eligieron los siguientes genotipos:

- Burlat C1: No presenta particular dificultad de estabilización al cultivarlo *in vitro*.
- Colt : Híbrido semivigoroso, pero sin buena aptitud para la morfogénesis.
- *Prunus avium* : posee buenas perspectivas de regeneración en las cultivares Vittoria y Hedelfinger.
- VG1 : cerezo de leño para primera investigación sobre este genotipo que no se acostumbra elegir.

Se efectuó para los genotipos Colt, Vittoria y VG1, regeneración indirecta de entrenudos. Para todo efecto, después de una primera fase de proliferación del callo durante 1-2 meses atravesando diversos subcultivos, existió progresiva diferenciación de yemas adventicias generalmente de la región embrionaria del callo. Luego se procedió a la transferencia a un medio de elongación de los genotipos Colt y Vittoria para evitar su deterioro (NEGRI *et al.*, 1998).

GUTIERREZ *et al* (1998), utilizó brotes desde raíces transgénicas de cerezo (variedad Mazzard F12/1) utilizando regeneración a través de *Agrobacterium rhizogenes* y no todas las raíces transgénicas fueron capaces de crecer en un medio libre de hormonas, y *Agrobacterium* no diferenció ningún brote o embrión en raíces Mazzard F12/1.

HAMMATT y GRANT (1998), para regeneración de brotes desde hojas de *Prunus avium* L. extrajeron hojas desde brotes cultivados de *P. avium* cv. F12/1, Charger, y genotipo 1908 y de dos híbridos de *P. avium* x *P. sargentii*.

En una prueba de propagación y organogénesis *in vitro* de *Prunus avium* L. PIAGNANI *et al.* (1996), utilizaron el cv. Hedelfinger y la radicación del 100% de los brotes se ocasionó después de 15 días del tratamiento. En cualquier caso se obtiene regeneración de brotes (embriogénesis de callo) con TDZ. La regeneración de este cultivar se obtiene en 9-10 meses aprox.

NEGRI *et al.* (1996), realizaron regeneración *in vitro* de tejido somático de cerezo, para lo cual se realizaron dos experimentos utilizando los cv Vittoria y Colt.

Exp 1 : Después de 4 semanas en oscuridad de los explantes Colt y pecíolos de Vittoria se observa una notable cantidad de callo. La hoja y el

entrenado de Vittoria experimentó mayor capacidad de producción de callo, aunque después de 2 semanas evidenció necrosis. En el segundo periodo de incubación en oscuridad (22° semana de cultivo) la diferenciación ocurrió en todos los callos del entrenado. En la transferencia al medio de mantenimiento la yema originada por regeneración indirecta produjo regeneración directa, caracterizada por una elevada eficiencia.

Exp 2 : Se utilizó entrenado etiolado de la var. Colt, el medio produjo la formación de callo del 100% de los explantes. El primer fenómeno de diferenciación produjo el 12,5% de callo a los 8 meses de cultivo. Al disminuir la frecuencia de subcultivos, es posible obtener la planta completa desde el brote sin necesidad de la utilización de medio líquido.

En un experimento preliminar de cultivo *in vitro* en regeneración de *Prunus avium* L., BLANDO *et al.* (1996), utilizaron los cvs. Giorgia, Ferrovia y Bigarreau Moreau. La prueba efectuada en diversos medios y combinaciones hormonales para la multiplicación de brotes *in vitro* de los cv de cerezo determinó una buena proliferación de explantes. Para el cv. Giorgia, al variar la concentración de TDZ dio respuestas diversas según el tipo de explante, así, la hoja no presentó regeneración, mientras que el pecíolo obtuvo una alta regeneración.

2.2 Cultivo de tejidos *in vitro*

2.2.1 Definición y aspectos generales

in vitro significa, sencillamente, “en vidrio”, porque durante las primeras etapas del proceso las plantas crecen en tubos de ensayo y matraces. Esta técnica se basa en la “totipotencialidad celular”, esto es, la capacidad de una célula vegetal de formar una planta completa, bajo ciertas condiciones, dadas en

el cultivo *in vitro*. Así se logra la propagación rápida y masiva de plantas idénticas a la original, a partir de cualquier parte de la planta, ya sea trozos de tejidos, ápices meristemáticos o incluso células aisladas. (REYES y HEWSTONE, 1994).

Según JORDAN y GOREAUX (1990), se realiza en condiciones de asepsia, empleando medios nutritivos artificiales que simulan las condiciones existentes en el medio ambiente celular de la planta madre.

En especies que responden rápidamente bajo estas condiciones, es posible obtener millones de copias de una misma planta (clones) en el curso de un par de años bajo condiciones de laboratorio (JORDAN y GOREAUX, 1990).

Existen diferentes tipos de cultivos *in vitro*, dependiendo de los objetivos perseguidos. Las variaciones están sujetas a las condiciones de cultivo y a los explantes (células, tejidos, meristemas, órganos, etc.) inicialmente utilizados, dándose una amplia gama de eventos y posibilidades de uso de técnicas. (SEEMANN y BARRIGA, 1993; REYES y HEWSTONE, 1994).

Actualmente se reconoce los siguientes usos en relación a la aplicación de técnicas de cultivo de tejidos:

- a) mejoramiento genético
- b) obtención de material vegetal sano (libre de virus y otros patógenos)
- c) conservación de germoplasma
- d) micropropagación. (SEEMANN y BARRIGA, 1993)

2.2.2 Equipo de laboratorio

En la sala de siembra, el equipo principal son las cámaras de flujo laminar, normalmente de flujo horizontal, que permiten al operador trabajar en un flujo de aire estéril, lo que asegura la asepsia del material vegetal previamente desinfectado. Estos equipos están dotados de un doble sistema de filtros: un filtro grueso que, al absorber el aire de la sala, filtra el polvo y demás partículas gruesas, y otro fino para filtrar partículas menores como microorganismos (SEEMANN y BARRIGA, 1993).

Dentro del equipo el mechero es utilizado para desinfectar el instrumental utilizado en la cámara de flujo, la autoclave para esterilización de materiales y finalmente la cámara de almacenamiento para mantención de las plántulas a temperatura, luz y humedad controlada. Otra indumentaria necesaria corresponden al pHímetro, necesario para medición de pH del medio a utilizar (ELLENA, 1998)

2.2.3 Desinfección y esterilización.

Es importante iniciar el cultivo en una condición de total asepsia (HUDSON y DALE, 1968), lo cual implica realizar tratamientos para eliminar de su superficie microorganismos (MARGARA, 1988). Además el lugar de trabajo y los materiales deben cumplir con esta condición (AUGE *et al.*, 1984).

La desinfección del material vegetal contaminado por bacterias y hongos del suelo, además de saprófitos es siempre difícil y aleatorio (MARGARA, 1988).

El hipoclorito de sodio es un esterilizante muy recurrido en los trabajos de cultivo *in vitro*. FRAZIER (1981), dice que es un poderoso agente antioxidante y potente germicida de contacto, aunque su efectividad se reduce notablemente

en presencia de materia orgánica abundante; los microorganismos son atacados por oxidación o por cloración directa de sus proteínas celulares.

Según DE PAOLI *et al.* (1994), en cerezo, se debe utilizar una solución de hipoclorito de sodio de 1 – 3 % y sumergir el explante por tres minutos, además señala la utilización de agua destilada para enjuague realizando tres lavados.

En cuanto a desinfección previa en regeneración del cerezo, NEGRI *et al.* (1996), mencionan la utilización de una solución hidroalcohólica al 16%.

Por otra parte, GEORGE y SHERRINGTON (1984), señalan que es posible que se produzcan infecciones internas que pueden constituir un problema importante como ha sido descrito también por TOLEDO (1991). Estas son causadas por microorganismos que se encuentran presentes en el interior de la planta, y no pueden ser eliminados por esterilización externa. Frente a este problema, GEORGE y SHERRINGTON (1984) plantean dos soluciones:

a) Cultivo de meristemas

b) Adición de antibióticos al medio.

Este último, generalmente conduce a fenómenos fitotoxicológicos, por las altas concentraciones necesarias de este producto, inhibiendo su crecimiento y desarrollo además de conducir a la selección de microorganismos resistentes.

La esterilización del material a utilizar se realiza a través de tres formas posibles como son el autoclavado (a presión con vapor en un tiempo y temperatura determinados), irradiación y filtración (PIEERIK, 1987).

La asepsia del tejido que se usará en micropropagación debiera comenzar antes de la extracción de los explantes, manteniendo una óptima sanidad de la planta madre. Esto se logra mediante un adecuado programa de aplicación de fungicidas y bactericidas, de modo de reducir drásticamente la carga de organismos contaminantes tanto exógenos como endógenos. En materiales provenientes del campo, cultivos agrícolas o plantas forestales, este tratamiento a menudo no es factible de aplicar en forma tan intensiva como en plantas madres cultivadas en invernadero, por lo que las tasas de contaminación, a pesar de los esfuerzos de esterilización, normalmente va a ser más altas (SEEMANN y BARRIGA, 1993).

El material vegetal extraído de la planta madre debe ser lavado en agua corriente para eliminar todo resto de polvo y contaminantes más gruesos. A continuación es conveniente usar agua destilada con unas gotas de un detergente o producto tensoactivo como Tween 20 u 80 o Teepol. En otros casos se utiliza una solución de etanol al 70% (SEEMANN y BARRIGA, 1993).

Al probar diferentes desinfectantes y secuencias de tratamientos de desinfección de explantes apicales y axilares, se determinó que la aparición de agentes contaminantes es efectivamente reducida por el tratamiento con HgCl₂ al 0,02% por 5 minutos y el tratamiento con etanol 70% durante un minuto, seguido por la inmersión de los explantes en 5% de hipoclorito de sodio durante 15 minutos (REBOLLEDO, 1987).

2.2.4 Factores limitantes

Según SEEMANN y BARRIGA (1993) tanto el establecimiento de cultivos *in vitro* como su posterior propagación clonal en la práctica están afectados por problemas que reducen drásticamente las posibilidades de éxito.

2.2.4.1 Oxidación de especies leñosas. Según MARGARA (1988), la luz y la especie son factores determinantes en la oxidación de especies en cultivo *in vitro*. Además de la luz y la especie, existen otros factores que son condicionantes para que se produzca oxidación.

GAMBORG *et al.* (1976) señalan que el amonio, en concentraciones sobre 8 meq/lit, puede ser tóxico, ya que consideran a la oxidación como uno de los síntomas de toxicidad producida por algunos iones, entre ellos el amonio.

Por su parte MARGARA (1986), atribuye a la elevada relación amonio/nitrógeno y a la elevada concentración de amonio y potasio presente en el medio MS, el fracaso de su utilización en muchas especies.

El pardeamiento de los explantes es un problema que se presenta con mayor frecuencia en explantes de especies leñosas y se relaciona con la liberación al medio y oxidación de polifenoles, que dan como resultado productos tóxicos para el explante (SEEMANN y BARRIGA, 1993)

Tanto los explantes como el medio de cultivo de algunas especies, sobre todo leñosas, una vez puestas en cultivo *in vitro*, tienen la tendencia a manifestar un pardeamiento que, en forma extrema, lleva a la muerte de los explantes. Este pardeamiento se produce por acción de enzimas oxidasas que contienen cobre, como las polifenoloxidasas y las tirosinasas, que se liberan al herirse los tejidos. La inhibición del crecimiento de los explantes, por otro lado, ocurre por la oxidación de los fenoles y la consecuente formación de compuestos quinónicos, altamente activos (SEEMANN y BARRIGA, 1993)

Según SEEMANN y BARRIGA (1993), la prevención de pardeamiento de los explantes y el medio puede manejarse mediante:

- a) la remoción de compuestos fenólicos producidos.
- b) La modificación del potencial redox del medio de cultivo
- c) La inactivación de enzimas fenolasas
- d) La reducción de la actividad fenolásica

Se puede remover los compuestos fenólicos liberados al medio, aplicando algunas de las siguientes medidas: lavado de explantes por 2 a 24 horas antes de su siembra; cambio de medios de cultivo con mucha frecuencia; uso de medios líquidos en una primera fase para dilución de los fenoles, seguido del uso de medios sólidos, etc.; absorción de fenoles mediante carbón activado (3-5 g/L) o polyvinilpolipirrolidona (PVP) de alto peso molecular en concentración de 0,5-2,0%. Estas medidas son esenciales para la sobrevivencia de los explantes durante las primeras 4 a 8 semanas de cultivo. La reducción del potencial redox del medio de cultivo como medida de control de oxidación de fenoles se puede lograr mediante la incorporación al medio de cultivo de alguno de los siguientes compuestos: Glutation reducido (200 mg/L), Feniltiourea (15-20 mg/L) o L-cisteína (10-50 mg/L) y/o disectando el material vegetal en agua destilada estéril, en agua de coco o cultivando en medio líquido estacionario durante unos días, con ello se logra reducir la disponibilidad de oxígeno y por lo tanto la oxidación de los fenoles. Otra técnicas muy utilizada consiste en el uso de sustancias antioxidantes con las cuales se tratan los explantes, entre ellas se ha utilizado una mezcla de ácido cítrico (150 mg/L) más ácido ascórbico (100-150 mg/L). La inactivación de las enzimas fenolásicas se puede lograr mediante el uso de sustancias quelantes (FeNa EDTA) en mayores concentraciones que las adicionales normales de los medios de cultivo, mediante el uso de Tirosina más Cobre o bien incorporando al medio Dietilditiocarbamato (DIECA) o

Dimetildiocarbamato de Sodio (10-250 mg/L). La reducción de la actividad fenolásica se puede lograr disminuyendo el pH del medio durante la etapa inicial de cultivo. Otra forma de disminuir la oxidación de fenoles consiste en cultivar inicialmente en ausencia de luz, por períodos de hasta 4 semanas (SEEMANN y BARRIGA, 1993; DE PAOLI *et al.*, 1994).

2.2.4.2. Contaminación. La contaminación de los explantes se puede presentar en forma exógena por deficiente esterilización del material vegetal o en forma endógena cuando se trata de contaminantes sistémicos difíciles de controlar (SEEMANN y BARRIGA, 1993)

Según SEEMANN y BARRIGA (1993), en el curso del crecimiento de las plantas, hay muchos microorganismos de la superficie o de la rizósfera que pueden colonizar la planta a través de aberturas naturales, heridas, etc., adicionalmente hay patógenos facultativos y obligados que pueden colonizarla, o penetrarla vía vectores o mediante plantas hospederas. Por las razones indicadas, el micropropagador, para evitar pérdidas económicas importantes o problemas de alargamiento del tiempo de cultivo por contaminación, debiera aplicar una serie de normas de control de calidad fitopatológica relacionadas con:

- a) Conocimiento del rango y ciclo de posibles contaminantes del cultivo
- b) Preparación adecuada de la planta madre incluyendo tratamientos de eliminación de esos patógenos.
- c) Confirmación de la sanidad de los cultivos del Estado I basado en sistemas adecuados de esterilización de explantes y selección de propágulos sanos.

d) Observación permanente de la presencia de posibles contaminantes de la planta, del laboratorio o de los operadores.

e) Monitoreo de posibles contaminantes endofíticos latentes bajo el nivel de detección que pueden manifestarse al presentarse condiciones de incubación adecuadas.

