

ARTÍCULO 8

Establecimiento in vitro del portainjerto de durazno GxN (Garfield – Nemared), con brotes de verano, en el laboratorio de Cultivos in vitro.

Mamani Cruz Alex Limber, Mercado Luis Raul, Romero Romero María Mercedes

Equipo de Investigadores de la carrera de Ingeniería Agronómica, Facultad de Ciencias Agrícolas y Forestales-Universidad Autónoma Juan Misael Saracho

Correspondencia del autor: Jhonangelito89@gmail.com

Resumen

Este trabajo de Investigación se realizó en el laboratorio de Fitopatología y Cultivo in vitro dependiente de la Facultad de Ciencias Agrícolas y Forestales de la Universidad Autónoma Juan Misael Saracho (U.A.J.M.S) en la Ciudad de Tarija de la provincia Cercado.

El híbrido durazno x almendro *Garfield Nemared* es de gran importancia como portainjertos para durazno en Bolivia, pero la propagación por métodos tradicionales es difícil.

El presente estudio tuvo como objetivo establecer un protocolo in vitro de este híbrido. Se emplearon como explantes iniciales esquejes de brotes de verano de plantas madre del centro experimental de Chocloca CECH y a las cuales se aplicó pretratamiento con fungicida. Para la desinfección fueron ensayadas dos concentraciones de hipoclorito de sodio (NaClO) al 1 y 2%, en un tiempo (10 min). En conclusión, el mayor porcentaje de regeneración (33%) fue logrado con 2% de hipoclorito de sodio de NaClO durante 10 min, en un medio de cultivo MS libre de reguladores del crecimiento. Se alcanzó un buen control de la oxidación de los fenoles con la combinación del uso

de 150 mg/1 ácido cítrico al final de la desinfección y en el medio de cultivo para posteriormente colocar los tubos de ensayo con los segmentos nodales una semana en condiciones de oscuridad.

Palabras clave: Cultivo in vitro, portainjerto, híbrido durazno x almendro; cultivo de tejidos.

Abstract

This work of Investigation was realized in the laboratory of Fitopatología and Cultivo in vitro that depends of the Faculty of Agricultural and Forestry Sciences of the U.A.J.M.S. in Tarija city.

The Garfield Nemared peach x almond hybrid is of great importance as a peach rootstock in Bolivia, but propagation by traditional methods is difficult.

The objective of this study was to establish an in vitro protocol for this hybrid. Cuttings of summer shoots of mother plants from the experimental center of Chocloca CECH were used as initial explants and to which pretreatment with fungicide was applied. For disinfection, two concentrations of sodium hypochlorite (NaClO) at 1 and 2% were tested in one time (10 min). In

conclusion, the highest percentage of regeneration of (33%) was achieved with 2% NaClO sodium hypochlorite for 10 min, in an MS growth medium free of growth regulators. A good control of the oxidation of the phenols was achieved with the combination of the use of 150 mg / 1 citric acid at the end of the disinfection and in the culture medium and later placing the test tubes with the nodal segments a week in conditions of darkness.

Key words: In vitro culture, rootstock, hybrid peach x almond; tissue culture.

1. Introducción

En duraznero actualmente se encuentran cultivándose en casi todo el mundo, y su producción se concentra en Europa, produciendo 3500 toneladas por año, lo cual representa el 50% de la producción mundial.

La producción de frutas en Bolivia se ha constituido en una importante actividad económica. La actividad productiva de durazno, está en proceso de crecimiento por la importancia económica que este rubro ha logrado generar no solo para el sector agrícola sino en la generación de otras actividades económicas que están directamente relacionadas con el uso de esta materia prima.

En Bolivia la mayor producción de durazno se encuentra en el departamento de Cochabamba con 2.542 has, seguido por Chuquisaca con 1.457 has, la Paz con 904 has y Tarija que ocupa el cuarto lugar con 824 has, con un promedio en nuestro país que no superan las 7 ton/ha.

Dentro del departamento de Tarija existen notables cualidades para el cultivo del durazno, en la zona del valle central, como en otras zonas, sin embargo, no se tiene disponibilidad de los portainjertos resistentes a riesgos fitosanitarios como la *Agrobacterium tumefaciens* que produce la agalla de corona. Existen viveros que tienen este material y lo multiplican en pequeña escala, utilizando métodos de multiplicación asexual (es-

quejes) presentando muchas dificultades y costos elevados, por lo que no se dispone de este material o de plantas injertadas.

De todos los factores de producción, los materiales genéticos son el punto crítico para establecer huertos homogéneos libres de plagas y enfermedades. Muchas variedades de frutales se producen sobre porta injertos francos que presentan huertos heterogéneos, asociados a problemas de agalla de corona y nematodos. Como alternativa a este problema diversos centros de mejoramiento de varios países desarrollaron porta injertos híbridos con determinadas características, que solucionen problemas de tolerancia y/o resistencia a enfermedades, plagas y algunos problemas que se presentan en el suelo (encharcamiento, replante, salinidad y otros). Algunos de estos portainjertos son: GxN 15 Garnem, Cadaman Avimag, INRA-GF-677.

En la actualidad en los valles solo se tiene difundido el híbrido GxN 15, que en los últimos años mostró buen vigor, buen rendimiento, buena sanidad, adaptación a variantes de suelo y afinidad con muchas variedades de durazno. La propagación vegetativa de este portainjerto, permite una alta pureza varietal y sanidad vegetal, es por este método que se obtiene individuos idénticos a sus progenitores, acarreamos las características más importantes que se pueden aprovechar de un portainjerto, transmitiendo buen comportamiento en el suelo, buen vigor a las variedades injertadas, buena sanidad, y por sobre todo un alto rendimiento productivo.

Esta investigación busca lograr el establecimiento exitoso de los segmentos nodales de verano del porta injerto GxN (Garfield – Nemared), en la fase de establecimiento in vitro que es la base para poder lograr la micropropagación de plantines de GxN, en menor tiempo y de esta manera poder brindar al sector agropecuario una alternativa para obtener porta injertos de duraznos con calidad sanitaria y pureza varietal, minimizando los riesgos de infestación fitosanitarios, aseguran-

do la propagación de plantas aptas para una producción temprana, y de esta manera establecer bases para dar solución a una necesidad urgente del fruticultor.

2. Objetivos

2.1. Objetivo General

Desarrollar un protocolo para el establecimiento “in vitro” del portainjerto GxN (*Garfield – Nemared*), en el laboratorio de fitopatología y Cultivos *in vitro* de la Facultad de Ciencias Agrícolas y Forestales de la UAJMS.

2.2. Objetivos Específicos

- ⊙ Evaluar la respuesta del GxN (*Garfield – Nemared*), a dos medios de cultivo en la fase de establecimiento.
- ⊙ Evaluar dos concentraciones diferentes de fitohormonas para la fase del establecimiento in vitro del GxN (*Garfield – Nemared*).
- ⊙ Lograr plantas in vitro del GxN (*Garfield – Nemared*), que permitirá proseguir con las siguientes fases de la micropropagación.

3. Materiales y métodos

El presente trabajo de investigación se desarrollará en la zona el Tejar Provincia Cercado departamento de Tarija, en las instalaciones del laboratorio de Fitopatología y Cultivo In Vitro de la Facultad de Ciencias Agrícolas y Forestales de la Universidad Autónoma Juan Misael Saracho.

El material vegetal utilizado fueron yemas axilares de verano, fueron extraídas de las plantas madres de GxN(*Garfield – Nemared*) de la Estación Experimental de Chocloca, ubicado en la provincia Avilés departamento de Tarija.

Se trabajó con el método de cultivo in vitro abarcado la fase 1 (fase de establecimiento).

Se utilizó como base el medio de cultivo Murashige & Skoog, (Tabla N°1).

Fase 0: Preparación de las plantas madres. Para el tratamiento de las plantas madre, realizamos la aplicación con ram-caf 88WP fungicida sistémico a base de oxiclورو de cobre, días antes de la toma de segmentos.

Esta aplicación se realizó para la eliminación de hongos de las plantas madres, esta actividad permite obtener esquejes con menor porcentaje de hongos.

El tratamiento a las plantas madres la realizamos en los tres ensayos.