2.2.4.3 Vitrificación. La vitrificación es un problema que se presenta en ciertas especies herbáceas y leñosas, y se relaciona con problemas fisiológicos que dan como resultado el desarrollo de tejidos vítreos, translúcidos de difícil sobrevivencia al trasplante (SEEMANN y BARRIGA, 1993; DE PAOLI *et al.*, 1994).

Es un desorden fisiológico que se presenta en ciertas especies herbáceas y algunas leñosas, caracterizado por el desarrollo de tejidos translúcidos, hiperhidratados y suculentos, producto de condiciones poco adecuadas de cultivo. El fenómeno que se manifiesta principalmente en las hojas, afecta a los procesos de fotosíntesis e intercambio gaseoso. Los brotes y raíces también pueden manifestar una anatomía anormal y por lo tanto impedir el establecimiento de plantas micropropagadas *extra vitrum*. La responsabilidad de estos desórdenes fisiológicos puede atribuirse a un exceso de humedad, especialmente en cultivos de medio líquido, un exceso de factores nutricionales, altos niveles de reguladores de crecimiento y baja intensidad luminosa. Los factores clave de la vitrificación parecen ser la humedad relativa y el potencial hídrico dentro del matraz de cultivo (SEEMANN y BARRIGA, 1993; DE PAOLI *et al.*, 1994).

Según los mismos autores, el problema puede ser disminuido en la práctica mediante las siguientes medidas de manejo:

- a) incrementando la concentración de agar y/o de sacarosa en el medio de cultivo o reemplazando parcialmente el uso de gelrite por agar.
- b) Mejorando el intercambio gaseoso en el matraz de cultivo por medio del uso de diferentes sistemas de cubierta de estos.
- c) Regulando los niveles de citoquinina. Altas concentraciones de éstas a menudo incrementan el problema.
- d) Aumentando la intensidad luminosa, especialmente en cultivos más exigentes (clavel, espárrago, ajo, alcachofa).
- e) Cambiando el medio de cultivo por otro de diferente composición o reduciendo la concentración de éste.

Se ha descrito principalmente en los géneros *Malus* y *Prunus* (PIEERIK, 1987).

2.2.4.4 Especies recalcitrantes. Corresponden a especies que no responden o presentan una pobre reacción al cultivo *in vitro* (HUSSEY, 1980). Aunque no existe alguna razón obvia, para pensar que algún proceso del cultivo ocasionen esta reacción.

2.3 Micropropagación

La micropropagación consiste en cultivar segmentos apicales y nodales con su yema axilar en un medio nutritivo estéril (VILLEGAS *et al.*, 1988).

Esta técnica tiene por objeto producir un gran número de plantas, en un periodo relativamente corto, produciendo plantas uniformes (THORPE y MURASHIGE, 1968).

Además, la micropropagación es especialmente ventajosa para plantas que necesitan ser limpiadas de patógenos, seleccionadas o introducidas recientemente como variedades que se requieren multiplicar (HUANG *et al.*, 1988; REYES y HEWSTONE, 1994).

Normalmente, se utilizan microestacas que contienen tanto yemas apicales como axilares, de ellas se desarrollan brotes que posteriormente son enraizados con fitohormonas exógenas si no hay inducción conjunta de raíces (REYES y HEWSTONE, 1994).

2.3.1 Ventajas

Sin lugar a dudas, el uso de esta técnica, según SEEMANN Y BARRIGA (1993), se justifica por la serie de ventajas que presenta:

- a) Obtención uniforme de planta en forma masiva.
- b) Proceso rápido (desde estacilla a planta).
- c) Realización ininterrumpida durante todo el año.

d) Eliminación de labores de campo frente al proceso de propagación tradicional.

e) Economía de espacio

f) Control de condiciones ambientales.

g) Obtención de plantas libres de virus a partir del tratamiento de termoterapia (mayor control sobre el estado sanitario del material vegetal).

h) Mejoramiento del enraizado en plantas difíciles de propagar.

i) Facilidad de transporte del material propagado *in vitro*.

J) Posibilidad de propagar por vía vegetativa especial y en variedades difíciles de multiplicar.

2.3.2 Desventajas

a) Variación genética respecto a la planta madre producida por la elevada tasa de proliferación y la rápida multiplicación (ELLENA, 1998).

b) No se puede usar en especies recalcitrantes (DE PAOLI *et al.*, 1994).

c) Alto costo inicial (GEORGE y SHERRINGTON, 1984).

d) Utilización de personal especializado (GEORGE Y SHERRINGTON, 1984).

2.3.3 Medios de cultivo y sus componentes

La micropropagación de especies vegetales exige el uso de medios de cultivo más o menos complejos que están compuestos por macro y micronutrientes, aminoácidos y vitaminas, fitohormonas, compuestos orgánicos complejos, carbohidratos y eventualmente un gelificante. Los medios usados más frecuentemente para promover la organogénesis son los de MURASHIGE *et al.* (1962), WHITE (1963), citados por ROCA y MROGNISKI (1991).

NEGRI *et al.* (1996), utilizaron para regeneración en cerezo medio MB; BLANDO *et al.* (1996), utilizaron los medios MS y LP, este último con menores resultados y HAMMATT y GRANT (1998), utilizaron los medios WPM y DK, también este último con menores resultados.

DEL SOLAR (1985), señala que las plantas que se desarrollan bien se pasan luego a un medio de proliferación, compuesto por:

- ✂ Agar (medio inerte para solidificar).
- ✂ Solución mineral.
- ✂ Solución de vitaminas (Tiamina, Piridoxina, Mioinositol, reforzada en algunos casos con otras vitaminas).
- ✂ Aminoácidos (Glicina).
- ✂ Fitohormonas (auxinas, citoquininas y giberelinas)

Con anterioridad, MURASHIGE (1974), había señalado que el medio líquido facilita la libre difusión de las sustancias tóxicas liberadas.

2.3.3.1 Agentes solidificantes. El agente solidificante más utilizado es el agar en polvo purificado, en una concentración de 0,5% al 1% (HARTMAN y KESTER, 1983). El agar presenta varias ventajas, según TORRES (1988), sobre los otros agentes gelificantes. Concentración de agar desde 0,5 a 2% disminuye la pérdida de humedad de los tejidos más viejos (vitrificación), pero al mismo tiempo reduce el crecimiento de los brotes y enraizamiento potencial (VON ARNOLD y FRIKSSON, 1984, citados por ROCA y MROGNISKI, 1991)

Según PIEERIK (1987), la concentración usual para el agar es de 0,6 a 0,8%. Si se utiliza una concentración más baja (0,4%), el medio permanece sin cuajar, sobretodo cuando el pH es bajo. Si la concentración es muy alta (1,0%), el medio nutritivo queda muy sólido, haciendo difícil la inoculación. Si se usa una concentración del 0,6%, y el medio no adquiere rigidez, debe corregirse el pH; si éste es más bajo que 4,5 –4,8, un medio con 0,6% de agar, no gelifica.

NEGRI, *et al.* (1998), concluyeron que el genotipo Vittoria de cerezo, respondía mejor a un medio líquido, mientras que Colt lo hacía mejor en medio sólido y con menos subcultivos (utilizando organogénesis via callo).

2.3.3.2 Constituyentes minerales. Los medios de cultivo deben contener todos aquellos elementos considerados esenciales para el desarrollo de las plantas, sean macro o microelementos. Los macroelementos, son constituyentes esenciales de los tejidos vegetales e intervienen en la conservación del equilibrio iónico en las plantas. Los microelementos tiene un papel importante en los mecanismos enzimáticos, como activadores o constituyentes de las coenzimas (BENGOA, 1990).

El medio desarrollado por MURASHIGE y SKOOG (1962) se considera como un medio rico en nitrógeno amoniacal y potasio, que contiene cerca de 4 veces más nitrato que otros medios.

PIAGNANI *et al.* (1996), utilizaron en cerezo el medio MS/2 obteniendo buenos resultados.

Por otra parte, la reducción a la mitad de la concentración de sales nitrogenadas en el medio de cultivo de Linsmaier y Skoog incrementa el crecimiento *in vitro* de explantes de *Prunus avium* F12/1 (REBOLLEDO, 1987).

La combinación del preacondicionamiento nitrogenado (2%) y sales nitrogenadas *in vitro* (20 mMol NO₃⁻), producen el mejor crecimiento de los explantes de *Prunus avium* F12/l. (REBOLLEDO, 1987).

Los meristemas y, en forma general, los tejidos con actividad metabólica elevada, pueden presentar importantes necesidades en potasio (MARGARA, 1988).

2.3.3.3 Fuente de carbohidratos y energía. Se ha comprobado que la ausencia de azúcares se convierte en un factor limitante en la organogénesis de los tejidos, presentando una acción metabólica y energética (MARGARA, 1986).

Entre otros, los compuestos orgánicos comúnmente usados, se incluye la sacarosa. La glucosa ha sido superior a la sacarosa sólo ocasionalmente (MURASHIGE, 1974).

PIAGNANI *et al.* (1996), utilizaron exitosamente una concentración de sacarosa de 20 g/L en proliferación de cerezo.

La sacarosa es generalmente la fuente carbonada que se usa en los estudios de organogénesis, aunque en algunas circunstancias se ha sustituido por glucosa o fructosa. La sacarosa puede asimismo estimular la formación de callos (TAKAYAMA *et al.*, 1979 citados por ROCA y MROGNISKI, 1991).

2.3.3.4 Biorreguladores. Entre las citoquininas sintéticas se incluye la kinetina, N6-bencilaminopurina (BAP) y N6 –isopenteniladenina (2ip). Las auxinas comúnmente utilizadas para proliferación axilar y adventicia, comprenden al ácido indol – 3 –acético (IAA), ácido indol-3-butírico (IBA), ácido naftalenacético (NAA) y 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) (MURASHIGE, 1974; MARGARA, 1986).

Las principales acciones que presentan las citoquininas son un efecto muy marcado sobre la división celular, inducen la organogénesis estimulando fuertemente la formación de yemas, son antagonistas de la rizogénesis, estimulan el metabolismo favoreciendo la síntesis proteica y, finalmente, presentan un efecto antagonista de la dominancia apical (PARRAGUEZ, 1991).

SNIR (1982), utilizó en cerezo IBA (1 mg/L) y BAP (1 mg/L) para proliferación, mientras que PIAGNANI *et al.* (1996), utilizaron BAP en concentraciones de 2,5-10 μ M.

El papel de los reguladores de crecimiento en la organogénesis se ha estudiado intensamente. Usualmente se induce la formación de callos a partir de explantes en medios que contengan auxina (s) o una proporción alta de auxina : citoquinina (ROCA y MROGNISKI, 1991).

Resulta un fenómeno general que la iniciación de brotes está mediada por la interacción entre auxinas y citoquininas (AUGE *et al.*, 1984), pero es variable

según la especie, determinando concentraciones hormonales diferentes para cada una de ellas. Es así como HUSSEY (1980), señala que en explantes de órganos, la formación de meristemas adventicios se da con la estimulación de la división celular por auxinas o citoquininas, o, las dos juntas; éstas divisiones pueden dar origen a estructuras meristemáticas, ya sea por organogénesis directa o vía callogénesis, según las hormonas usadas y sus concentraciones.

El AIA se utiliza con frecuencia en estudios fisiológicos, ya que es un compuesto natural con gran capacidad de organogénesis, pero es sensible a temperatura, luz y pH. Por lo mismo análogos sintéticos más estables y poderosos, tales como IBA y ANA, son comúnmente más usados (LITZ, 1988). El 2,4-D, compuesto altamente activo, es la auxina sintética más efectiva para promover callogénesis.

Las giberelinas también pueden tener un papel importante en la organogénesis; aunque generalmente inhiben la diferenciación, algunas veces estimulan la formación de yemas. El efecto inhibitorio de la giberelinas en la diferenciación se puede anular parcialmente adicionando ácido abscísico al medio. En presencia de los precursores del AIA (triptófano desaminado oxidativamente), el ácido giberélico puede inducir la formación de raíces adventicias a partir de discos de hojas cultivados *in vitro*, probablemente debido al estímulo biosintético del AIA. Compuestos como giberelinas y ácido abscísico pueden tener un papel en el proceso organogénico, sin embargo, en varias especies estos reguladores de crecimiento juegan un papel represivo o no tienen efectos en la formación de órganos *in vitro* (MURASHIGE, 1964; JARRET, 1981; THORPE, 1973; COLEMAN 1977; THORPE, 1980; THORPE y PATEL, 1984, citados por ROCA y MROGNISKI, 1991).

Según ELLENA (1998), la formación de brotes es promovida por niveles altos de citoquininas en relación a las auxinas, mientras las relaciones inversas favorecen el desarrollo de raíces.

MARGARA (1988), precisa aún más la anterior aseveración indicando que en una débil concentración (10^{-6} a 10^{-10} M), las citoquininas se utilizan frecuentemente para estimular la proliferación de los tejidos en cultivo. A concentraciones más elevadas (10^{-5} M), se emplean ampliamente para desencadenar la neoformación de yemas sobre callos.

La acción de las auxinas depende de su concentración y de sus interacciones con los otros reguladores. En diversos estudios se ha visto que presentan una estimulación de la división celular, lo que conduce a la formación de "callo", y por último posee una acción rizogénica neta (AUGE *et al.*, 1984).

Después de las primeras observaciones sobre formación de raíces adventicias y de raíces principales en cultivos de tejidos, demostró el efecto estimulante de las auxinas en la formación de raíces y su efecto inhibitor en la formación de yemas. El estímulo en la formación de raíces adventicias se puede cambiar usando concentraciones altas de sacarosa o de fosfatos inorgánicos en el medio (WHITE, 1939; NOBECOURT, 1939 y SKOOG, 1944, citados por ROCA y MROGNISKI, 1991).