Fase I: Inicio o establecimiento in vitro. En la fase de inicio se evaluó la respuesta del *Garfield Nemared* a dos medios de cultivo en estudio, un medio sin ácido giberélico y otro medio con ácido giberélico. Se inició con la extracción de los brotes con una longitud aproximadamente de 10 cm con yemas apicales(explantes), los explantes se lavaron con detergente en una solución de 250 ml agregando 3 ml de detergente común ola lava bajillas, posteriormente realizar el enjuagado con agua destilada, posteriormente se introdujeron dentro de la cámara de flujo laminar donde se realizó dos desinfecciones de acuerdo al siguiente protocolo:

Desinfección 1: inmersión en etanol a 70% v/v durante 30 segundos. Para la desinfección final de los segmentos nodales individuales, se introdujeron en una solución de hipoclorito de sodio NaClO al 2 % de solución comercial durante 10 minutos en agitación manual, posteriormente realizamos tres enjuagues, con agua estéril, cada uno de 3 minutos, colocamos los segmentos nodales en una solución de ácido cítrico a 150 mg/L.

Desinfección 2: se agregan 5ml de formol al recipiente hermético, con mucha precaución para evitar algún daño a los segmentos nodales, durante un tiempo de exposición de 10 minutos, después realizamos 1 enjuague con agua estéril, colocamos los segmentos nodales en una solución de ácido cítrico a 150 mg/L. Una vez desinfectados

ESTABLECIMIENTO IN VITRO DEL PORTAINJERTO DE DURAZNO GXN (GARFIELD – NEMARED),
CON BROTES DE VERANO, EN EL LABORATORIO DE CULTIVOS IN VITRO.

los explantes, reducimos el tamaño del explantes, de 1 a 2 cm, eliminamos ambos extremos del segmento, con el tejido quemado en la desinfección, luego el segmento nodal se introducimos en el tubo de ensayo, en los dos medios a probarse, inmediatamente después los tubos de ensayos conteniendo los segmentos nodales fueron colocados bajo condiciones de oscuridad total a $24 \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 7 y 14 días. Posteriormente se ubicaron en cámara de crecimiento con luz artificial con un fotoperiodo de 12 horas luz; a $21^{\circ}\text{C} - 23^{\circ}\text{C}$.

El desarrollo de los explantes se evaluó a los 28 días, se usó el diseño bifactorial, en el primer ensayo se realizó tres repeticiones, en el segundo y tercer ensayo cinco repeticiones, el cual permite evaluar las variables de respuesta que fueron: porcentaje de regeneración al medio de cultivo, porcentaje de contaminación.

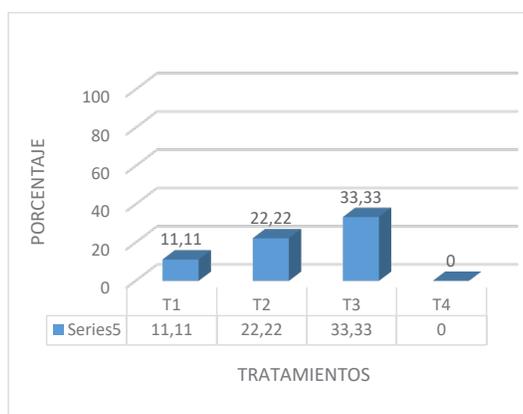
Macronutrientes MS solución madre M1	
(NH ₄) NO ₃	1650 mg/L
MgSO ₄ .7H ₂ O	370 mg/L
KNO ₃	1900 mg/L
KH ₂ PO ₄	170 mg/L
CaCl ₂ .2H ₂ O	440 mg/L
Micronutrientes MS solución madre M2	
FeSO ₄ .7H ₂ O	27,8 mg/L
Na ₂ EDTA	37,3 mg/L
H ₃ BO ₃	6,2 mg/L
MnSO ₄ .4H ₂ O	22,3 mg/L
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,6 mg/L
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,25 mg/L
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025 mg/L
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025 mg/L
KI	0,83 mg/L
Fe EDTA MS solución madre M3	
FeSO ₄ 7H ₂ O	27,88 mg/L
Na EDTA 2H ₂ O	37,30 mg/L
Vitaminas solución madre M4	
Tiamina	100.00 mg/L
Ácido nicotínico	0.500 mg/L
Piridoxina	0.500 mg/L
Compuesto orgánico	
Ácido cítrico	75 mg/L
Agente gelificante	
Sacarosa	30 mg/L
Agar	7.5 mg/L
pH del medio de cultivo	5,7

Tabla N°1

4. Resultados y discusión

Primer ensayo: En el tratamiento T4 estudiado no se observó contaminación por hongos. Los resultados alcanzados con desinfección con formol durante un tiempo de exposición

de 10 minutos permitió reducir la contaminación. Esto demostró la efectividad del pretratamiento a las plantas madre con el fungicida sistémico ram-caf 88WP, una semana previa a la toma de los segmentos nodales.



Gráfica N°1 porcentaje de contaminación a los 28 días.

En la gráfica N°1 se puede observar los porcentajes de contaminación y sus diferencias entre los distintos tratamientos, siendo el tratamiento T4(desinfección con formol), presenta el menor porcentaje de contaminación, T3 (desinfección con hipoclorito de sodio al 2% v/v y alcohol al 70% v/v), presenta mayor porcentaje de contaminación.

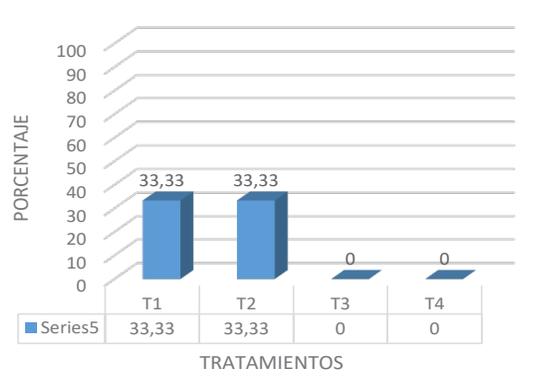


Gráfico N°2 porcentaje de regeneración a los 28 días

En la gráfica N°2 se puede observar que el tratamiento T1 y T2 (medio de cultivo sin ácido giberelico) presenta mayor porcentaje de regeneración, el tratamiento T3 y T4 (medio de cultivo con ácido giberelico) presenta un 0% de regeneración.

Segundo ensayo: En este segundo ensayo no se pudo obtener datos, todos los tubos de ensayo sufrieron contaminación al 100% debido a muchos factores que influyeron en la contaminación. Esto demostró la influencia de la especie y sus características botánicas, que pueden permitir o no mayor acumulación de microorganismos.

Tercer ensayo: En el tratamiento T1 los resultados alcanzados con (desinfección con hipoclorito de sodio al 1% y alcohol al 70%), durante un tiempo de exposición de 10 minutos permitieron reducir la contaminación. Esto demostró la efectividad del pretratamiento a las plantas madre con el fungicida sistémico ram-caf 88WP, una semana previa a la toma de los segmentos nodales

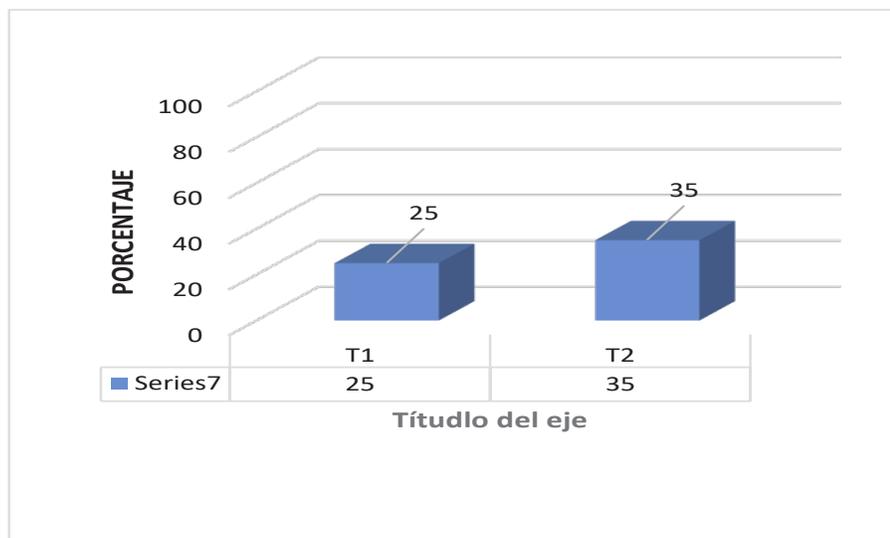


Gráfico N°3 porcentaje de contaminación a los 40 días

En la gráfica N°3 se puede observar los porcentajes de contaminación y sus diferencias entre los distintos tratamientos, siendo el tratamiento T1 (desinfección con hipoclorito de sodio al 1% y alcohol al 70%), presenta el menor porcentaje de contaminación, T2 (desinfección con hipoclorito de sodio al 2% y alcohol al 70%), presenta mayor porcentaje de contaminación.