SNIR (1982) utilizó NAA en dosis de 0,5 mg/L para regeneración de cerezo; BLANDO *et al.* (1996), realizaron su experimento en cerezo con las hormonas BA, IBA y GA_3 (probaron también TDZ, NAA y 2,4D en oscuridad); NEGRI *et al.* (1996), utilizaron BAP ($22,2 \mu\text{M}$), AIA ($11,4 \mu\text{M}$) y GA_3 ; PIAGNANI *et al.* (1996) en tanto, utilizaron IBA (100 ppm) y 2,4D (callo y radicación), además de NAA

sin obtener con este último buenos resultados y finalmente HAMMATT y GRANT (1998), obtuvieron éxito utilizando BA + TDZ.

2.3.3.5 Vitaminas y aminoácidos. Cuando las células de las plantas superiores crecen en cultivo, algunas vitaminas pueden llegar a ser limitantes. La tiamina es crítica y generalmente se usa en un rango de 0,1 – 0,4 mg/L. El inositol no es esencial, no obstante, se ha usado a una tasa de 100 mg/L. El ácido ascórbico se usa en combinación con ácido cítrico para evitar oxidación de los explantes (MURASHIGE, 1974).

El mismo autor señala que algunos aminoácidos como arginina, ácido aspártico, ácido glutámico y tirosina, pueden ser ventajosos en el medio de multiplicación de órganos.

MARGARA (1988), generalmente acepta únicamente la tiamina entre 0,1 y 5 mg/L, pues es esencial para el crecimiento continuo (MURASHIGE, 1974). El inositol, puede ser un componente esencial para el crecimiento y la diferenciación de los callos (WOLTER *et al.*, 1966 y KAUL *et al.*, 1975, citados por ROCA y MROGNISKI, 1991). Activa la organogénesis en cantidades de 50 – 500 ml/L (HUDSON y DALE, 1968). En cantidades pequeñas, la adición de ácido paraminobenzoico, ácido fólico, cloruro de clorocolina (aunque según THORPE (1981), la considera inefectiva), riboflavina o ácido ascórbico puede estimular el crecimiento (GAMBORG *et al.*, 1976). Asimismo, a veces se han señalado efectos favorables del ácido Nicotinic y Piridoxina sobre el crecimiento de los cultivos (MARGARA, 1988).

Las vitaminas son requeridas como catalizadores en varios procesos metabólicos (TORRES, 1988).

PIAGNANI *et al.* (1996), para proliferación de cerezo utilizaron las vitaminas en concentraciones similares a las del medio N&N.

2.3.3.6 Otros. La organogénesis puede ser afectada por otros tipos de compuestos en donde se incluyen los fenoles sustituidos y los alcaloides (FRIDBORG *et al.*, 1978 citados por ROCA y MROGNISKI, 1991).

El carbón activado ha sido efectivo para remover del medio los compuestos fenólicos inhibidores (FRIDBORG *et al.*, 1978 citados por ROCA y MROGNISKI, 1991).

2.3.4 Factores físicos.

La organogénesis puede estar afectada por una gran variedad de factores como luz, temperatura, consistencia del medio, y pH.

2.3.4.1 Iluminación. Generalmente la iluminación de las cámaras de cultivo se realiza mediante tubos fluorescentes (MARGARA, 1988).

Tanto la intensidad de la luz, como el fotoperíodo pueden ser críticos para la formación de brotes en algunas especies (HUSSEY, 1980). PIAGNANI *et al.* (1996), recomiendan una intensidad lumínica de 20 $\mu\text{M}/\text{m}^2/\text{s}$ en cerezo.

Cuando las plántulas sean pasadas a la fase de enraizamiento, es recomendable aumentar la intensidad lumínica (AUGE *et al.*, 1984).

El fotoperíodo también puede afectar los niveles internos de los reguladores del crecimiento. Usualmente, un fotoperíodo de 12 a 16 horas con 1000 a 3000 lux es suficiente para inducir la organogénesis; por otra parte, un cambio en la intensidad lumínica puede causar organogénesis, y pueden ocurrir cambios

morfogenéticos específicos debidos a la longitud de onda de la iluminación (HEIDE,1967; HASEGAWA, 1973 citados por ROCA y MROGNISKI, 1991).

Tanto NEGRI *et al.* (1996), como BLANDO *et al.* (1996), concuerdan en un fotoperiodo de 16 hrs para cerezo, con 3-4 semanas de oscuridad (PIAGNANI *et al.*, 1996 y BLANDO *et al.*, 1996)

2.3.4.2 Temperatura. Factor importante de mantener en las cámaras de crecimiento y generalmente varía entre 22 y 25 °C (HUDSON y DALE, 1968 BOHM,1982; MARGARA, 1988)

Los cultivos de tejidos se mantienen generalmente a 25°C (THORPE, 1980); sin embargo, las temperaturas que están dentro de 18 y 28°C son también efectivas. Las fluctuaciones entre las temperaturas del día y de la noche pueden estimular la organogénesis. Los tratamientos previos con temperaturas bajas también son efectivos (ROCA y MROGNISKI, 1991).

En cerezo se han utilizado T° de 23+- 1°C y 25 +- 1 °C (NEGRI *et al.*, 1996 y BLANDO *et al.*, 1996).

LANE (1982), señala que la frecuencia de enraizamiento de *Prunus* aumentó después de la incubación de los brotes de cultivo a 4°C en oscuridad por 7 días.

2.3.4.3 Humedad relativa. Dentro del cuarto de incubación, debiera fluctuar de 70 – 80%. Valores más bajos, a menudo provocan una desecación del medio de cultivo (SEEMANN y BARRIGA, 1993).

2.3.4.4 Acidez del medio (pH). QUAK (1977) señala que el pH es un factor limitante para el crecimiento y desarrollo de explantes y en general se ajusta entre 5,5 y 5,8. Adicionalmente, con pH bajo se pueden producir problemas de inestabilidad de AIA, de giberelinas, vitamina B1 y ácido pantoténico, precipitación de ciertas sales (fosfatos y sales férricas); retardo en la absorción de NH₄ y licuación de medio.

En la mayoría de los casos, el pH de un medio de cultivo tiende a estar entre 5,5 y 6,0. MURASHIGE y SKOOG (1962), reportaron que un pH de 5,7 a 5,8 es adecuado para mantener todas las sales en forma soluble, siempre con niveles relativamente altos de iones fosfato.

En cuanto al control del pH, el tratamiento del medio con autoclave causa una acidificación del medio, la cual es reducida con la adición de agar (SINGHA, 1982 y SARMA, 1989, citados por ROCA y MROGNISKI, 1991).

La mayoría de los elementos son solubles en una cantidad favorable para las plantas en un rango de pH entre 5,5 y 7,5; valores superiores a 7,5 determinan frecuentemente diferencias debido a la precipitación de los nutrientes y con pH bajo 5,5 se presentan problemas de excesiva solubilidad (TRACY, citado por ANDREANI, 1987). Para un crecimiento efectivo el rango ordinario del pH es de 5 a 6 (HARTMAN y KESTER, 1983).

2.3.4.5 Subcultivos. Según DE PAOLI *et al.* (1994), deben realizarse cada 14-16 días (no más de 20 días).

2.4 Estados de desarrollo

Según SEEMANN y BARRIGA (1993), los estados de desarrollo en la micropropagación son :

- Estado 0
 - Selección y preparación de plantas madres
 - Desinfección
 - Nutrición y cultivo adecuado
 - Eliminación de virus
- Estado 1
 - Establecimiento de un cultivo aséptico
 - Selección de explantes
 - Fase inicial de cultivo
 - Obtención de cultivos limpios
 - Inicio del crecimiento (callo o brotes)
- Estado 2
 - Producción de propágulos adecuados
 - Inducción de brotación adventicia
 - Formación de embrioides
- Estado 3
 - Preparación para crecimiento en ambiente natural
 - Producción de plántulas individuales
- Estado 3a
 - Elongación de brotes formados en Estado 2 para ser llevados a Estado ~3b
- Estado 3b
 - Enraizamiento *in vitro* o *extra vitrum* de brotes obtenidos en Estado 3a
- Estado 4
 - Transferencia al ambiente natural
 - Regulación de intensidad lumínica y humedad relativa
 - Formación de ceras epicuticulares
 - Inducción de autotrofia

Finalmente, deben eliminarse todas aquellas plantas que no acepten el cultivo o que su esterilización haya sido deficiente (DEL SOLAR, 1985).

2.4.1 Establecimiento de explantes

2.4.1.1 Elección del material vegetal. El conocimiento de la morfología de las especies usadas es de mucho provecho para identificar los explantes potencialmente morfogenéticos (ROCA y MROGNISKI, 1991).

MURASHIGE (1974) y NARAYANASWANI (1977), citados por ROCA y MROGNISKI (1991) han descrito ciertos factores que deber ser considerados para la manipulación exitosa de la organogénesis. Se incluyen factores relacionados con el explante (su edad fisiológica y ontogénica, su tamaño, el tejido u órgano del que es extraído) así como con el estado fisiológico de la planta madre y con la época del año en que se realiza el cultivo.

La variación en la respuesta de ciertos explantes pertenecientes a la misma especie vegetal puede ser considerable (FLICK *et al.*, 1983; MURASHIGE, 1974, citados por ROCA y MROGNISKI, 1991).

Más aún, puede haber variación en los requerimientos de los reguladores de crecimiento para la organogénesis según el tipo de tejido usado como explante (LITZ, 1988).

La elección del material vegetal se puede realizar mediante el siguiente criterio :

a) Preacondicionamiento de material donante : el acondicionamiento previo de las plantas a explantar, ha sido pobremente estudiado y corresponde al mayor

factor en la sobrevivencia de plantas, utilizando invernaderos equipados con luz adicional para satisfacer los requerimientos de largo del día para el crecimiento vegetativo continuo a lo largo del año (ELENA, 1998).

El preacondicionamiento nitrogenado de las plantas (2-3% de N según análisis foliar), promueve el crecimiento vegetativo *in vitro* de los explantes de *Prunus avium* F12/1 (REBOLLEDO, 1987).

Varias partes de una planta pueden responder diferentemente a idénticas condiciones de cultivo, y tales diferencias reflejan el estado fisiológico de la fuente del explante (TRAN THAN VAN, 1980, citado por ROCA y MROGNISKI, 1991). El estado fisiológico determinará además los factores exógenos que se deben añadir al medio de cultivo, o que deben sustraerse de él , para poder inducir la respuesta morfogenética requerida. Los factores endógenos podrán variar cuantitativamente de acuerdo con las condiciones ambientales, el genotipo, el tipo de célula, y otros aspectos.

El estado de la planta madre y la estación durante la cual el explante es extraído también pueden afectar notablemente el potencial organogénico. Los efectos limitantes de la estación y la calidad de este fenómeno no han sido bien estudiados (MURASHIGE, 1974)

b) Tipo de explante : los tejidos destinados a producir brotes presentan abundancia de gránulos de almidón de variados tamaños. En contraste, los tejidos que no forman órganos, poseen una menor acumulación de almidón (THORPE y MURASHIGE, 1968).

Para JORDAN y GOREAUX (1990), según los propósitos el material vegetal elegido puede ser muy variable. Dada la plasticidad que manifiestan las plantas

puede usarse prácticamente cualquier célula o tejido de ella, entre las cuales menciona:

- Trozo de tallo que incluyan un nudo (segmento nodal);

- Meristemas o ápices caulinares que representan el punto de crecimiento del tallo principal, yemas laterales y ápices radicales (punto de crecimiento de la raíz).

SEEMANN y BARRIGA (1993) menciona que en muchas fuentes de explante como trozos de pecíolo, entrenudos, discos foliares, por ejemplo, se activa el tejido parenquimático para formar callo no diferenciado antes de producirse la organogénesis, este proceso se conoce como organogénesis indirecta. Es factible que algunas células de la masa callosa, por efectos ambientales (composición del medio de cultivo, eventuales radiaciones, etc.) sufran cambios, por lo que la descendencia de esa masa callosa va a ser heterogénea.

DE PAOLI *et al.* (1994) y NEGRI *et al.* (1996), utilizaron para regeneración en cerezo, brotes de hojas, aunque este último además utilizó pecíolos y entrenudos etiolados.

c) Tamaño de explante : el efecto del tamaño del explante ha sido extensamente investigado en diferentes especies herbáceas y leñosas. Este factor juega un importante rol en la probabilidad de eliminar patógenos y en la sobrevivencia del mismo (ELLENA, 1998).

Las yemas terminales son usualmente más largas y ello implica una mayor consistencia en el crecimiento (LANE, 1982). El mismo autor señala que el

rompimiento de la dominancia apical puede producirse por poda de brotes dominantes y la eficiencia en el rompimiento de la dominancia apical, puede aumentarse por disección de brotes de 3 – 4 cm de largo, la remoción de puntas y colocar los brotes, invertidos, en un medio con agar conteniendo benziladenina.

DE PAOLI *et al.* (1994), utilizaron en sus experimentos en cerezo 3-4 cortes menores o iguales a 1,5 cm de largo.

El tamaño de un explante puede determinar la respuesta *in vitro* (OKAZAWA *et al.*, 1967; GUKASYAN *et al.* 1977, citados por ROCA y MROGNISKI, 1991).

Los explantes grandes son más difíciles de esterilizar que los pequeños, pero generalmente los primeros poseen un potencial regenerador considerablemente mayor; la viabilidad y la capacidad regenerativa de explantes muy pequeños tiende a ser baja. Sin embargo, se han usado exitosamente delgadas capas de células como sistemas experimentales, con el fin de estudiar los efectos de factores exógenos y endógenos sobre la morfogénesis cuando no hay influencia de tejidos circundantes (TRAN THAN VAN, 1980, citados por ROCA y MROGNISKI, 1991).

Los explantes pequeños tienden, además, a ser dañados más fácilmente (ALLEWEDT *et al.*, citados por ROCA y MROGNISKI, 1991) .

BLANDO *et al.* (1996), señalan que en cerezo se debe utilizar la yema con 0,5 cm de longitud en hojas y 0,3 cm en pecíolo y entrenudo.

d) Época de explantación : la época del año en que se realiza la explantación y cultivo *in vitro* de brotes o yemas, es un factor de importancia en el éxito de la micropropagación de meristemas ya que plantas stock, mantenidas bajo condiciones ambientales convenientes para un flujo continuo de emisión de nuevos brotes vegetativos, producen una adecuada cantidad de explantes que sobreviven mejor a las condiciones *in vitro*. Explantes obtenidos a partir de plantas en vigoroso crecimiento, llegan a establecer más rápido en medio del cultivo, que aquellos tomados desde yemas en dormancia (LANE, 1982).

DE PAOLI *et al.* (1994), utilizaron material semileñoso (mayo-septiembre), con yema dormida, ápice en activo crecimiento y hojas bien desarrolladas.