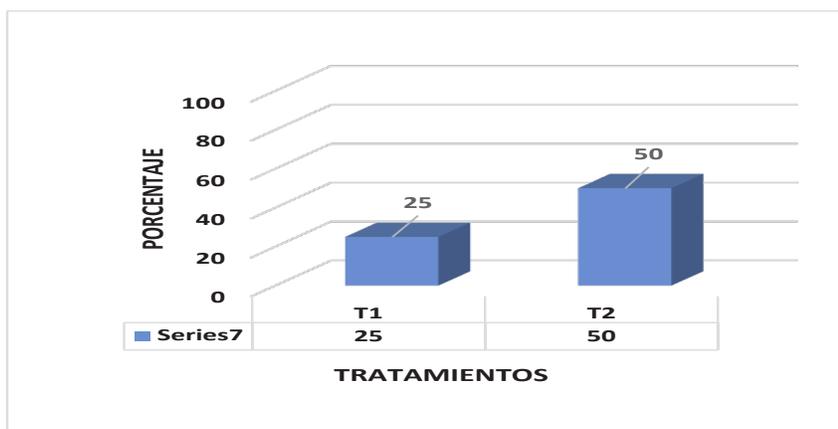


Gráfico N°4 porcentaje de esquejes muertos a los 40 días

En la gráfica N°4 se puede observar los porcentajes de esquejes muertos y sus diferencias entre los distintos tratamientos, siendo el tratamiento T1(desinfección con hipoclorito de sodio al 1% v/v y alcohol al 70%v/v), el que presenta el menor porcentaje de esquejes muertos, el tratamiento T2 (desinfección con hipoclorito de sodio al 2% v/v y alcohol al 70% v/v), presenta mayor porcentaje de esquejes muertos.

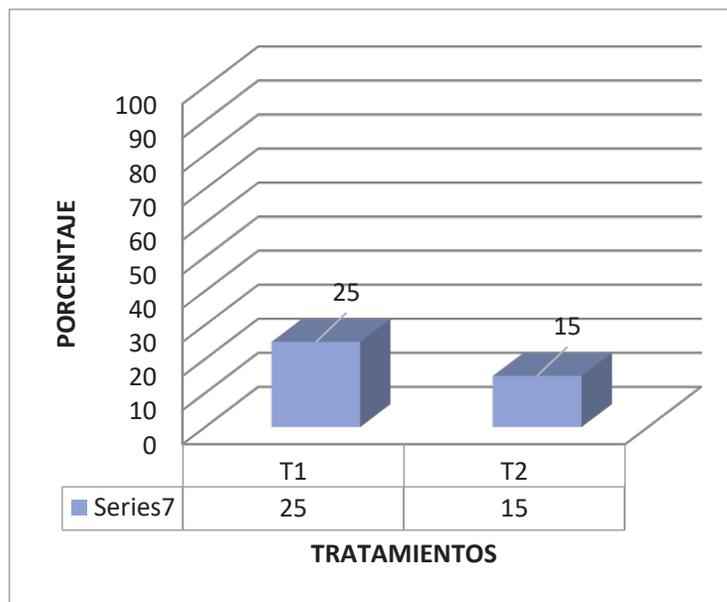


Gráfico N°5 porcentaje de esquejes regenerados a los 40 días.

En la gráfica N°5 se puede observar los porcentajes de esquejes regenerados y sus diferencias entre los distintos tratamientos, siendo el tratamiento T1(desinfección con hipoclorito de sodio al 1% y alcohol al 70%), presenta el mayor porcentaje de esquejes regenerados, T2 (desinfección con hipoclorito de sodio al 2% y alcohol al 70%), presenta menor porcentaje de esquejes regenerados.

El establecimiento de plantas leñosas para su cultivo in vitro es un paso difícil. Sin embargo, en el presente trabajo fue posible alcanzar resultados positivos. La desinfección de los explantes es esencial para el éxito del cultivo in vitro. La contaminación microbiana puede originarse por contaminantes que vienen adheridos a la superficie de los explantes o por fallas en los procedimientos de laboratorio.