BLANDO *et al.* (1996), señalan que en cerezo se debe utilizar la yema al final de dormancia, y, según PIAGNANI *et al.* (1996), la época de extracción del explante correspondería entre abril y septiembre.

e) Localización de las yemas: existen datos que indican un mayor éxito con segmentos apicales que basales (REBOLLEDO, 1987).

SNIR (1982), por su parte, utilizó en cerezo yemas axilares.

A partir de secciones de tallo cercanas a los ápices caulinares se puede producir mayor cantidad de meristemoides que a partir de la porción baja del tallo (TRAN THAN VAN, 1980, citado por ROCA y MROGNISKI, 1991).

Al usar tejido meristemático, en cambio, o aquel proveniente de zonas de intensa división celular como son las yemas apicales o axilares, se produce un organogénesis directa, manifestada en la formación de un nuevo brote y raíces a partir de la yema explantada. Estas yemas, con una adecuada composición

del medio de cultivo, pueden ser inducidas a la brotación múltiple, aumentando así la tasa de propagación de la especie (SEEMANN y BARRIGA, 1993).

f) Edad fenológica del material donante: según REBOLLEDO (1987) el explante muestra una mejor respuesta, mientras más joven sea éste.

El potencial organogénico de un explante es inversamente proporcional a su edad fisiológica (ALLEWEDT et al., 1962, citados por ROCA y MROGNISKI, 1991).

2.4.2 Regeneración

La regeneración de plantas directamente de los explantes, o a partir de callos, por medio de la organogénesis o de la embriogénesis somática se ha utilizado como una alternativa en los métodos de propagación; sin embargo, esa aplicación ha sido limitada a causa de la poca estabilidad genética en los cultivos de callos. Hay, en cambio, necesidad de regenerar plantas a partir de células selectas, como también necesidad de establecer métodos genéticos celulares aplicables en el mejoramiento de las plantas y en la recuperación de variantes somaclonales; en consecuencia, existe un considerable interés en definir las vías de regeneración para varias plantas de importancia económica (ROCA y MROGNISKI, 1991).

2.4.2.1 Organogénesis. En contraste con la embriogénesis somática, la organogénesis comprende el desarrollo de yemas o de meristemas radicales a partir de los explantes directamente o a partir de los callos (ROCA y MROGNISKI, 1991).

La organogénesis es un proceso mediante el cual un tejido es capaz de originar un órgano. Este proceso puede ser directo o indirecto (PARRAGUEZ, 1991). Durante el proceso de neoformación de órganos la división celular se inicia a partir de células individuales y continúa en 2 o 3 células adyacentes. THORPE y MURASHIGE (1968) sugieren que el desarrollo de meristemoides está confinado a regiones que contienen altos depósitos de almidón, lo que podría reflejar el alto requerimiento energético en el proceso de organogénesis.

Las regiones de mayor división celular forman “meristemoides” que hace que el callo tenga una apariencia nodular (THORPE, 1981).

La mayoría de estos meristemoides se asemejan a meristemas verdaderos y poseen conexiones vasculares con el callo o el tejido circundante. Bajo condiciones apropiadas de cultivo pueden formar yemas o raíces primarias (BONNETT, 1966, citado por ROCA y MROGNISKI, 1991); esta plasticidad está de acuerdo con las primeras observaciones de SKOOG *et al.* (1957), citados por ROCA y MROGNISKI (1991).

La organogénesis se puede realizar de dos formas :

a) Organogenesis directa: consiste en la capacidad que tiene un tejido ya formado (hoja, raíz o estructura reproductiva) de originar directamente (gracias a factores nutricionales y hormonales del medio de cultivo) un nuevo órgano, como por ejemplo brote o raíz (ROCA y MROGNISKI, 1991).

b) Organogenesis indirecta: es el proceso mediante el cual un tejido puede originar un órgano (brote, raíz), pero pasando por una etapa denominada callo, el cual se diferenciará gatillando por los factores del medio de cultivo a la formación de órganos (ROCA y MROGNISKI, 1991).

2.4.3 Elongación

Corresponde a una fase intermedia pero de suma importancia que consiste en preparar las yemas para la radicación. La práctica resulta necesaria solo en el caso de que ya no se realice ningún subcultivo sucesiva adicional ya que el material vegetal se encuentra demasiado pequeño para poder iniciar la radicación. Tal fase en este caso es obligatoria para poder obtener yemas adecuadamente desarrolladas. En general la elongación se efectúa mediante la transferencia de la yema del sustrato de cultivo con un bajo contenido de citoquininas respecto al medio de cultivo durante la precedente fase de proliferación (ELLENA, 1998).

Según AUGE *et al.* (1984), las auxinas también presentan una acción sobre la elongación celular. PIAGNANI, *et al.* (1996), recomiendan la utilización de BA en dosis de 2,5 μM para cerezo.

En algunas especies comúnmente se presentan problemas de vitrificación y degeneración del tejido, es recomendable agregar al sustrato de elongación carbono activo (100 – 500 mg/L) que tiene como función la absorción de la sustancia que se encuentra en exceso o causa fitotoxicidad. La elongación en general tiene una duración de 10 – 15 días y se efectúa a una temperatura que varía de 20 – 25 °C (ELLENA, 1998).

Según PIAGNANI *et al.* (1996), los explantes de cerezo deben estar unas semanas en oscuridad al inicio de cada cuatro subculturas consecutivas.

III MATERIAL Y MÉTODO

3.1 Lugar de trabajo

La presente investigación fue desarrollada en el laboratorio de cultivo de tejidos del Centro Regional de Investigación Carillanca dependiente del Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA), ubicado en el kilómetro 19 camino a Vilcún ruta S 31, cuya realización se llevó a cabo desde marzo del 2002 a septiembre del 2003.

3.2 Etapas de desarrollo del cultivo *in vitro*

3.2.1 Etapa de establecimiento de explantes.

La investigación fue realizada previa selección y manejo de las plantas madre de cerezos de la variedad Lambert, bajo condiciones acépticas controladas en un sistema forzado (invernadero). Las plantas fueron expuestas semanalmente a tratamientos fitosanitarios para facilitar la obtención de material libre de contaminación y a tratamientos de rejuvenecimiento a través de podas fuertes para disponer de material vegetal más reactivo a las condiciones de cultivo *in vitro*.

3.2.1.1 Selección del material vegetal. El material vegetal proveniente de plantas madres controladas genética y sanitariamente provisto de yemas fue

recolectado a principios de otoño. Los brotes utilizados fueron extraídos de ramos en activo crecimiento con la zona tegumental aún no suberificada y los tejidos suficientemente lignificados. Para reducir la sensibilidad a los productos químicos empleados para la esterilización fueron utilizados explantes uninodales privados parcialmente de hojas y con las yemas axilares intactas.

3.2.1.2 Desinfección previa al cultivo. Los explantes fueron lavados en agua destilada (2-3 veces), y luego sumergidos en agua destilada por 24 hrs a objeto de bajar el contenido endógeno de fenoles. Inmersión en alcohol etílico al 95% por 30 seg. Inmersión por 20 minutos en una solución de hipoclorito de sodio (2-4-6 %) adicionada con algunas gotas de Tween 20 y repetidos lavados en una solución de agua bidestilada con ácido ascórbico (250 mg/L).

3.2.1.3 Medio de cultivo. Los explantes fueron transplantados por 15 días en un sustrato MS/2 (Anexo 2) adicionado con mioinositol (100 mg/L), glicina, Tiamina (1 mg/L), PVP (a fin de reducir la formación de compuestos derivados de la oxidación de fenoles), sacarosa (20 g/L) y agar (7,5 g/L), luego se procedió a ajustar el pH a un valor de 5,5 mediante la utilización de KOH o HCl 0,1-1 N previo a autoclavado a 120 °C por 20 minutos. El agar fue mezclado con el medio de cultivo para obtener su solidificación, procediendo a agitar y calentar la suspensión hasta una T° cercana a los 90 °C. Se transvasijaron alrededor de 20 ml de sustrato al interior de los frascos de cultivo de 200 ml, cubierto con papel aluminio para luego proceder a su esterilización en autoclave a 120°C por 20 minutos. La transferencia de los cultivos a los vasos fue efectuada bajo cámara de flujo laminar, empleando pinzas y bisturís esterilizadas mediante mechero. Los cultivos fueron mantenidos en cámaras de crecimiento con un fotoperíodo de 16/24 horas, intensidad luminosa de 30 – 40 micromoles/m²/seg y temperatura de 22 – 24 °C.

3.2.1.4 Tratamientos para la etapa de establecimiento de explantes

- Contaminación : Hipoclorito de sodio al 0-2-4 y 6% (por 20 minutos)
- Oxidación : PVP en dosis de 0-20-50 y 100 mg/L.

3.2.1.5 Pruebas de evaluación

- Contaminación de explantes : medición de porcentaje de explantes contaminados en el día 5 10 y 15 de efectuado el establecimiento en relación a los 4 tratamientos con Hipoclorito de sodio.
- Oxidación de explantes : medición de porcentaje de explantes oxidados en el día 1-5-10 y 15 de efectuado el establecimiento en relación a los 4 tratamientos con PVP.

3.2.2. Etapa de proliferación de explantes

3.2.2.1 Medio de cultivo. Después de 15 días el material fue transferido a un medio con idéntica composición a la inicial, pero con la adición de BAP, necesaria para un sucesivo desarrollo de las yemas axilares. Los brotes de cerezo fueron multiplicados en un medio de cultivo con las sales minerales MS, con los nitratos reducidos a la mitad y con los componentes orgánicos necesarios para la proliferación del material vegetal, este medio fue a su vez empleado en los subcultivos de mantención de los brotes. Al pasar a la etapa de brotación, al medio utilizado se le adicionó BAP (0,2-0,5-1 mg/L), además de una mezcla de BAP, GA3 y ANA. Los trasplantes de los brotes a los sustratos de proliferación se realizaron cada 20 días (Anexo 17).

3.2.2.2 Tratamientos para la etapa de proliferación de explantes.

- Brotación : P*) BAP 0- 0,2- 0,5 y 1 mg/L

1) BAP 1 mg/L

2) BAP 1 mg/L + GA3 0,1 mg/L + ANA 0,01 mg/L (MIXa)

- Vitricación : 1) BAP 1 mg/L

2) BAP 1 mg/L + GA3 0,1 mg/L + ANA 0,01 mg/L (MIXa)

3.2.2.3 Pruebas de evaluación

- Brotación de explantes : medición de número de brotes por explante a los 15 días en relación a los 2 tratamientos hormonales.

- Vitricación de explantes : medición de número de explantes vitricados a los 15 días en relación a los dos tratamientos con citoquininas

3.2.3 Etapa de elongación de explantes.

3.2.3.1 Medio de cultivo. La fase de elongación fue realizada transfiriendo los cultivos por 15 días sustratos de cultivo similar al de proliferación conteniendo citoquininas, giberelinas y auxinas, lo que permitirá seleccionar microestaquillas bien desarrolladas con un tallo alargado y láminas foliares bien extendidas y adaptadas para la fase sucesiva de la radicación.

(P*) Prueba preliminar al tratamiento

3.2.3.2 Tratamientos para la etapa de elongación de explantes

- Elongación : P*) BAP 0 - 0,2- 0,5- 1 y 1,5 mg/L

1) Control

2) BAP 1 mg/L

3) BAP 1 mg/L + GA3 0,1mg/L + ANA 0,01 mg/L (MIXa)

- Vitrificación : 1) Control

2) BAP 1 mg/L

3) BAP 1 mg/L + GA3 0,1mg/L + ANA 0,01 mg/L (MIXa)

3.2.3.3 Pruebas de evaluación

- Elongación de explantes : medición de la longitud de los explantes a los 15-20 y 25 días en relación a los 3 tratamientos hormonales

- Vitrificación de explantes : medición del número de explantes vitrificados a los 15- 20 y 25 días en relación a los 3 tratamientos con citoquininas.

(P*) Prueba preliminar al tratamiento

2.1.1. Etapa de radicación de explantes.

3.2.4.1 Medio de cultivo. En las pruebas de radicación de *Prunus avium* fueron utilizadas microestaquillas del cultivar Lambert, seleccionadas de material obtenido en proliferación. En esta fase el material fue trasplantado en frascos de 200 ml conteniendo 20 ml de sustrato. El sustrato de radicación base a emplear en las pruebas mantuvo la misma composición de aquel utilizado en proliferación, diferenciado sólo en la adición de AIA como auxina además de la adición de BAP para mejorar la relación hoja -raíz. Los cultivos se mantuvieron a 22 +- 1°C con fotoperíodo de 16/24 horas de luz, 30 μ M .

3.2.4.2 Tratamientos para la etapa de radicación de explantes

- Radicación : P*) AIA en dosis de 0 -0,2 -0,5 y 1 mg/L

2) AIA 0,5 mg/L

3) AIA 1 mg/L

4) AIA 1 mg/L + BAP 0,01 mg/L (MIXb)

3.2.4.3 Pruebas de evaluación

- Radicación del explante : medición del número de raíces por explante a los 15-20 y 25 días en relación a los tres tratamientos hormonales durante la fase de inducción.
- Explantes enraizados : medición del porcentaje de microestaquillas enraizadas a los 15-20 y 25 días en relación a los 3 tratamientos hormonales durante la fase de inducción.

(P*) Prueba preliminar al tratamiento

3.2.5 Etapa de elongación de la raíz

3.2.5.1 Medio de cultivo. Se utilizaron sustratos similares al de radicación con AIA y BAP para obtener tanto un buen desarrollo radicular como foliar, y así lograr una mayor adaptación de la nueva plántula a la posterior aclimatación (Anexo 18).

3.2.5.2 Tratamientos para la etapa de elongación de la raíz

- Elongación de raíces : P*) AIA en dosis de 0-0,2-0,5 y 1 mg/L.

1) AIA 0,5 mg/L

2) AIA 1 mg/L

3) AIA 1mg/L + BAP 0,01 mg/L (MIXb)

2.1.1.1 Pruebas de evaluación

- Elongación de raíces : medición del largo de cada raíz a los 15-20 y 25 días en relación a los 3 tratamientos hormonales durante la fase de inducción.

(P*) Prueba preliminar al tratamiento

3.3 Análisis estadístico.

El presente trabajo corresponde a un estudio experimental (confirmatorio o explicativo) en el que se realizó muestreo inferencial con enfoque longitudinal del tipo prospectivo sobre datos considerados independientes.

Las variables de respuesta son de tipo cualitativas y cuantitativas. Los estudios con dos tratamientos se analizaron estadísticamente mediante t – Student, mientras que los con más de tres se analizaron mediante ANOVA verificando cumplimiento de homogeneidad de varianzas. Los tratamientos cuyos resultados se expresen en porcentajes se analizaron solo en gráficos.

Los resultados de las variables se presentan mediante valores de centralización (promedio), las que están complementadas con gráficos.

El análisis para las pruebas de establecimiento consistió en un diseño experimental completamente al azar, univariado dado por los tres tratamientos con hipoclorito de sodio para desinfección y los cuatro tratamientos con PVP para la oxidación, con 24 repeticiones por tratamiento.

El análisis para las pruebas de proliferación (número de brotes y porcentaje de cristalización) consistió en un diseño experimental completamente al azar, univariado dado por dos tratamientos hormonales, con 24 repeticiones por tratamiento (Anexos 3 y 4).

El análisis para las pruebas de elongación (largo del brote y porcentaje de cristalización) consistió en un diseño experimental completamente al azar, univariado dado por los tres tratamientos hormonales, con 24 repeticiones por tratamiento (Anexos 5, 6, 7, 8 y 9).

El análisis para las pruebas de radicación consistió en un diseño experimental completamente al azar, univariado dado por los tres tratamientos hormonales, con 24 repeticiones por tratamiento tanto para número de raíces como para largo de la raíz (Anexos 10, 11, 12, 13, 14, 15 y 16).

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Medio de cultivo

En el estudio se utilizó medio sólido para las etapas de establecimiento y proliferación; no así para el enraizamiento, en el cual se utilizó medio semisólido para evitar la ruptura de las raíces al transplante; el medio líquido no se utilizó, como recomienda MURASHIGE (1974), contra la oxidación, para evitar problemas de vitrificación y estabilizar mejor los explantes; el problema de oxidación por difusión de tóxicos se evitó recurriendo a las subcultivos frecuentes.

Las cantidades de agar utilizadas en el estudio fueron de 7,5 g/L para proliferación y 6 g/L para radicación obteniéndose muy buenos resultados, cantidades similares a las recomendadas por PIEERIK (1987); sin embargo, las cantidades de agar (5 – 20 g/L) utilizadas casi coincidentemente entre los autores HARTMAN y KESTER (1983) y TORRES (1988), aseguran que se evitaría el problema de vitrificación, caso que no ocurrió en su totalidad en el estudio. Según VON ARNOLD y FRIKSSON (1984) citados por ROCA y MROGNISKI (1991), estas cantidades reducirían el efecto de regeneración tanto de brotes como de raíces, caso que tampoco resultó válido en el transcurso del estudio.

PIAGNANI *et al.* (1996), al igual que en el estudio utilizaron sacarosa en una concentración de 20 g/L, consiguiendo una excelente proliferación en

cerezo, y en este caso no indujo proliferación de cayo, como lo informa ROCA y MROGNISKI (1991).

En cuanto a vitaminas la Tiamina se considera esencial y se utiliza en cantidades de 0,1- 5 mg /L (MURASHIGE, 1974 y MARGARA, 1988), en este caso se utilizó una dosis aumentada modificando la cantidad habitual del medio MS, de 0,1 a 1 mg/L. El mioinositol, según HUDSON y DALE (1968), es utilizado en concentraciones de 50 – 500 mg /L, en el estudio se utilizó en dosis de 100 mg/L al igual que MURASHIGE (1974).

4.2 Etapa de establecimiento de explantes

4.2.1 Elección del material

En cuanto al tipo de tejido a utilizar *in vitro*, SEEMANN y BARRIGA (1993), DE PAOLI *et al.* (1994), REYES y HEWSTONE (1994) y NEGRI *et al.* (1996), mencionan la utilización de pecíolos, entrenudos, discos foliares y microestacas en cerezo, mientras que en el proceso de proliferación las yemas apicales y axilares reaccionaron muy bien al cultivo *in vitro*. En el medio con hormonas para radicación, en tanto, reaccionaron los explantes ya elongados y también algunas láminas foliares; las microestacas sin embargo, no tuvieron éxito, ya que necrosaron en su totalidad.

En el estudio, se utilizaron inicialmente microestaquillas con dos yemas que no presentaron más problemas de contaminación que las yemas individuales, aunque no respondieron al cultivo *in vitro* evidenciando necrosis de las yemas; las yemas muy pequeñas (2 mm) evidenciaron oxidación, mientras que las yemas mas grandes (1 cm) no tuvieron problemas para responder al cultivo, corroborando así lo expuesto por LANE (1982) y ROCA y MROGNISKI (1991).

La época de explantación es discutida entre autores, pues según LANE (1982), debe realizarse con material en vigoroso crecimiento, ya que es más rápido que en dormancia; DE PAOLI *et al.* (1994) y PIAGNANI *et al.* (1996), utilizaron en cerezo material semileñoso (abril a septiembre) con yema dormida y ápice en activo crecimiento y BLANDO *et al.* (1996), utilizaron yema al final de dormancia. El material para las pruebas se recolectó en los meses de abril y mayo, obteniéndose brotación del 100% de los explantes.

SNIR (1982), respecto a la localización de las yemas utilizó en cerezo yemas axilares; SEEMANN y BARRIGA (1993), recomienda yemas apicales o axilares por su activa división celular para producir organogénesis directa y por ende brotación múltiple; REBOLLEDO (1987), por su parte expone que se obtienen mejores resultados desde segmentos apicales que de basales. Desde el ensayo se pudo establecer la eficiencia de las yemas apicales y axilares, ambas en un 100% de brotación, estableciendo solo la diferencia en el mayor número de yemas axilares obtenidas por rama, que se traduce en mejor aprovechamiento del material.

La edad fenológica del material es concordante para REBOLLEDO (1987) y ROCA y MROGNISKI (1991), mencionando ambos autores al material joven. Según el trabajo realizado se logró corroborar lo anterior comprobando que el material mas añoso presentó oxidación al ser cultivado en microestaquillas.

4.2.2 Contaminación

Para disminuir la incidencia de patógenos en la variedad estudiada se tomó la precaución de realizar lo indicado por REBOLLEDO (1987), SEEMANN y BARRIGA (1993) y NEGRI *et al.* (1996), además, tal como lo plantean GEORGE y SHERRINGTON (1984) y TOLEDO (1991), el cultivo de meristemas resultó una excelente solución a la contaminación, ya que la contaminación se redujo notablemente en relación al cultivo de microestaquillas. En cuanto a la utilización

de hipoclorito de sodio (FRAZIER, 1981), los mejores resultados durante el estudio se obtuvieron al utilizar una concentración del 6% por 20 minutos como se observa en el Cuadro 1 y Figura 1, al contrario de lo que mencionan DE PAOLI *et al.* (1994), de 1-3% por 3 minutos y casi coincidente con lo demostrado por REBOLLEDO (1987), de 5% por 15 minutos.

CUADRO 1. Porcentaje de explantes contaminados según tratamiento con hipoclorito de sodio.

Tratamiento (% de hipoclorito de sodio)	5 días	10 días	15 días
0	37.50	41.67	62.50
2	47.62	70.59	70.59
4	4.17	20.83	25.00
6	4.17	20.83	20.83

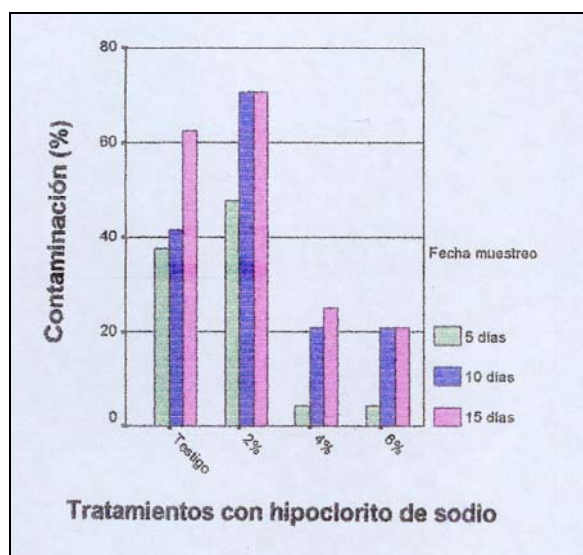


FIGURA 1. Porcentaje de contaminación según tratamiento con hipoclorito de sodio

4.2.3 Oxidación

En el estudio se procedió a disminuir la oxidación según recomienda SEEMANN y BARRIGA (1993), sin embargo, la disminución de luz no provocó diferencias en el cultivo. La utilización de PVP tampoco indujo a diferencias significativas en la cantidad de oxidación, por lo que se puede deducir que la variedad Lambert no es predisponente a la oxidación como las variedades de cerezo estudiada por DE PAOLI *et al.* (1994), ni como especie leñosa como mencionan GAMBORG *et al.* (1976) y MARGARA (1986), al disminuir la cantidad de iones amonio y potasio en el medio MS/2.

El estudio se realizó bajo una intensidad lumínica de 30 – 40 $\mu\text{M} / \text{m}^2 / \text{s}$ (10-20 $\mu\text{M} / \text{m}^2$ más que PIAGNANI *et al.* (1996) y un fotoperiodo de 16 /24 hrs con tubos fluorescentes, como menciona MARGARA (1988); la fase en oscuridad solo se realizó en el periodo de establecimiento y no incidió en la oxidación ni en el crecimiento como lo indican ROCA y MROGNISKI (1991) y BLANDO *et al.*, NEGRI, *et al.* y PIAGNANI *et al.*, en sus trabajos realizados en 1996.

4.3 Etapa de proliferación de explantes

4.3.1 Brotación

Para la realización del estudio en la parte de proliferación se utilizó la hormona BAP; para un acercamiento preliminar a la realización de los tratamientos, se midió la respuesta a las concentraciones 0,2- 0,5 y 1 mg /L, lo que se puede apreciar en el Cuadro 2.

CUADRO 2. Porcentaje de explantes muertos según distintos tratamientos con BAP.

TRATAMIENTO (mg/L de BAP)	15 días	20 días	25 días
Control	0	50	75
0,2	0	50	50
0,5	0	0	57
1	0	0	6,7

También se realizó una observación sobre el comportamiento de las distintas concentraciones de BAP y la adición de GA3 0,1 mg/L y ANA 0,01 mg/L (MIXa) al mejor resultado evaluado esto es BAP 1 mg/L, cuyos resultados se pueden apreciar en el Cuadro 3.

CUADRO 3. Características presentes en plántulas según los distintos tratamientos hormonales durante la etapa de brotación.

Tratamiento	Características
BAP 1 mg/L	Buena polibrotación con buen desarrollo de hojas
BAP 0,5 mg/L	Cristalización, pocos brotes.
BAP 0,2 mg/L	Necrosis.
MIXa	Abundante polibrotación aunque presenta pequeños problemas de amarillez, cristalización y poco desarrollo de hojas.

A los mejores resultados (BAP 1 mg/L y MIXa), se les realizó un estudio estadístico para la variable N° de brotes y los mejores resultados se obtuvieron con BAP1 (Cuadro 4 y Figura 2), por lo que la adición de giberelinas tuvo efecto antagonista en la formación de brotes (ROCA y MROGNISKI, 1991 y PARRAGUEZ, 1991); la polibrotación fue estimulada por el corte de los explantes .

La adición de ANA no tuvo efectos significativos, por lo que no se aplica lo dicho por MARGARA (1988) y ELLENA (1998), posiblemente debido a la baja cantidad de ANA utilizada en relación al BAP.

También se puede deducir que cantidades de BAP utilizadas por PIAGNANI *et al.* (1996), y NEGRI *et al.* (1996), son insuficientes para lograr una buena respuesta a la proliferación.

CUADRO 4. Efecto de diferentes tratamientos hormonales sobre el número de brotes en *Prunus avium* L. var. Lambert *in vitro*.

Tratamiento (mg/L)	Repeticiones	Promedio
BAP1	25	4,80 b
BAP1+GA3 0,1m+ANA 0,01	32	1,72 a

Letras distintas indican diferencias estadísticas según prueba T para igualdad de medias.

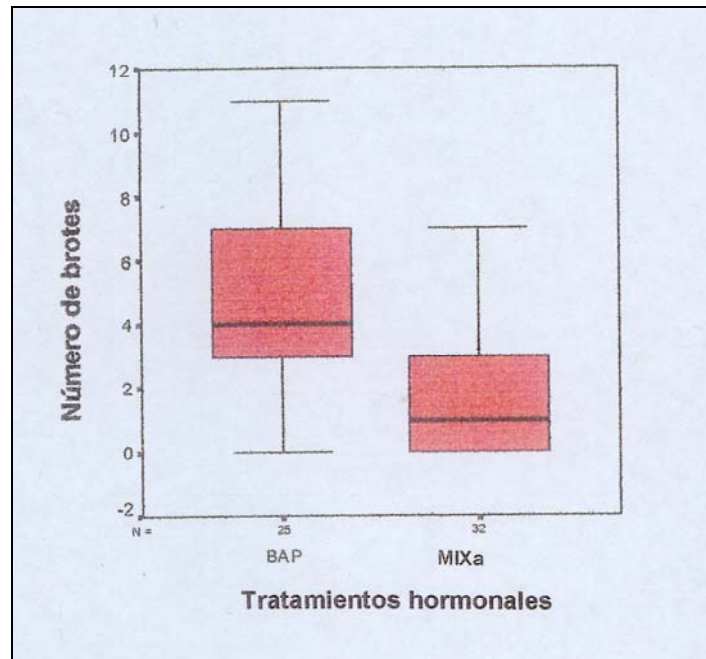


FIGURA 2. Efecto de diferentes tratamientos hormonales sobre la variable número de brotes.

La variedad Lambert obtuvo una excelente regeneración directa desde yemas, con el 100% de regeneración en brotes mientras que NEGRI *et al.* (1996), obtuvieron regeneración directa eficiente en cerezo solo pasando primero por etapa de cayo, en tanto que BLANDO *et al.* (1996), obtuvieron regeneración directa solo a partir de pecíolo.

El tiempo de regeneración de brotes en forma directa en el estudio fue de 8 semanas desde yema (1 a 2 brotes); mientras que a NEGRI *et al.* (1996) les tomo 22 semanas.

4.3.2 Vitrificación en la etapa de proliferación de explantes

Para solucionar el problema de vitrificación, NEGRI *et al.* (1996), recomiendan disminuir la frecuencia de subcultivos para no utilizar medio líquido, ya que resulta más eficiente en crecimiento del brote, pero favorable a la vitrificación, en los ensayos esto no es aplicable, pues luego de 15 días aparecieron problemas de vitrificación progresivamente durante el periodo brotación y de elongación.

Para la prueba de número de brotes, el problema de vitrificación para BAP 1 mg/L fue de un 28% y para la mezcla de hormonas de 41%, como se muestra en el Figura 3, deduciendo así que la etapa de brotación múltiple es muy vulnerable al problema de vitrificación debido al efecto hormonal. Para evitar el problema, además se realizaron subcultivos cada 15 días, cambiando la composición del medio cada 25 días, como recomiendan SEEMANN y BARRIGA (1993).

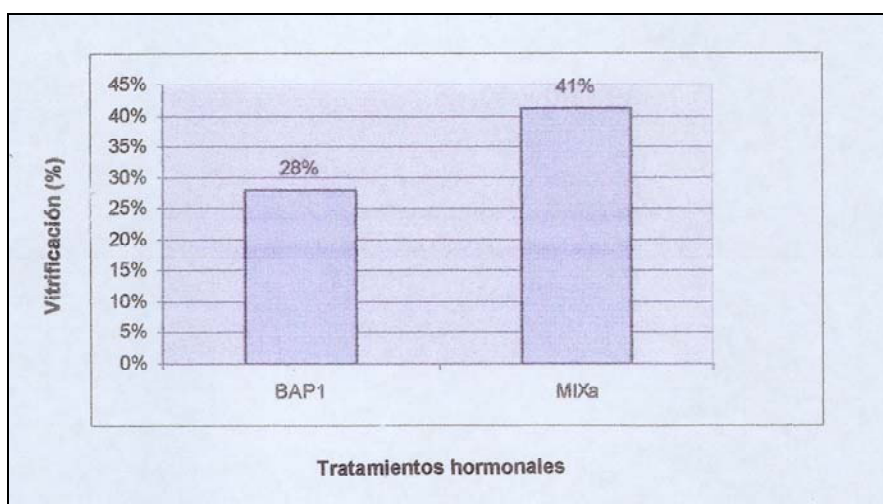


FIGURA 3. Porcentaje de vitrificación durante la etapa de brotación según distintos tratamientos hormonales.

2.1 Etapa de elongación de explantes

4.4.1 Elongación

Para la etapa de elongación también se realizó una observación del comportamiento previo a la realización al los tratamientos definitivos realizándose una comparación adicional para evaluar largo del brote con BAP 1,5 mg/L; MIX 1,5 (BAP 1,5 mg/L + GA3 0,1 mg/L + ANA 0,01 mg/L) y MIXa (BAP 1 mg/L + GA3 0,1 mg/L + ANA 0,01 mg/L), de las cuales la mejor respuesta se obtuvo con 1 mg/L como se presenta en el Cuadro 5, al igual que la cantidad evaluada por SNIR (1982).

CUADRO 5 Características presentes en plántulas según los distintos tratamientos hormonales durante la etapa de crecimiento del ápice.

Tratamiento	Características
BAP 1,5 mg/L	No hay crecimiento en el periodo evaluado.
BAP 1 mg/L	Buen crecimiento con un bajo porcentaje de cristalización.
BAP 0,5 mg/L	Crecimiento menor y hojas bien desarrolladas.
BAP 0,2 mg/L	Crecimiento regular y muy lento.
MIX 1,5	Plántulas muy cortas.
MIXa	Crecimiento regular pero en muy buen estado.

Al realizar las pruebas estadísticas, BAP 1 mg/L y MIXa mostraron resultados semejantes; el largo del brote no arrojó diferencias significativas para el día 15, y en los días 20 y 25 se produjeron diferencias solo del control, lo que demuestra que las hormonas producen un efecto a partir del día 20 (Cuadro 6 y Figura 4); además se demuestra que ni la giberelina ni el ANA en las cantidades utilizadas (que fueron inferiores a la citoquinina) tuvieron un efecto

antagonista como mencionan PARRAGUEZ (1991) y ROCA y MROGNISKI (1991) o estimulante en el crecimiento del brote como lo mencionan MARGARA (1988), ROCA y MROGNISKI (1991), BLANDO *et al.* y ELLENA (1998). Esto podría explicarse por las bajas cantidades de ANA y GA3 utilizadas en relación al BAP.

Sin embargo, durante la primera etapa de elongación, si se observó un pequeño efecto estimulante por parte de MIXa en cuanto a estado de la plántula como lo mencionan HUSSEY (1980) y AUGE *et al.* (1984) para iniciación del brote, por lo tanto, para gatillar el proceso de elongación (luego del corte para romper la dominancia apical) se debería comenzar con MIXa, para luego seguir con BAP debido a la mejor respuesta para rizogénesis y a la prontitud de elongación. El corte del ápice estimuló la elongación, rompiendo la dominancia apical, pues la citoquinina no fue suficiente como menciona PARRAGUEZ (1991); la elongación no se logro por si sola con GA3, puesto que este solo aumentó el tamaño de las hojas.

Finalmente es importante mencionar que la giberelina por si sola no produce elongación, sino que solamente ayuda al mejor desarrollo de la hoja.

CUADRO 6. Efecto de diferentes tratamientos hormonales sobre el largo del brote (cm) en *Prunus avium* L. var Lambert *in vitro*.

Tratamiento (mg/L)	15 días	20 días	25 días
Control	0,41 a	0,54 b	0,66 b
BAP 1	0,47 a	0,74 a	1,13 a
BAP1 +GA3 0,1 +ANA 0,01	0,43 a	0,80 a	1,16 a

Letras distintas indican diferencias estadísticas según Tukey ($p < 0,05$).

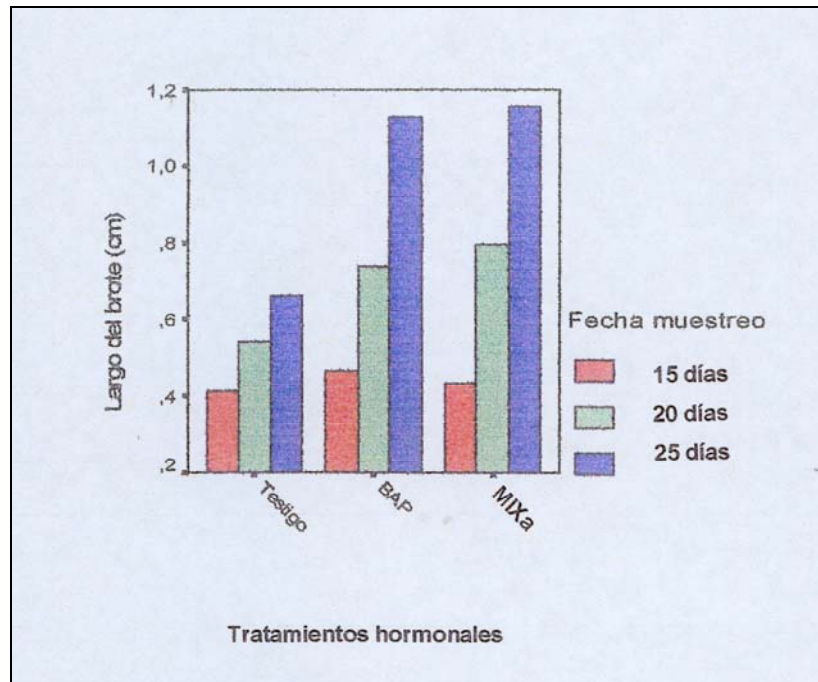


FIGURA 4. Efecto de diferentes tratamientos hormonales sobre la variable largo del brote.

4.4.2 Vitrificación en la etapa de elongación de explantes

Efectivamente como expone SEEMAN y BARRIGA (1993), a mayor cantidad de citoquininas mayor fue el porcentaje de vitrificación, pero a su vez inversamente proporcional al crecimiento de los brotes, es así como en la prueba de elongación del brote el medio sin citoquininas no presentó problemas de vitrificación; mientras que el medio con BAP 1 mg /L presentó un 4,5% de vitrificación; la solución con 1 mg de BAP adicionada a GA3 y AIA, presentaron 18,2% de vitrificación como se puede apreciar a continuación en el Cuadro 7 y Figura 5.

CUADRO 7. Porcentaje de vitrificación durante la etapa de elongación de explantes según distintos tratamientos hormonales y avance del tiempo.

N° de días	TRATAMIENTOS		
	Control	BAP1	MIXa
15	0%	0%	0%
20	0%	0%	9,1%
25	0%	4,6%	18,2%

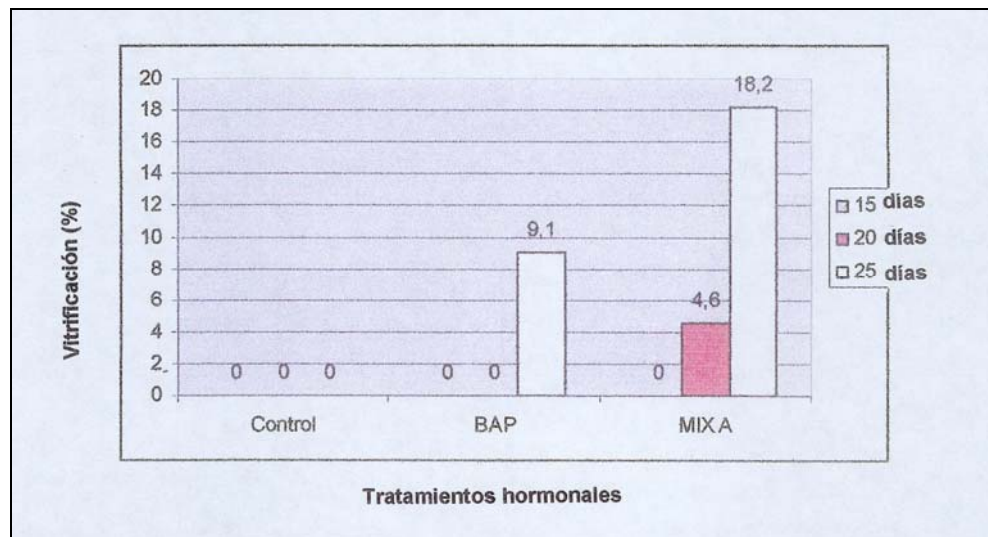


FIGURA 5. Porcentaje de vitrificación durante etapa de elongación de explantes según tratamiento hormonal y avance de días.

Los subcultivos para DE PAOLI *et al.* (1994), deben realizarse cada 14 – 16 días y no más de 20. Durante el ensayo se realizaron cada 15 días ya que por más tiempo el tejido comenzaba a presentar oxidación y vitrificación.

4.5 Etapa de radicación de explantes

Para la radicación se utilizó la hormona AIA para una prueba preliminar en dosis de 0,2- 0,5 y 1 mg /L, cuyos mejores resultados se obtuvieron con 0,5 y 1 mg/L, cantidades que resultaron inferiores a las utilizadas por NEGRI *et al.*, (1996). Las cantidades mejor evaluadas 1 y 0,5 mg/L de BAP posteriormente se midieron estadísticamente con 1 mg/L de AIA más 0,01 mg/L de BAP (MIXb) para mejorar la relación hoja-raíz .

Para la variable número de raíces en el día 15 no hubieron diferencias significativas y para los días 20 y 25, AIA 1 mg/L y MIXb* fueron estadísticamente los mejores (Cuadro 8 y Figura 6), lo que explica parcialmente, lo afirmado por PARRAGUEZ (1991), respecto al antagonismo hormonal, lo que demuestra que en esta oportunidad si influyó la aplicación de BAP aunque fuera en cantidades ínfimas en relación al AIA, pues como se puede apreciar en el gráfico si disminuyó el número de raíces por explante en consideración a AIA 1 mg/L, pero mejoró la relación hoja- raíz.

Por lo tanto, en la etapa de radicación no es aplicable lo dicho por MARGARA (1988) y ELLENA, (1998), pues la aplicación de BAP si va en desmedro de la rizogénesis, aunque ayudaría en la mejor supervivencia del explante.

MIX b * : mezcla con buenos resultados por mejor relación hoja-raíz

CUADRO 8. Efecto de diferentes tratamientos hormonales sobre el número de raíces en *Prunus avium* L. var Lambert *in vitro*.

Tratamiento (mg/L)	15 días	20 días	25 días
AIA 0,5	0,13 a	0,96 b	1,33 b
AIA1+BAP 0,01	0,54 a	1,25 ab	1,67 ab
AIA1	1,67 a	3,29 a	3,67 a

Letras distintas indican diferencia estadística según Tamhane y Tukey ($p < 0,05$).

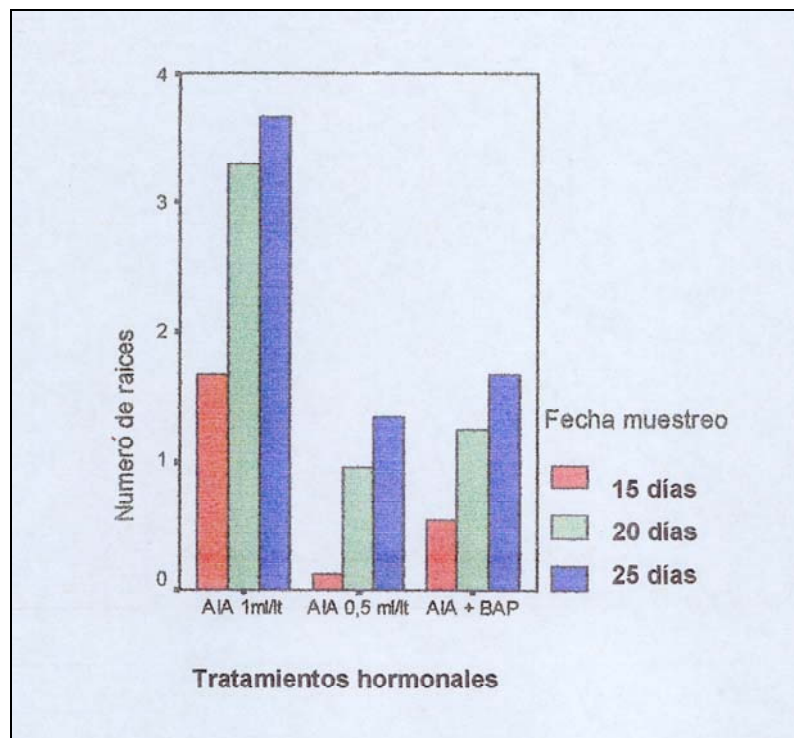


FIGURA 6. Efecto de diferentes tratamientos hormonales sobre la variable número de raíces.

Durante el estudio se logró un 70,8% de regeneración en raíces con AIA 1 mg/L, que resultó ser la mejor opción para enraizar en las tres fechas, como se presenta en el Cuadro 9 y Figura 7, sin embargo, ésta concentración hormonal presenta una escasa relación hoja-raíz perjudicial para el proceso de aclimatación (Anexo 19).

CUADRO 9. Porcentaje de radicación según distintos tratamientos hormonales.

Tratamiento (mg/L)	15 días	20 días	25 días
AIA 1	37,5	62,5	70,8
AIA 0,5	8,3	12,5	45,8
AIA1+ BAP 0,01	4,2	37,5	45,8

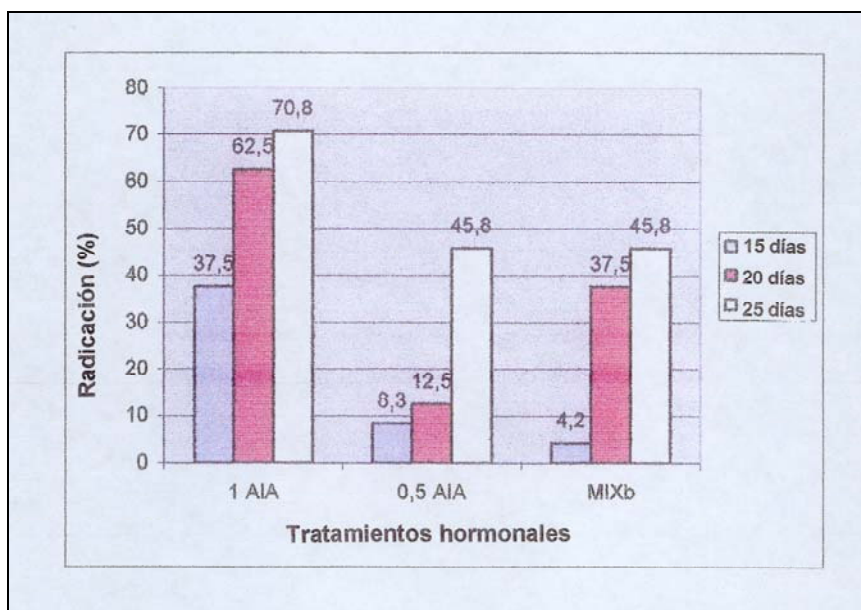


FIGURA 7. Porcentaje de radicación según distintos tratamientos hormonales.

2.1 Etapa de elongación de la raíz

Los mejores resultados obtenidos para la variable largo de raíz en el día 15 fue AIA 1 mg/L y MIXb; para el día 20 AIA 1 mg/L y MIXb* y para el día 25 solo AIA 1 mg/Lt (Cuadro 10 y Figura 8). Esto concuerda parcialmente con PARRAGUEZ (1991) respecto a que las citoquininas anulan la rizogénesis; pero esto sólo sucede en el día 25 por lo que resultaría conveniente utilizar MIXb hasta el día 20, para así mejorar la relación hoja/ raíz.

En esta oportunidad, solo desde el día 20 es aplicable lo expuesto MARGARA (1988) y ELLENA (1998), respecto al aporte del BAP en la etapa de rizogénesis.

CUADRO 10. Efecto de diferentes tratamientos hormonales sobre la longitud de raíces (cm) en *Prunus avium* L. var. Lambert *in vitro*.

Tratamiento (mg/L)	15 días	20 días	25 días
AIA 0,5	0,11 b	0,58 b	0,93 b
AIA1+BAP 0,01	0,54 a	0,77 ab	1,16 b
AIA1	0,56 a	1,03 a	1,59 a

Letras distintas indican diferencias estadísticas según Tukey ($p < 0,05$)

MIX b * : mezcla con buenos resultados por mejor relación hoja-raíz

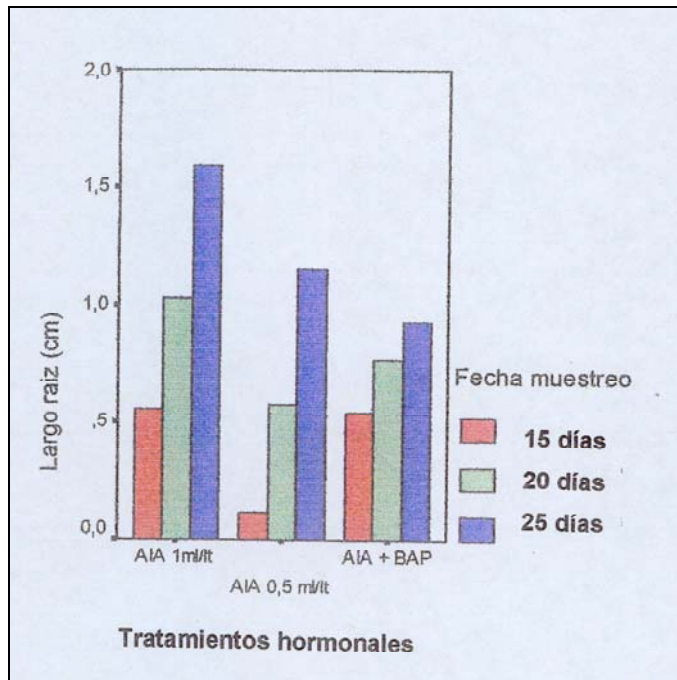


FIGURA 8. Efecto de diferentes tratamientos hormonales sobre la variable longitud de raíces.

La radicación y elongación demoraron coincidentemente con PIAGNANI *et al.* (1996), 15 a 25 días y durante esta etapa una alta luminosidad si incidió en el crecimiento de las raíces como lo mencionan AUGÉ *et al.* (1984).

V CONCLUSIONES

Al concluir la etapa de establecimiento, los mejores resultados para desinfección de explantes durante el cultivo *in vitro*, se obtuvieron al utilizar un 6% de Hipoclorito de sodio.

Durante la misma etapa, pero evaluando la disminución de la oxidación de explantes utilizando PVP, la variedad Lambert, no presentó problemas de oxidación importantes, solo una leve presencia de ésta a los 10 días en el tratamiento control (0% de PVP), por lo que se recomienda la utilización de PVP en cantidad de 20 mg/L. Cabe señalar que durante el transcurso de esta etapa es necesario realizar transplantes máximo cada 20 días para evitar problemas de oxidación y vitrificación, idealmente cada 15 días para mejor utilización del medio.

Las pruebas preliminares de proliferación (brotación y crecimiento del brote) en explantes con el ápice cortado muestran que BAP1 mg/L y MIXa presentan mayor brotación con más de tres brotes, además de presentar menor porcentaje de vitrificación y necrosis. Sin embargo, al hacer una comparación solo entre ambos, los explantes presentan mayor problema de vitrificación en el medio con adición de giberelinas y auxinas (MIXa) durante el desarrollo de la etapa de proliferación (brotación y largo del brote). Las pruebas para crecimiento del brote mostraron que usando solo GA3, no se logra más que la elongación de las hojas.

Durante las pruebas preliminares de proliferación, solo BAP1 mg/L produjo brotación múltiple, aunque solo con un máximo de 3 brotes por explante, con 33,3 % de explantes con dos brotes y 6,6 % de explantes con tres brotes;

destacando que la brotación múltiple con más de tres brotes solo ocurre al cortar el ápice del explante.

En la etapa de proliferación, las pruebas estadísticas arrojaron como resultado que para la variable largo del brote BAP 1 mg/L y MIXa obtuvieron buenos resultados y presentan una curva de crecimiento similar hasta los 25 días. Sin embargo para gatillar el efecto de crecimiento del brote, se debe comenzar con MIXa solo durante los primeros 15 días en la primera fase, para luego de establecidas utilizar BAP 1 mg/L debido a la mejor respuesta a la radicación de los explantes provenientes de este. Para la variable N° de brotes, las pruebas estadísticas arrojaron que los mejores resultados se obtienen con BAP 1 mg/L.

La concentración de agar durante la etapa de radicación en el medio de cultivo debe disminuir a 6 g/L, para evitar el desprendimiento de raíces en el transplante.

En la etapa de radicación, las pruebas estadísticas arrojaron como resultado que para la variable largo de la raíz y número de raíces, los mejores resultados se obtuvieron con AIA 1 mg/L hasta los 25 días, mientras que MIXb fue decayendo desde el día 20. Cabe señalar que para efectos de aclimatación se recomendaría la utilización de MIXb, debido a la mejor relación hoja – raíz, ya que mientras mejor desarrollo radicular (presente en el medio AIA 1 mg/L), peor desarrollo de las hojas. Para la variable número de raíces AIA 0,5 mg/L tuvo buenos resultados a los 15 días donde podría utilizarse para mejorar la relación hoja - raíz necesaria durante la etapa de aclimatación.

VI RESUMEN

La presente investigación sobre el cultivo *in vitro* de cerezo (*Prunus avium* L), específicamente de la variedad Lambert, previa selección del material adecuado, evaluó la mejor concentración de desinfectante (hipoclorito de sodio) y de antioxidante (PVP) y logró concluir que la mejor concentración de desinfectante fue de 6 %, en tanto que para la oxidación se determinó que la variedad Lambert no es predisponente a la oxidación, recomendando la utilización de una concentración mínima de a lo menos 20 mg/L, además de las medidas preventivas mencionadas durante el desarrollo del presente texto.

Para los distintos estados de desarrollo del cultivo bajo diversos tratamientos hormonales (BAP o BAP+GA3+ANA en proliferación y AIA o AIA+BAP en radicación) los explantes mostraron respuesta a BAP 1 mg/L tanto para brotación como para elongación, mientras que MIXa sirvió solo para gatillar el proceso de elongación. La mejor radicación se logró con 1 mg/L de AIA y MIXb, aunque con una relación hoja –raíz muy deficiente que resulta inconveniente para la etapa de aclimatación, debido a lo cual se recomienda la utilización de MIXb.

SUMMARY

The present investigation on the cultivation *in vitro* of cherry tree (*Prunus avium* L), specifically of the variety Lambert, previous selection of the appropriate material, evaluated the best concentration of disinfectant (hipoclorito of sodium) and of anti-rust (PVP) and it was able to conclude that the best disinfectant concentration was of 6%, as long as for the oxidation it was determined that the variety Lambert is not to predispose you to the oxidation, recommending the use of a minimum concentration of to the less 20 mg/L, besides the preventive measures mentioned during the development of the present text.

For the different states of development of the cultivation low diverse hormonal treatments (BAP or BAP+GA3+ANA in proliferation and AIA or AIA+BAP in radicación) the explantes showed answer to BAP 1 mg/L as much for brotación as for elongation, while MIXa served alone to trigger the elongation process. The best radicación was achieved with 1 mg/L of AIA and MIXb, although with a relationship leaf – root very faulty that is inconvenient for the acclimatization stage, due to that which the use of MIXb is recommended.

VII LITERATURA CITADA

- ANDREANI, V. 1987. Cultivo *in vitro* de ápices meristemáticos de plantas adultas de Kiwi cv Hayward. Tesis para optar al título de Ingeniero Agrónomo. Universidad Católica de Valparaíso. Facultad de Agronomía Quillota Chile. 116 p.
- AUGE, R y BEAUCHESNE, G; BOCCON-GIBOD J; DECOURTYE, L; DIGAT, B; GALANDRIN, CI; MINIER. R; MORAND, CI; VIDALIE,H. 1984. La culture In Vitro. Technique et Documentation (Lavoisier), Paris. 151 p.
- BENGOA, M. 1990. Micropropagación del Babaco. Tesis para optar al título de Ingeniero Agrónomo. Universidad Católica de Valparaíso. Facultad de Agronomía Quillota Chile. 122 p.
- BLANDO, F; GERARDI, C; GEOVINAZZO, G.1996. Atti III Geornate scientifiche SOI ERICE. Pp 31-32.
- BOHM, L. 1982. Micropropagación *in vitro* del Boysanberry. Tesis para optar al título de Ingeniero Agrónomo Universidad Católica de Valparaíso, Escuela de Agronomía Quillota Chile. 117 p.
- DE PAOLI, G; ROZZI, V; SCOZZOLI, A.1994. Micropropagazione delle piante horttofruticole. Edeagrícola edizione agrícole- Bologna. Pp 182-183.
- DEL SOLAR, C. 1985. Usando técnicas del cultivo de tejido. Micropropagación de plantas. 126 p.

- ELLENA, M.1998. Aspecti fisiological e biochimici asociati al processo rizogenético del Castagno da frutto e Nocciolo. Universidad de Bologna. Departamento de Cultivos Arbóreos. Italia. 157 p.
- FRAZIER, W.1981. Microbiología de los alimentos. 2ª edición Zaragoza, Acribia. 512 p.
- GAMBORG, O; MURASHIGE, T; THORPE, T; VASIL, L.1976. Plant tissue Culture Media. *In vitro*. Vol.12(7): Pp 473-476.
- GEORGE, E; SHERRINGTON, P.1984. Plant Propagation by Tissue Culture. 1ª ED. London, Hand bock and directory of comercial Laboratories. 309 p.
- GUTIERREZ, P; TAYLOR, R; MULEO, R. y RUGINI, E.1998. Somatic Embryogenesis and shoot regenerative front transgenic roots of the Cherry.Plant- cell red. Berlin w.gerd. springer international ARR. Vol 17(6/7). Pp 574 – 580.
- HAMMATT, N y GRANT, N.1998. Shoot regeneration from leaves of Prunus. Plant- cell red. Berlin w.gerd. springer international ARR. Vol 17(6/7). Pp 526 – 530.
- HARTMAN and KESTER.1983. Plant Propagation. 4ª ed. Prentice-Hall, INC., Englewood Cliffs, New Jersey. 702 p.
- HUANG, L.; VAN GUNDY, R.; MURASHIGE, T.1988. Fundamentos y aplicaciones del cultivo de tejidos vegetales. Cultivos de tejido aplicado a la producción agrícola. Ed. Signo Contemporáneo. Pp 20-32.

HUDSON, R.; DALE, I. 1968. *in vitro* Propagation of treated red raspberry clones. Hort Science Vol.14 (3): Pp 308-309.

HUSSEY, G, 1980. *in vitro* propagation. In : Ingram, D, de. Tissue Culture Methods for plants pathologist. Madison. Federación or Brithish Plant Pathologist. Pp 51-60.

JORDAN, N y GOREAUX, A. 1990. Perspectivas de cultivo *in vitro* en células y tejido vegetal. 133 p.

LANE, W. 1982. Tissue culture and *in vitro* propagación of deciduous fruit and nut species. In: Thomas, D.T. and others, eds. Application of plants cell and tissue culture to agriculture and industry. Guelph, Plant cell culture cntre. Pp 163-186.

LITZ, R. 1988. Tropical and subtropical fruits and Vegetables. In : Zimmerman *et al*, de. Tissue culture as a plant production Sistem for Horticultural Crops. Netherlands, Martinus Nijhoff Publishers. Pp 237-247.

MARGARA, J. 1986. Multiplicación vegetativa y cultivo *in vitro*. Ediciones Mundi-prensa. Madrid, España. 230 p.

----- . 1988. Multiplicación vegetativa y cultivo *in vitro*. 3ª De Ediciones Mundi-prensa. Madrid, España. 230 p.

MURASHIGE, T. 1974. Plant Propagation Throught tissue culture. Ann. Rev. Plant. Phisiology. 25: 136-137.

----- and SKOOG, F. 1962. A revised medium for rapid growth and biossays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15. 473-497.

NEGRI, P; ROTONDI, A; ANCHERANI, M. 1996. Atti III Giornate Scientifiche SOI. ERICE. Pp 31-32.

----- ; MAGNIANI, E; CANTONI, L ; BERARDI, G; SANSABINI ,S, 1998. Piante arboree transgeniche prime esperienze sul trasferimento di geni per il controllo dell habitus vegetativo. Revista di fruticoltura N° 5. P 93.

PARRAGUEZ, L. 1991. Micropropagación e inducción de variación somaclonal en mora cultivada. Universidad Católica de Chile. Stgo. 83 p.

PIAGNANI, C; BIROCCHI ,V; PELUCCHI, N; BONINI, L. 1996. Atti III Giornate Scientifiche SOI. ERICE. Pp 37-38.

PIEERIK, R. 1987. *In vitro* culture of higher plants. 321 p.

QUAK, F. 1977. Meristem culture and virus-free plants. In : reinert, J and Bajaj, Y.P.S, Eds. Applied and fundamental aspects of plants cell, tissue, and organ culture. Berlin, Germany, Springer-Berlag. Pp 598-615.

REBOLLEDO, M. 1987. Factores que afectan la micropropagación *in vitro* del cerezo. Universidad de Concepción. Facultad de Agronomía. Chillan.

REYES, H y HEWSTONE, N. 1994. Cultura de tejidos en la agricultura. Tierra Adentro N°24 Pp 30-33.

ROCA, W y MROGNISKI, L. 1991. Fundamentos y aplicaciones. Regeneración de plantas en cultivo de tejidos, embriogenesis somáticas y organogénesis. 970 p.

SEEMANN y BARRIGA.1993. Utilización de técnicas de micropropagación. Avances en producción y sanidad vegetal. Cultivos no tradicionales. Ed Universitaria. 230 p.

SNIR, Iona.1982. *In vitro* propagation of sweet cherry cultivars. HortScience Vol.17(2): Pp 192-193.

THORPE, T.1981. Plant Tissue Culture. Academic Press. Inc. 379p.

-----; MURASHIGE, T.1968. Starch accumulation in shootforming tobacco callus cultures. Science, Vol 160: Pp 421-422.

TOLEDO, A.1991. Propagación *in vitro* de *Camellia japonica* L. utilizando yemas axilares como explantes iniciales. Tesis para optar al título de Ing. Agrónomo. Universidad Católica de Valparaíso, Facultad de Agronomía. 65 p.

TORRES, K.1988. Tissue Culture Techniques for horticultural crops. Published by Van Nostrand Reinhold. New York. Pp 30-55.

VILLEGAS, L; BRAVATO, M.; ZAPATA, C.1988. Cultivo de tejidos vegetales aplicado a la producción agrícola. Pp 25-39.

VIII ANEXOS

ANEXO 1. Glosario.

AIA : Acido 3 Indolacético.

ANA : Acido Naftalenacético.

BAP : 6-Bencilaminopurina.

GA3 : Acido giberelico-3.

Hr . humedad relativa

μM : micro Molar 0.000001 Molar.

MIXa : mezcla formada por BAP 1mg/L + GA3 0,1mg/L + ANA 0,01 mg/L.

MiXb : mezcla formada por AIA 1mg/L + BAP 0,01 mg/L.

MIX 1,5 : mezcla formada por BAP 1,5 mg/L + GA3 0,1mg/L + ANA 0,01 mg/L.

MS : medio Murashige y Skoog.

MS/2 : medio Murashige y Skoog con los macronutrientes reducidos a la mitad.

pH : acidéz del medio

PVP : Polyvinilpolypyrrolidona.

T° : temperatura

ANEXO 2. Composición de los medios nutritivos MS y MS/2

Componentes	MS (mg/L)	MS/2 (mg/L)
NH ₄ NO ₃	1650	825
KNO ₃	1900	950
CaCl ₂ *2H ₂ O	440	220
MgSO ₄ *7H ₂ O	370	185
KH ₂ PO ₄	170	85
Na ² *EDTA*2H ₂ O	37,25	37,25
FeSO ₄ *7H ₂ O	27,85	27,85
CoCl ₂ *6H ₂ O	0,025	0,025
CuSO ₄ *5H ₂ O	0,025	0,025
H ₃ BO ₃	6,2	6,2
KI	0,83	0,83
MnSO ₄ *7H ₂ O	22,3	22,3
Na ₂ MoO ₄ *2H ₂ O	0,25	0,25
ZnSO ₄ *7H ₂ O	8,6	8,6
Tiamina HCL	0,1	0,1*
Ac. Nicotínico	0,5	0,5
Pyridoxina HCL	0,5	0,5
Glicina	2	2
Mioinositol	100	100
Sacarosa	20000	20000
Ph	5,8	5,8*

* Valores modificados en la investigación.

Fuente : Adaptado de Murashige y Skoog, 1962.

ANEXO 3. Test de Normalidad para la variable número de brotes.

Tratamiento	Kolmogorov-Smirnov a			Shapiro- Wilk		
	Estadístico	df	Sig	Estadístico	Df	Sig
BAP	0,140	25	0,200*	0,958	25	0,380
BAP+GA3+ANA	0,184	32	0,008	0,846	32	0,000

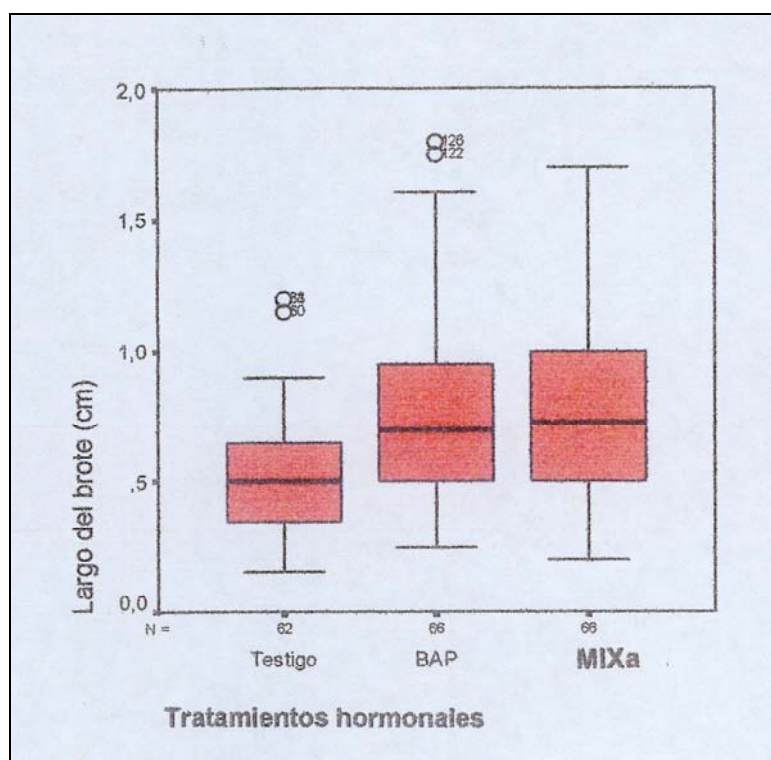
*This is a lower bound of the true significance

a. Lilliefors Significance Correction

ANEXO 4. Pruebas de igualdad de medias y de varianzas para la variable número de brotes.

Tratamiento	N	Promedio	Desviación estandar	Error estandar promedio
BAP	25	4,80	2,799	0,560
BAP+GA3+ANA	32	1,72	1,836	0,325

	Test de Levene para igualdad de varianzas		Prueba T para igualdad de medias				
	F	Sig	t	df	Sig. bilateral	Diferen. promedio	Diferencia error estandar
Igualdad de varianzas asumida	5,416	0,024	5,006	55	0,000	3,08	0,616
Igualdad de varianza no asumida			4,762	39,4	0,000	3,08	6,647



ANEXO 5. Gráfico de cajas del efecto de diferentes tratamientos hormonales sobre la variable largo del brote.

ANEXO 6. Test de Normalidad para la variable largo del brote (cm).

Tratamiento	Kolmogorov-Smirnov a			Shapiro-Wilk		
	Estadístico	df	Sig	Estadístico	Df	Sig
Control	0,177	62	0,000	0,913	62	0,000
BAP	0,129	66	0,008	0,922	66	0,000
BAP+GA3+ANA	0,102	66	0,083	0,958	66	0,024

a. lilliefors significance Correction

ANEXO 7. Test de homogeneidad de varianza para la variable largo del brote (cm) en la fecha 1.

Estadístico Levene	df1	df2	Sig
1,369	2	64	0,262

ANOVA

	Suma de cuadrados	df	Promedio de cuadrados	F	Sig
Entre grupos	0,035	2	0,017	0,814	0,448
Sobre grupos	1,359	64	0,021		
Total	1,394	66			

ANEXO 8. Test de homogeneidad de varianza para la variable largo del brote en la fecha 2.

Estadístico Levene	df1	df2	Sig
0,158	2	62	0,854

ANOVA

	Suma de cuadrados	df	Promedio de cuadrados	F	Sig
Entre grupos	0,761	2	0,380	8,353	0,001
Sobre grupos	2,824	62	0,046		
Total	3,584	64			

ANEXO 9. Test de homogeneidad de varianza para la variable largo del brote en la fecha 3.

Estadístico Levene	df1	df2	Sig
1,661	2	59	0,199

ANOVA

	Suma de cuadrados	df	Promedio de cuadrados	F	Sig
Entre grupos	2,949	2	1,474	16,212	0,000
Sobre grupos	5,366	59	0,091		
Total	8,315	61			

ANEXO 10. Test de homogeneidad de varianza para la variable número de raíces en la fecha 1.

Estadístico Levene	Df1	df2	Sig
6,371	2	69	0,003

ANOVA

	Suma de cuadrados	df	Promedio de cuadrados	F	Sig
Entre grupos	30,528	2	15,264	2,959	0,058
Sobre grupos	355,917	69	5,158		
Total	386,444	71			

Test de igualdad de medias.

	Estadístico a	df1	df2	Sig
Welch	3,548	2	32,227	0,040

a. Asymptotically F distributed.

ANEXO 11. Test de homogeneidad de varianza para la variable número de raíces en la fecha 2.

Estadístico	Df1	df2	Sig
Levene			
5,865	2	69	0,004

ANOVA

	Suma de cuadrados	df	Promedio de cuadrados	F	Sig
Entre grupos	77,583	2	38,792	4,443	0,015
Sobre grupos	602,417	69	8,731		
Total	680,000	71			

Test de igualdad de medias

	Estadístico a	df1	df2	Sig
Welch	3,659	2	39,716	0,035

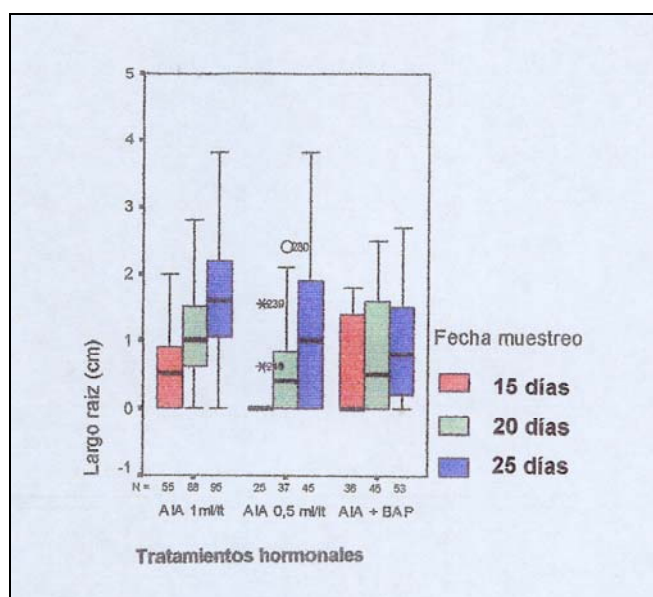
a. Asymptotically F distributed.

ANEXO 12. Test de homogeneidad de varianza para la variable número de raíces en la fecha 3.

Estadístico	Df1	df2	Sig
Levene			
2,916	2	69	0,061

ANOVA

	Suma de cuadrados	df	Promedio de cuadrados	F	Sig
Entre grupos	76,444	2	38,222	3,768	0,028
Sobre grupos	700,000	69	10,145		
Total	776,444	71			



ANEXO 13. Gráfico de cajas del efecto de diferentes tratamientos hormonales sobre la variable longitud de raíces.

ANEXO 14. Test de homogeneidad de varianza para la variable longitud de raíz (cm) en la fecha 1.

Estadístico	df1	df2	Sig
Levene			
22,590	2	113	0,000

ANOVA

	Suma de cuadrados	df	Promedio de cuadrados	F	Sig
Entre grupos	3,815	2	1,908	5,711	0,004
Sobre grupos	37,742	113	0,334		
Total	41,557	115			

Test de igualdad de medias

	Estadístico a	df1	df2	Sig
Welch	11,384	2	66,226	0,000

a. Asimptotically F distributed.

ANEXO 15. Test de homogeneidad de varianza para la variable longitud de raíz (cm) en la fecha 2.

Estadístico Levene	df1	Df2	Sig
2,378	2	167	0,096

ANOVA

	Suma de cuadrados	df	Promedio de cuadrados	F	Sig
Entre grupos	5,865	2	2,933	5,654	0,004
Sobre grupos	86,625	167	0,519		
Total	92,490	169			

ANEXO 16. Test de homogeneidad de varianza para la variable longitud de raíz (cm) en la fecha 3.

Estadístico Levene	df1	Df2	Sig
3,982	2	190	0,020

ANOVA

	Suma de cuadrados	df	Promedio de cuadrados	F	Sig
Entre grupos	16,201	2	8,101	10,089	0,000
Sobre grupos	152,555	190	0,803		
Total	168,756	192			

Test de igualdad de medias

	Estadístico a	Df1	df2	Sig
Welch	11,841	2	96,369	0,000

a. Asymptotically F distributed



ANEXO 17. Plántulas de cerezo en *in vitro*.



ANEXO 18. Plántula de cerezo enraizada.



ANEXO 19. Plántulas de cerezo terminadas y transplantadas a sustrato y ambiente *extra vitrum*.