5. Conclusiones

- ⊙ La contaminación se presentó de diferente manera en cada ensayo, en el primer ensayo, el tratamiento T4 (desinfección con formol) tuvo el mejor resultado con un 0% de contaminación, en el segundo ensayo se contaminaron las muestras en un 100%, en el tercer ensayo, el tratamiento T1 (desinfección con hipoclorito de sodio al 1% v/v y alcohol al 70% v/v) tuvo el mejor resultado con un 25% de contaminación.
- ⊙ En cuanto al porcentaje de esquejes muertos en el tercer ensayo, el tratamiento T1(medio de cultivo sin hormonas y desinfección con hipoclorito

de sodio al 1% v/v y alcohol al 70% v/v), dio un mejor resultado con un porcentaje del 25% de esquejes muertos.

- ⊙ En cuanto al porcentaje de regeneración en el primer ensayo, el tratamiento T1 (medio de cultivo sin hormonas y desinfección con hipoclorito de sodio al 2% v/v y alcohol al 70% v/v), dio mejor resultado con un porcentaje del 33% de regeneración y T2 (medio de cultivo sin hormonas y desinfección con formol) dio mejor resultado con un porcentaje del 33% de regeneración. En el tercer ensayo, el tratamiento T1 (medio de cultivo sin hormonas y desinfección con hipoclorito de sodio al 1% v/v y alcohol al 70% v/v), dio mejor resultado con un porcentaje del 25% de regeneración.
- ⊙ El bajo porcentaje de regeneración se debe al material vegetal, se utilizó los brotes de verano, las especies leñosas que se caracterizan por tener un tejido lignificado, que proporciona rigidez a la pared celular, esto impide la desdiferenciación celular acompañada de crecimiento tumoral, que da lugar a una masa de células denominada callo o una respuesta morfogénica por la cual se forman órganos, la cual influye en la regeneración de las plantas leñosas, y en nuestro ensayo.

6. Bibliografía

- 🔖 Centellas A, Álvarez V, Acuña E, Rocha E, Maita E (2011). Manual de propagación de plantines de duraznero y manzano bajo invernadero. Fundación PROINPA, Cochabamba; ISBN: 978-99954-743-9-3
- 🔖 Coca MM (2011). La agalla de corona del duraznero en Cochabamba. Revista de Agricultura Bolivia.
- 🔖 COTEVISA, F. (2010). Descripción del Híbrido GXN 15. Disponible en: <http://www.cotevisa.com/tecnologia/garnem-g-x-n>
- 🔖 COTEVISA (2015). Características del híbrido Garnem. Disponible en: <http://www.cotevisa.com/tecnologia/garnem-g-x-n>
- 🔖 FDTA valles, (2011). Durazno, Manual del Cultivo. Cochabamba – Bolivia.
- 🔖 Kempff SF, Vargas MR, Rivadeneira CF, Barba AL (2015). Panorama y perspectivas de la fruticultura cruceña Eco-región Valles. Editorial DUI-UAGRM Universidad Autónoma Gabriel Rene Moreno, Santa Cruz de la Sierra; ISBN: 978-99974-51-01-9
- 🔖 LEMUS, G. VALENZUELA, J. (1993). El duraznero en Chile – Propagación y porta injerto. Instituto de investigaciones Agropecuarias. INA. Editorial Andes. Santiago de Chile.
- 🔖 LÓPEZ, M. (1996). Estudio de la expresión genética durante la embriogénesis somática en *Saccharum officinarum* y su relación con el ácido abscísico y la sequía. Universidad complutense de Madrid. Facultad de Ciencias Biológicas. Departamento de Genética. España

- ❏ LÓPEZ, R. (2009). Micropropagación vegetal. Armenia, Quindío. Arte Imagen.
- ❏ López, R. (2010). Micropropagación in vitro de cultivos de Gulupa (*Passiflora edulis* Sims) por meristemos y yemas. Tesis de grado. Bogotá. Universidad Nacional de Colombia.
- ❏ MARQUÍNEZ, J. (1998). Aporte a la recuperación de especies vegetales en extinción por micropropagación: Raque (*Vallea stipularis*). Bogotá. Corporación Autónoma Regional de Cundinamarca. CAR.
- ❏ Murashige, T. y F. Skoog. (1962). revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum*