



SALVAGUARDA DEL GERMOPLASMA PARA MANZANA EMILIA (*malus communis* l. Subsp. REINETA AMARILLA DE BLENHEIM) POR CULTIVO DE TEJIDOS *in vitro*

SAFEGUARD OF EMILIA APPLE GERMOPLASM (*malus communis* l. Subsp. YELLOW PIPPIN OF BLENHEIM) BY IN VITRO TISSUE *grolwing*

Sebastián Yáñez*, Valdano Tafur, Lenin Rosero

Facultad de Ciencias Agrícolas. Universidad Central del Ecuador, Av. Universitaria, 170129, Quito, Ecuador.

*Autor para correspondencia: sgyanecz@uce.edu.ec / sebas25ec@yahoo.com

Manuscrito recibido el 17 de enero de 2017. Aceptado, tras revisión, el 6 de agosto de 2017. Publicado el 1 de septiembre de 2017.

Resumen

Es de gran importancia mantener la diversidad genética de los materiales tradicionales y de plantas silvestres. Se realizó la salvaguarda del germoplasma de manzana Emilia, utilizando técnicas de cultivo de tejidos *in vitro*. Se evaluaron dos medios de cultivo y seis concentraciones para desinfección; además, de ocho tratamientos para brotación, utilizando distintas concentraciones de 6-bencilaminopurina (BAP) y para enraizamiento cuatro tratamientos con ácido indol butírico (IBA). Se utilizó un DCA con un arreglo factorial 2×4 con seis observaciones. Se evaluó: porcentajes de contaminación, de oxidación, viabilidad, días a la brotación, número de brotes y longitud de brotes. Los tratamientos iguales y superiores al 10% de NaClO durante 10 minutos presentaron valores adecuados de no contaminación de explantes. La menor cantidad de explantes oxidados presentaron correlación directamente proporcional en las respuestas a menor concentración y tiempo de exposición. El mayor porcentaje de explantes viables (77%) se expresó en el tratamiento de NaClO al 10% durante 15 minutos. Las mejores respuestas en cuanto a la variable días a la brotación se presentó en los tratamientos sin intervención del BAP. La mejor respuesta en cuanto al número de brotes se manifestó para el tratamiento 1 ppm de BAP en los medios de cultivo (Murashige y Skoog modificado - MSM y Medio CHU 10 Modificado por Gerloff). La mejor respuesta en el tamaño del brote se expresó en el tratamiento CHU + 1 ppm de BAP. Los tejidos celulares de la manzana Emilia presentan alta susceptibilidad a contaminantes microbianos y a la oxidación de tejidos, por lo cual dificulta la multiplicación por medio de cultivo *in vitro*. Las altas concentraciones de BAP inhiben respuestas fisiológicas espontáneas en explantes de la manzana Emilia, especialmente en etapas iniciales donde existe mayor producción de efectos hormonales intrínsecos.

Palabras claves: Medios de cultivo, fitohormonas, conservación botánica, micropropagación.

Abstract

It is of great importance to maintain the genetic diversity of traditional materials and wild plants. The Emilia apple germplasm was safeguarded, using in vitro tissue culture techniques. Two culture media and six concentrations were evaluated for disinfection; in addition, eight treatments for budding, using different concentrations of 6-benzylaminopurine (BAP) and for rooting four treatments with indole butyric acid (IBA). We used a DCA with a 2 x 4 factorial arrangement with six observations. The percentages of contamination, oxidation, viability, days at sprouting, number of shoots and length of shoots were evaluated. Treatments equal to and greater than 10% NaClO for 10 minutes had adequate values of non-contamination of explants. The lower number of oxidized explants had a direct proportional correlation in the responses to less concentration and time of exposure. The highest percentage of viable explants (77%) was expressed in 10% NaClO treatment for 15 minutes. The best responses regarding the variable days to budding were presented in the treatments without BAP intervention. The best response in the number of outbreaks was manifested for the 1 ppm BAP treatment in the culture media (Murashige and Skoog modified - MSM and Modified CHU 10 by Gerloff). The best response in the size of the outbreak was expressed in the treatment CHU + 1 ppm BAP. The cellular tissues the Emilia apple show high susceptibility to microbial contaminants and the oxidation of tissues, which makes it difficult to multiply by in vitro culture. High concentrations of BAP inhibit spontaneous physiological responses in explants of the Emilia apple, especially in the early stages where there is greater production of intrinsic hormonal effects.

Keywords: Culture media, plant hormones, botanical conservation, micropropagation.

Forma sugerida de citar: Yáñez, S., Tafur, V., Rosero, L. 2017. Salvaguarda del germoplasma para manzana emilia (*malus communis l. Subsp. Reineta amarilla de blenheim*) por cultivo de tejidos *in vitro*. La Granja: Revista de Ciencias de la Vida. Vol. 26(2):52-63. pISSN:1390-3799; eISSN:1390-8596.

1 Introducción

Los recursos fitogenéticos son la base de la soberanía alimentaria; por ello, es de suma importancia mantener la diversidad genética de las variedades tradicionales y regionales, de los cultivares mejorados y de las plantas silvestres. La diversidad genética provee a los agricultores y mejoradores opciones para desarrollar nuevos cultivares o híbridos, los cuales pueden ser más productivos, tener mejores características de fruto, flor o estructura de la planta, niveles de resistencia o tolerancia a patógenos y/o condiciones ambientales desfavorables.

Aunque hay más de 10 000 cultivares de manzana documentados en todo el mundo y la zona de producción de manzanas está muy extendida geográficamente, la producción mundial está dominada por relativamente pocos cultivares, muchos de los cuales están estrechamente relacionados (Janick y Moore, 1996; Hokanson et al., 2001). En el último siglo, a pesar de la existencia de un gran número de programas de mejoramiento de manzanas en todo el mundo, sólo unos pocos genotipos han sido bien adaptados (por ejemplo, "Red Delicious", "Golden Delicious", "Jonathan", "McIntosh" y "Cox 'S Orange Pippin"), los cuales han sido ampliamente utilizados en programas de mejoramiento para liberar nuevas variedades con rasgos deseables (Noiton y Alspach, 1996; Hokanson et al., 2001; Laurens et al., 2010). La sustitución gradual de los cultivares tradicionales y localmente bien adaptados por unas pocas variedades modernas ampliamente difundidas ha llevado a una dramática pérdida de diversidad genética en los huertos y puede obstaculizar la futura reproducción vegetal (Laurens et al., 2010).

La diversidad genética de los cultivos, se está perdiendo a un ritmo alarmante; esta pérdida plantea cuestiones socioeconómicas, éticas y políticas (Esquinas, 2005). A principios del siglo XX en España, como en el resto de Europa, los manzanos cultivados eran preferentemente variedades locales tradicionales, las cuales, junto con las formas silvestres, representaban la diversidad genética del cultivo (Itoiz, 2000). En los años 60 se introdujeron en América, España y en el resto de Europa nuevas variedades americanas de manzana y se pasó de los huertos familiares, en los que se cultivaban varias especies y muchas variedades, a plantaciones monovarietales o, como máximo, con una principal y otra polinizadora. En los últimos años se ha llegado a la práctica desaparición de numerosas variedad

des autóctonas que, si bien adolecen de tener efectos tales como bajos rendimientos de cosecha, calibres escasos de fruta y tendencia a la vejería; presentan valores de gran importancia como pueden ser la adaptación al medio, niveles de resistencia a enfermedades y la calidad organoléptica. A este proceso de pérdida de variabilidad, en definitiva de genes, por la presión de los nuevos cultivares es lo que se denomina erosión genética; además, la industrialización agrícola, las tecnologías de revolución verde, los cambios ambientales y los conflictos civiles, que han sido citados como contribuyentes a la erosión de la biodiversidad de los cultivos criollos de manzana (Goland y Bauer, 2004).

El cambio varietal ha sido tan rápido que muchas variedades, autóctonas o no, han desaparecido sin dejar rastro de sus genes y no se podrán recuperar nunca, salvo que se consiga por medio de la ingeniería genética o recurriendo a los bancos de germoplasma. La erosión genética es un proceso continuo y generalizado a nivel mundial (Priolli et al., 2004). Los cambios en el genoma pueden suponer cambios en el número de cromosomas (mutaciones genómicas), en algún cromosoma (mutaciones cromosómicas), o en algún gen (mutaciones génicas). Es conocida la prolífica genealogía agámica de la variedad Delicious cuyo clon originario se descubrió a finales del siglo XIX y hoy se conocen más de 200 mutaciones del original o de alguno de sus mutantes (Forsline et al., 2003).

La manzana variedad Emilia es una fruta emblemática y representativa de la provincia de Tungurahua-Ecuador; ha llegado a concebirse como símbolo de cultura y tradición entre sus pueblos. En décadas ha disminuido el cultivo por factores de importación de fruta de otras variedades, baja productividad, descuido por parte de autoridades y continuas erupciones volcánicas; factores que conllevan la pérdida de diversidad frutícola en el país (Lara, 2009).

Las variedades unicoloras rojas y verdes suponen hoy en día más de la mitad del consumo per cápita de manzana. Estas variedades han desplazado casi completamente a las tradicionales con el correspondiente riesgo de su desaparición que, además se ve aumentado por el hecho del creciente abandono o la urbanización de muchas fincas. Para evitar este problema, o al menos minimizar al máximo esta pérdida, se está fomentando la creación de bancos de germoplasma, para la conservación del material genético, que quizás tenga gran utilidad en un futu-

ro próximo (Laurens et al., 2010).

El mantenimiento del material y de la variabilidad genética de las colecciones puede hacerse in situ o ex situ. La conservación in situ supone que se realiza en las zonas naturales en las que se ha desarrollado naturalmente el germoplasma, y en el caso de variedades cultivadas, en las inmediaciones de la zona donde han adquirido sus distintivas propiedades. Por otro lado, este tipo de bancos tiene también el inconveniente de que es necesario mucho espacio y trabajo de mantenimiento y, por ello, se han propuesto estudiar nuevos métodos alternativos de conservación, tales como la crio conservación de yemas en reposo o la conservación de plantas in vitro (Towill et al., 2004). El National Plant Germplasm System ha llevado a cabo ensayos de viabilidad de yemas de manzano conservadas en N2 líquido desde 1992 y después de ocho años de almacenamiento no ha observado que la viabilidad disminuya, ya que han conseguido recuperar el 98% de las variedades guardadas de esta forma (Forsline et al., 2003).

La micro propagación consiste en la multiplicación de un genotipo a gran escala a través del empleo de técnicas de cultivo in vitro. El cultivo in vitro es una herramienta para el mejoramiento, en el mismo se generan plantas de calidad uniforme a escala comercial, a partir de un genotipo selecto y con una tasa de multiplicación ilimitada (Druart, 1997). La micro propagación de manzana ha jugado un papel importante en: producción de plantas sanas, libres de enfermedades y en la rápida multiplicación de esquejes y porta injertos con características deseables, éxito que se lo obtiene con meristemos pre-existentes (cultivo de yemas apicales o segmentos nodales), siendo la técnica que ha trascendido con éxito de los ámbitos experimentales a la práctica (Engelmann, 2011).

El cultivo de tejidos involucra el crecimiento de células y tejidos in vitro en condiciones asépticas. Es una herramienta muy útil ya que, una vez establecidos los cultivos, están disponibles en cualquier momento para el investigador y el tiempo necesario para llevar a cabo experiencias determinadas puede reducirse considerablemente al compararlo con el uso de plantas enteras. La relativa homogeneidad de los cultivos y la facilidad con que las condiciones pueden estandarizarse (composición del medio de cultivo, parámetros nutricionales, niveles de reguladores de crecimiento, adición de efectores), los mismos que promueven a conseguir la reproducibi-

lidad de los resultados (Bajji y Druart, 2011).

Para proveer a los explantes las condiciones adecuadas de replicación en medio in vitro, se han desarrollado técnicas que permiten mantener una alta diversidad en espacios reducidos, en condiciones asépticas y a salvo de los riesgos ambientales que podrían provocar pérdida (Hao et al., 2001). Es posible la multiplicación gracias a la propiedad de totipotencia que tienen las células vegetales, esta es la capacidad de regenerar una planta completa cuando está sujeta a estímulos adecuados, así las células somáticas de cualquier tejido podrían formar tallos, raíces o embriones somáticos de acuerdo con la competencia que posean y al estímulo que recibían (Engelmann, 2011).

Dentro de los principales problemas que podrían presentar las técnicas del cultivo in vitro, se encuentra la Fenolización; en la misma los explantes frecuentemente son marrones o negruzcos poco después del aislamiento. Cuando esto ocurre inhibe el crecimiento y el tejido generalmente muere. Los tejidos jóvenes son menos susceptibles al oscurecimiento que los más maduros (Bajji y Druart, 2011). La Vitricación, también denominada hiper hidratación o translucidez, ocurre en los tejidos vegetales que disponen de gran cantidad de agua, el material vegetal joven y tierno es más susceptible a la vitricación y el grado de translucidez está asociado a altos niveles de Citoquininas, la deficiencia en el intercambio gaseoso, la baja irradiación lumínica, las altas temperaturas y baja concentración de agar o azúcares del medio (Gagliardi et al., 2003). La incidencia de patógenos in vitro, son uno de los problemas más importantes en el desarrollo de la biotecnología vegetal, especialmente en el cultivo de células y tejidos. El efecto de los microorganismos contaminantes sobre las vitro plantas puede ser considerable si se tiene en cuenta que compiten por los nutrientes del medio y les provocan daños directos e indirectos por la colonización de sus tejidos y por la expulsión al medio de metabolitos tóxicos, pudiendo llegar a reducir los coeficientes de multiplicación, inhibir el enraizamiento y ocasionar la muerte del explante (Habiba et al., 2002).

Los medios de cultivo deben ser provistos de elementos físico-químicos que constituyen la sustancia nutritiva de diversa consistencia (sólida a líquida), las mismas que suministran nutrición y estimulación en el desarrollo del explante.

Las Auxinas comprenden una gran familia de sustancias que tienen en común la capacidad de

producir un agrandamiento y alargamiento celular. Las más utilizadas en el cultivo de tejidos son el ácido indolacético (AIA), ácido naftalenacético (ANA), 2,4-D, picloram (Fernández et al., 2009). Para el uso de las Auxinas no es posible establecer una concentración particular que se debe manejar en un solo caso. Sin embargo, en general se utiliza AIA en concentraciones que varían de 0,001 a 10 ppm, con un punto óptimo alrededor de 0,1 a 1 ppm; 2,4-D se utiliza en concentraciones que varían de 0,1 a 10 ppm, con un punto óptimo que frecuentemente se encuentran alrededor de 1 a 5 ppm; el ANA generalmente se utiliza en concentraciones levemente mayores de 1 a 10 ppm, con un punto óptimo cerca de 2 ppm (Martin, 2003).

Las Citoquininas se utilizan frecuentemente para estimular el crecimiento y el desarrollo; siendo las más comunes: Kinetina, N6-benciladenina (BA), N6-isopentenil-adenina (2iP), y 6-bencilaminopurina (BAP). Generalmente estimulan la división celular. Promueven la formación de vástagos axilares, porque disminuyen la dominancia apical; también retardan el envejecimiento. Se emplean en investigación entre de 0,01 a 10 ppm. En muchos medios de cultivo el Sulfato de Adenina resulta beneficioso y a menudo se adiciona a razón de 40 a 120 ppm. Todos estos materiales se deben preparar con anticipación y conservarse en refrigeración como soluciones concentradas (Gao et al., 2009).

En búsqueda de nuevas alternativas que aporten a la economía agrícola de la zona central del Ecuador y la consecuente salvaguarda de una de las principales frutas representativas cultivadas, como es la manzana, variedad Emilia (*Malus communis* subsp. *Reineta* Amarilla de Blenheim), que presenta cualidades apetecidas por el consumidor final como: jugosidad, dulzura, sabor e identidad local, se realizó la presente investigación.

1.1 Materiales y Métodos

Los explantes utilizados fueron colectados de huertos frutales mixtos localizados en el Barrio Huaynacuri, parroquia San Miguelito, cantón Pillaro, provincia Tungurahua, Ecuador ($1^{\circ} 13' 63''$ Lat. y $78^{\circ} 32' 8''$ Long.). Se colectaron muestras de yemas seleccionadas in situ, de plantas proveedoras o donadoras de explantes, los cuales mostraban características fenotípicas deseadas como: numerosos nuevos de yemas apicales, follaje perenne y denso,

plantas vigorosas, visiblemente sanas, libres de bacterias, hongos, virus y ácaros. Colectadas las muestras, se colocaron en fundas plásticas tipo Ziploc®, con una pequeña cantidad de agua destilada estéril para evitar su marchitamiento y reducir el proceso de deterioro fisiológico del material vegetal. Se protegió las bolsas con empaques de cartón para evitar daños mecánicos durante el transporte al laboratorio. El trabajo se efectuó en el Laboratorio de Biotecnología Agrícola de la Facultad de Ciencias Agrícolas de la Universidad Central del Ecuador (FCAUCE), Campus Universitario en Quito, las siembras y repiques se realizaron en cámara de flujo laminar, los ensayos permanecieron en el cuarto de cultivo en condiciones de crecimiento controladas. Las variables evaluadas en los explantes fueron: porcentaje de contaminación, porcentaje de oxidación, porcentaje de viabilidad, días a la brotación, número de brotes (a los 60 días luego del repique), longitud del brote (60 días del repique, se midió desde la base del brote hasta la yema apical), porcentaje de brotes enraizados.

En el laboratorio se seleccionaron yemas apicales en mejor estado, se les retiró la parte caulinar fresca y partes dañadas, luego se cortaron segmentos de 40 a 50 mm de longitud, estas yemas fueron colocadas en vasos de precipitación con agua destilada hasta el tiempo que inicie la fase de desinfección. Una vez obtenidos los explantes se realizaron dos lavados con agua potable y 2 mL 100 mL^{-1} de Tween®20. Se mantuvo en constante agitación durante 10 minutos, posteriormente se realizó tres enjuagues utilizando agua destilada. Después, se realizó la inmersión de los explantes en soluciones independientes de: Mancozeb ($2,5 \text{ g } 500 \text{ mL}^{-1}$) y Sulfato de Cobre Pentahidratado ($3 \text{ mL } 500 \text{ mL}^{-1}$) en agua, respectivamente; en los dos casos durante 20 minutos en agitación en plato calentador, luego de ello se realizaron tres lavados de dos minutos cada uno utilizando agua destilada. En la Campana de Flujo Laminar Vertical Labconco®3970424 se introdujo los explantes en etanol al 70% durante 30 segundos, en seguida se realizó tres enjuagues de un minuto, utilizando agua destilada estéril, posteriormente se realizó la inmersión de los explantes en Hipoclorito de Sodio, probando los diferentes tratamientos de desinfección. Luego de ello se realizó tres enjuagues con agua destilada estéril de un minuto cada uno, para finalmente realizar inmersión de los explantes en una solución de ácido Cítrico ($0,3 \text{ g } \text{L}^{-1}$) durante el tiempo que dure la siembra.

La modificación al medio MSM fue la adición de Vitamina B5 y el Medio CHU 10 se mantuvo tal cual fue modificado por Gerloff. Las variables evaluadas para los explantes fueron: Porcentaje de Contaminación (se determinó la presencia de hongos y bacterias en el medio de cultivo o el explante), de Oxidación, Viabilidad; todas ellas valoradas, durante 3 semanas una vez por semana. Se establecieron tres repeticiones en distintos tiempos para cada variable.

Se realizaron bioensayos para la evaluación de la contaminación en los explantes, utilizando 3 g L^{-1} de detergente comercial (componentes: tensioactivos, potenciadores, enzimas, blanqueadores, perfumes, relleno y abrillantadores ópticos) más la adición de $6 \text{ mL } 100 \text{ mL}^{-1}$ de Tween 20® y al final del proceso de lavado se aplicó etanol al 70% durante 30 segundos. Se probaron distintas concentraciones de Hipoclorito de Sodio en tiempos incrementales. En cuanto a las fases de brotación se evaluaron dos tipos medios de cultivo con distintas concentraciones de la hormona BAP (Tabla 1).

Para el análisis estadístico de los datos se empleó la prueba de Chi cuadrado para la primera fase (bio ensayos adaptación). Se realizaron 15 observaciones; para la segunda fase (bio ensayos enraizamiento), se utilizó un Diseño Completamente al Azar (DCA) con un arreglo factorial 2×4 con seis observaciones y estadística descriptiva para la tercera fase (adaptación a sustrato), con seis observaciones. El análisis estadístico fue realizado con el programa estadístico SPSS versión 2.0. Para determinar la diferencia de medias se utilizó la prueba de HSD de Tukey con el 5% de significancia.

2 Resultados y discusión

2.1 Porcentaje de contaminación

El menor porcentaje de contaminación en los explantes (17%) se obtuvo con el tratamiento t6 (15% de NaClO durante 15 minutos); al contrario del tratamiento t1 (5% de NaClO durante 10 minutos) que generó el 63% de contaminación fue la respuesta más alta. Valores iguales o superiores al 10% de NaClO por un periodo de 10 minutos se obtienen respuestas constantes en cuanto a la presencia de explantes no contaminados (Figura 1).

Bajji y Druart (2011) determinaron que con hipoclorito de sodio y de calcio no es efectiva la desinfección de explantes de Prunus derivados de ár-

boles adultos crecidos bajo condiciones de campo, comparado con las plantas madre que crecen bajo invernadero. Otro factor a tomar en cuenta es la pubescencia del tejido. Habiba et al. (2002) expresaron que "si el tejido es pubescente, debe hacerse un prelavado con detergente o etanol al 70% durante 30 segundos para romper la tensión superficial y hacer accesible a la acción de los agentes desinfectantes". Como parte de bioensayos se obtuvieron buenos resultados realizando dos prelavados con el detergente comercial y la adición de Tween 20®.

Druart (1997) menciona que los métodos de desinfección utilizados no siempre eliminan las poblaciones de bacterias asociadas a los tejidos de las plantas in vivo; muchas son capaces de permanecer latentes en los espacios intercelulares o en los haces conductores, quedando protegidas de los agentes químicos. También la contaminación podría estar relacionada a la presencia de hongos endógenos adquiridos por la planta en su ambiente natural.

2.2 Porcentaje de oxidación

Se analizó la variable oxidación en cada uno de los tratamientos donde se evidencia que el tratamiento t1 (5% NaClO x 5 minutos) alcanza el mayor porcentaje de explantes libres de oxidación (80%), seguido del tratamiento t4 (10% NaClO x 15 minutos) (Figura 2). El cloro actúa como un bactericida potente debido a que forma ácido hipocloroso al mezclarse con el agua y el oxígeno liberado en esta reacción es un agente oxidante muy fuerte, al mismo tiempo que los microorganismos son destruidos ya que puede modificar grupos funcionales, inactivando proteínas enzimáticas. El cloro puede penetrar por las heridas y a concentraciones altas puede producir un efecto tóxico, inclusive puede causar la muerte del tejido vegetal por necrosis.

Según Druart (1997), cuando los tejidos son dañados se liberan compuestos fenólicos, que se manifiestan con un ennegrecimiento del medio de cultivo alrededor del explante y que se puede extender a todo el medio, provocando daños al crecimiento y hasta la muerte del explante. Mediante la adición de carbón activado ($1 \text{ a } 3 \text{ g L}^{-1}$) al medio de cultivo es posible remover compuestos fenólicos y sustancias inhibitorias o tóxicas del medio de cultivo que son producidas durante el autoclavado, evitando o disminuyendo el deterioro del explante.

Como parte de los bioensayos, se obtuvieron buenos resultados adicionando al medio de cultivo

Tabla 1. Tratamientos para los ensayos de desinfección y brotación

Codificación Explantos	Descripción	Codificación Brotación	Descripción
t1	5 % NaClO + 10 min.	t1	CHU + 0 ppm de BAP
t2	5 % NaClO + 15 min.	t2	MSM + 0 ppm de BAP
t3	10 % NaClO + 10 min.	t3	CHU + 0,5 ppm de BAP
t4	10 % NaClO + 15 min.	t4	MSM + 0,5 ppm de BAP
t5	15 % NaClO + 10 min.	t5	CHU + 1 ppm de BAP
t6	15 % NaClO + 15 min.	t6	MSM + 1 ppm de BAP
		t7	CHU + 1,5 ppm de BAP
		t8	MSM + 1,5 ppm de BAP

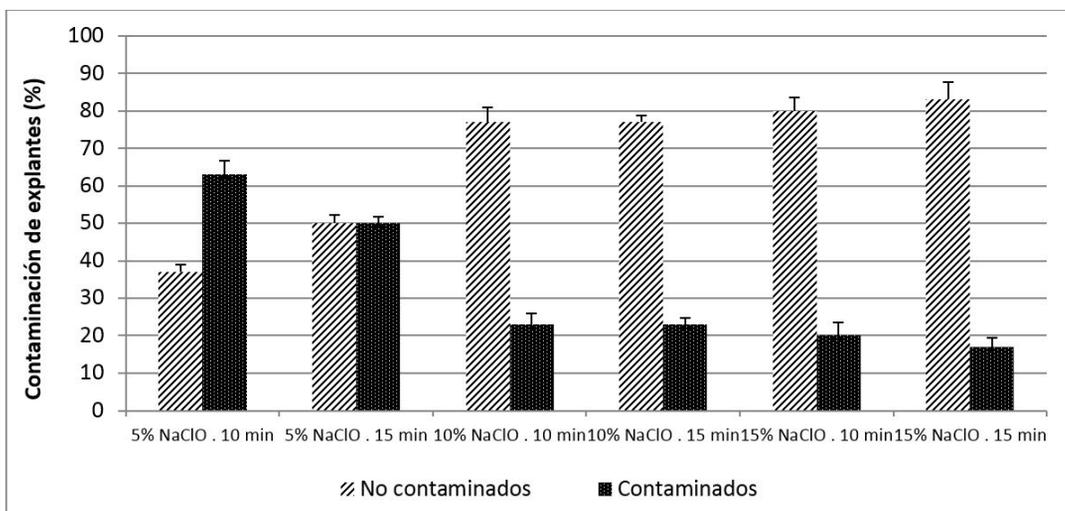


Figura 1. Porcentaje de explantes contaminados de manzana Emilia de acuerdo a cada tratamiento de desinfección

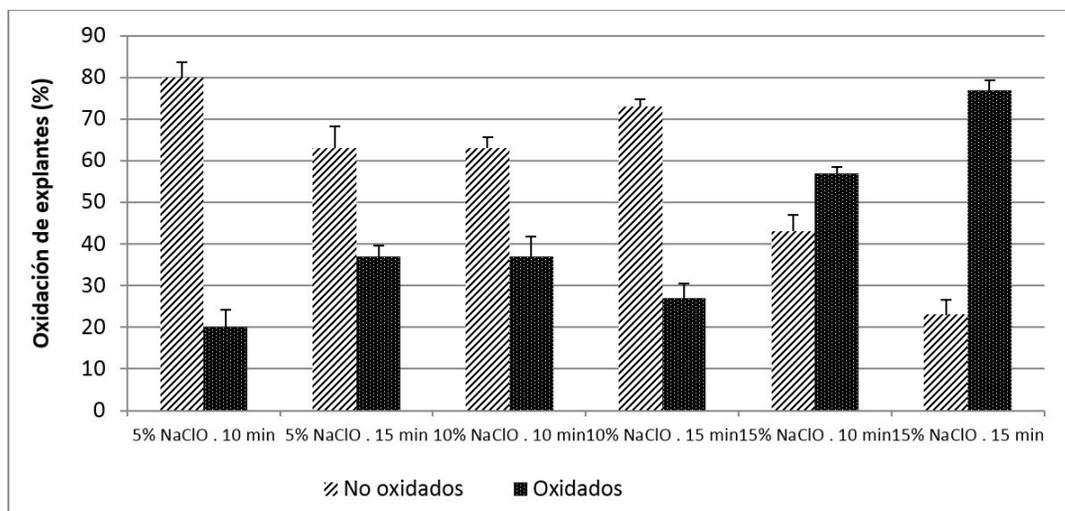


Figura 2. Porcentajes de explantes oxidados de manzana Emilia

1 g L⁻¹ de carbón activado y 1 g L⁻¹ de polivinilpirrolidona (PVP), resultados que coinciden con lo obtenido por Senula y Keller (2000). Se pudo comprobar que es propicia para inhibición del efecto de oxidación la adición de ácido cítrico (0,3 g L⁻¹) sumergiendo los explantes al final del proceso de desinfección.

2.3 Porcentaje de viabilidad

La viabilidad de los explantes fue determinada por los dos factores: tiempo de exposición y concentración de hipoclorito de sodio. El tratamiento t4 (10% NaClO x 15 minutos) permitió obtener el 77% de explantes viables, siendo el más alto (Figura 3). Después, el número de explantes contaminados se reducen considerablemente con el aumento de la concentración del cloro; a pesar de que, esto resulta favorable, también se consideró el número de explantes oxidados, los mismos que aumentaban conforme se incrementaban las concentraciones de hipoclorito de sodio evaluadas. Así, se determinó que el tratamiento de 10% de hipoclorito de sodio por 15 minutos como el mejor tratamiento en desinfección, puesto que permite obtener un moderado porcentaje de contaminación (23%), oxidación (27%) y el mayor porcentaje de explantes viables (77%); resultados que se acercan efectivamente a lo divulgado por Engelman (2011), quien obtuvo un rango del 70 al 100% de explantes viables con similares protocolos de desinfección; de tal manera que, en la práctica y como parte del rescate de germoplasma de manzana de la var. Emilia, el mejor tratamiento no es aquel que menos explantes contaminados presente, sino aquel que obtiene mayor cantidad de explantes viables.

2.4 Días a la brotación

En el Tabla 2, para el Análisis de Varianza (ADEVA) para esta variable, se encontró diferencias altamente significativas en las concentraciones de BAP y para cada uno de los polinomios ortogonales. El promedio general fue 16,12 días y el coeficiente de variación fue 11,01%.

De los polinomios ortogonales se destaca la tendencia lineal, puesto que conforme se incrementa la concentración de BAP aumentan también los días a la brotación y por ende el retardo en la emergencia de yemas. Estos resultados se deben posiblemente a que esta variedad de manzana tiene elevada

acumulación de hormonas endógenas, por lo que el tratamiento testigo presentó los mejores resultados; en conformidad a lo expresado por Itoiz (2000), quien manifiesta que las citoquininas per se inducen la formación y brotación de yemas adventicias y el desarrollo de yemas axilares, por lo que los requerimientos exógenos de hormonas dependen de los niveles endógenos de cada planta.

De igual manera en el Tabla 3 se puede apreciar que existen siete rangos de significación estadística para esta variable, presentándose las mejores respuestas en los tratamientos sin aplicación de BAP, lo cual corrobora con estudios previos sobre la totipotencialidad de las células presentes en las hormonas endógenas (Verdeil et al., 2007).

2.5 Número de brotes

En el ADEVA (Tabla 2) se encontró diferencias altamente significativas para concentraciones de BAP y para los polinomios ortogonales cuadráticos y cúbicos. El promedio general fue 2 brotes por explante y el coeficiente de variación fue 26,45%. De los polinomios ortogonales se destaca la tendencia cuadrática, en donde el efecto de los compuestos hormonales se ve reducido por el exceso en su concentración.

Para esta variable se presentó tres rangos de significación estadística (Tabla 3). Se obtuvieron las mejores respuestas en los tratamientos con aplicación de 1 ppm de BAP, con similar promedio para cada uno (2,33 brotes explante-1); resultados que son aceptables si comparamos el índice de multiplicación por yemas axilares para otros cultivares de manzano que está en la relación 1:3 como es el caso del patrón clonal MM 106 (Forsline et al., 2003).

El número de brotes está influenciado por la relación auxina:citoquinina. Numerosos reportes indican que otros factores están también involucrados en la vía organogénica, entre ellos otros reguladores del crecimiento tales como las giberelinas (que suprimen la iniciación de los brotes o raíces) y el etileno endógeno (que bloquea la iniciación de la organogénesis pero promueve el crecimiento y diferenciación de los primordios de yemas o raíces preexistentes (Towill et al., 2004).

2.6 Longitud de brotes

En el ADEVA (Tabla 2) se obtuvo diferencias altamente significativas para medios de cultivo y concentraciones de BAP. El promedio fue 3,13 cm de

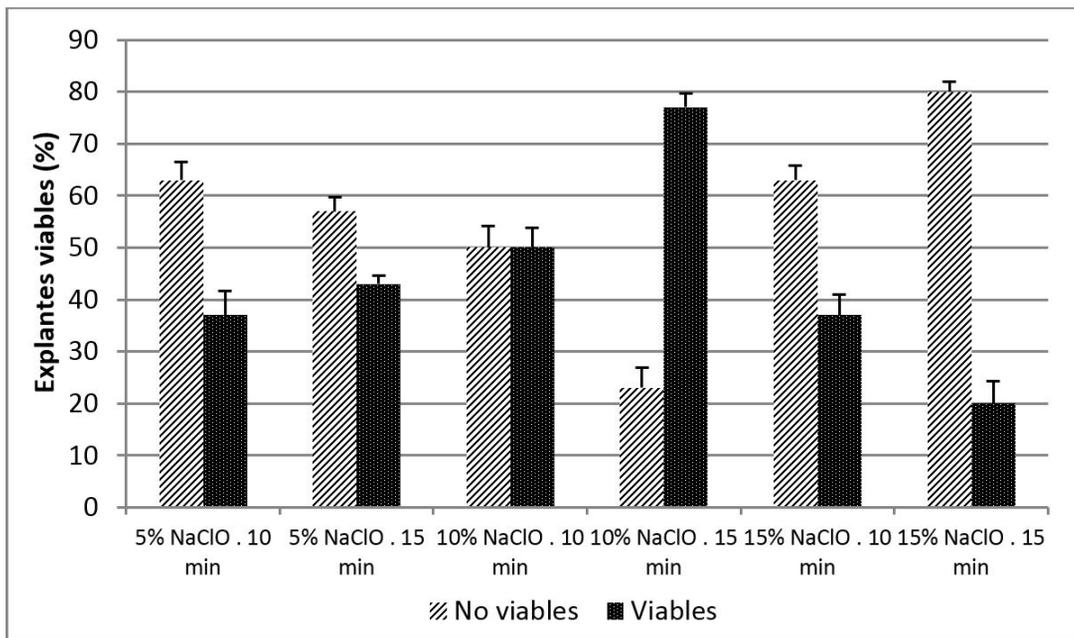


Figura 3. Porcentajes de explantes viables de manzana

Tabla 2. Análisis de Varianza para los días a la brotación, número de brotes y longitud de brotes de explantes Emilia

Fuentes de variación	gl	Días a la brotación	Cuadrados medios	
			Número de brotes	Longitud de brotes (cm)
Total	47			
medios_cultivo	1	0,76ns	0,00ns	0,11ns
dosis_BAP	3	795,42**	1,89**	3,90**
Lineal	1	2100,42**	0,27ns	1,57**
Cuadrática	1	252,08**	3,00**	6,92**
Cúbica	1	33,75**	2,40**	3,21**
medios_cultivo	3	0,75ns	0,00ns	0,01ns
* dosis_BAP				
Error	40	3,15	0,28	0,03
Promedio		16,12	2	3,13
C.V. %		11,01	26,45	5,53

DHS (ns: no significativo; *: significativo; **: altamente significativo)

Tabla 3. Valores de las variables fisiológicas en el estudio del rescate de germoplasma de manzana Emilia

Código	Descripción	Días a la brotación	Número de brotes	Longitud de brotes (cm)
m1	MSM	15,99 ± 0,08 b	1,75 ± 0,03 a	3,19 ± 0,19 b
m2	CHU	16,25 ± 0,12 a	1,75 ± 0,01 a	3,59 ± 0,23 a
b0	0 ppm de BAP	9,17 ± 1,02 d	1,50 ± 0,02 c	5,85 ± 0,66 a
b1	0,5 ppm de BAP	12,00 ± 1,36 c	1,67 ± 0,06 b	3,55 ± 0,29 b
b2	1,0 ppm de BAP	15,67 ± 1,51 b	2,33 ± 2,01 a	3,06 ± 0,98 c
b3	1,5 ppm de BAP	27,67 ± 1,74 a	1,50 ± 0,03 c	1,07 ± 0,13 d
t1	CHU + 0 ppm de BAP	9,00 ± 2,48 g	1,50 ± 0,16 c	3,29 ± 1,02 d
t2	MSM + 0 ppm de BAP	9,33 ± 3,19 f	1,50 ± 0,19 c	2,84 ± 0,96 e
t3	CHU + 0,5 ppm de BAP	12,00 ± 0,57 e	1,67 ± 1,24 b	3,79 ± 0,12 c
t4	MSM + 0,5 ppm de BAP	12,00 ± 0,71 e	1,67 ± 1,45 b	3,33 ± 0,78 d
t5	CHU + 1 ppm de BAP	16,00 ± 4,07 c	2,33 ± 2,57 a	6,20 ± 1,55 a
t6	MSM + 1 ppm de BAP	15,33 ± 3,29 d	2,33 ± 2,79 a	5,51 ± 1,35 b
t7	CHU + 1,5 ppm de BAP	28,00 ± 5,72 a	1,50 ± 0,27 c	1,06 ± 0,02 f
t8	MSM + 1,5 ppm de BAP	27,33 ± 4,93 b	1,50 ± 0,35 c	1,07 ± 0,09 f

Promedios con letras distintas indican diferencia significativa según la prueba de Tukey (P<0,05)

longitud de brote y el coeficiente de variación de 5,53%. De los polinomios ortogonales se destaca la tendencia cuadrática, en donde las concentraciones intermedias de BAP proporcionarían mayor longitud de los brotes.

La mejor respuesta se presentó en el tratamiento CHU + 1 ppm de BAP con un promedio de 6,20 cm (Tabla 3); estos resultados que coinciden con el proyecto de micropropagación del porta injerto de manzano M9 Jork (J9) desarrollado por Itoiz (2000), en donde obtienen mayor longitud de brotes empleando 1 ppm de BAP. Huang et al. (1994) mencionan en su estudio de micropropagación con *Acacia mearnsii*, que los niveles más altos de BAP promovieron mayor elongamiento de brotes múltiples, los niveles intermedios de esta hormona en nuestro estudio demuestran adecuado elongamiento de tejidos, especialmente meristemáticos.

Para los experimentos de enraizamiento, se evaluaron diferentes concentraciones de IBA (0,0 ppm; 0,5 ppm; 1,0 ppm; 1,5 ppm), incorporado una base de 0,1 ppm de ANA + 1 ppm de Riboflavina. Se presentaron los mejores resultados con el tratamiento (0,5 ppm de IBA), el cual determinó 50% de explantes enraizados, en el resto de tratamientos se presentaron pérdidas significativas por presencia de callo, contaminación bacteriana y oxidación.

3 Conclusiones

La conservación in vivo tiene sus limitaciones. Las técnicas in vitro representan un paso obligatorio en el uso de los recursos genéticos de frutales; aun así pueden mostrar considerables limitaciones tales como la inestabilidad genética y la duración de almacenamiento de tejidos. Los tejidos celulares en la manzana Emilia presentan alta percepción para la susceptibilidad a contaminantes microbianos y a la oxidación de tejidos, por lo cual, dificulta la multiplicación por medio de cultivo in vitro; sin embargo existen alternativas que hemos probado como el antioxidante Carbón Activado a una dosificación de 1 g L⁻¹ en combinación con Polivinil Pirrolidona 1g L⁻¹, lo cual ayuda a reducir la oxidación en la fase de establecimiento.

La mejor respuesta para desinfección de explantes de segmentos nodales de la var. Emilia a trabajar en técnica de cultivo in vitro fue el tratamiento con Hipoclorito de Sodio al 10% durante 15 minutos; posteriormente implementados en los medios de cultivo MSM y CHU, debido a que permite alcanzar un alto porcentaje de viabilidad (77%) y reducir de forma homogénea la oxidación y contaminación (23%) para ambos casos.

Los tratamientos a base de CHU + 0 ppm de BAP y MSM + 0 ppm de BAP presentaron las mejores respuestas en las variables días a la brotación y número de brotes por explante; sin embargo, los

mejores resultados en cuanto a la variable longitud del brote se presentaron para los tratamientos con los dos medios de desinfección y 1 ppm de BAP en medio de cultivo CHU. Se pudo determinar que altas concentraciones de BAP inhiben respuestas fisiológicas espontáneas en explantes de la manzana Emilia, especialmente en etapas iniciales donde existen mayor producción de efectos hormonales intrínsecos.

Es importante destacar la relevancia de la conservación in situ, la misma que pretende la estabilidad de los biotipos nativos y puede propender al mantenimiento o la recuperación de poblaciones viables de especies en sus hábitats naturales.

Referencias

- Bajji, M. y Druart, P. 2011. Protocol development for in vitro assessment of cadmium tolerance in black alder and basket willow at the callus and whole plant levels. *VII International Symposium on In Vitro Culture and Horticultural Breeding 961*, p. 123-131. Disponible en: <https://goo.gl/V81kHm>. DOI: <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2012.961.13>
- Druart, P. 1997. Optimization of culture media for in vitro rooting of *Malus domestica* Borkh. cv. Compact Spartan. *Biologia plantarum*, 39(1), p. 67-77. DOI: <https://doi.org/10.1023/A:100030902>
- Engelmann, F. 2011. Use of biotechnologies for the conservation of plant biodiversity. *Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 47(1), p. 5-16. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11627-010-9327-2>
- Esquinas-Alcázar, J. 2005. Protecting crop genetic diversity for food security: political, ethical and technical challenges. *Nature Reviews Genetics*, 6(12), p. 946-953. Disponible en: <https://goo.gl/ky6kDv>
- Fernández, E., Carvajal, I. y Pérez, A. 2009. In vitro bioaccessibility assessment as a prediction tool of nutritional efficiency. *Nutrition Research*, 29(11), p. 751-760. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.nutres.2009.09.016>
- Forsline, P., Aldwinckle, H., Dickson, E., Luby, J., y Hokanson, S. 2003. Collection, maintenance, characterization, and utilization of wild apples of Central Asia. *Horticultural reviews Westport then New York*, 29, p. 1-62. DOI: <http://doi.org/10.1002/9780470650868.ch1>
- Gagliardi, R., Pacheco, G., Carneiro, L., Valls, J., Vieira, M., y Mansur, E. 2003. Cryopreservation of *Arachis* species by vitrification of in vitro-grown shoot apices and genetic stability of recovered plants. *CryoLetters*, 24(2), p. 103-110. Disponible en: <https://goo.gl/yjHqvz>
- Gao, H., Yang, H., y Wang, J. 2009. Arginine metabolism in roots and leaves of apple (*Malus domestica* Borkh.): the tissue-specific formation of both nitric oxide and polyamines. *SCIENTIA HORTICULTURAE*, 119(2), p. 147-152. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2008.07.034>
- Goland, C., y Bauer, S. 2004. When the apple falls close to the tree: Local food systems and the preservation of diversity. *Renewable Agriculture and Food Systems*, 19(4), p. 228-236. DOI: <https://doi.org/10.1079/RAFS200487>
- Habiba, U., Reza, S., Saha, M., Khan, M. y Hadiuzaman, S. 2002. Endogenous bacterial contamination during in vitro culture of table banana: Identification and prevention. *Plant Tissue Cult*, 12(2), p. 117-124. Disponible en: <https://goo.gl/xvGujx>
- Hao, Y., Liu, Q., y Deng, X. 2001. Effect of cryopreservation on apple genetic resources at morphological, chromosomal, and molecular levels. *Cryobiology*, 43(1), p. 46-53. DOI: <https://doi.org/10.1006/cryo.2001.2339>
- Hokanson, S., Lamboy, W., Szewc-McFadden, A., y McFerson, J. 2001. Microsatellite (SSR) variation in a collection of *Malus*(apple) species and hybrids. *Euphytica*, 118, p. 281-294. DOI: <https://doi.org/10.1023/A:1017591202215>
- Huang, F., Al-Khayri, J., y Gbur, E. 1994. Micropropagation of *Acacia mearnsii*. *Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 30(1), p. 70-74. Disponible en: <https://goo.gl/qj2nJJ>
- Itoiz, R. 2000. Caracterización de la colección de manzanos (*Malus x Domestica*, Borkh) del Banco de Germoplasma de la U.P.N.A. Evaluación de su variabilidad. (Tesis Doctoral). U.P.N.A. 391 p.

- Janick, J., y Moore, J. 1996. Fruit breeding. Volume I: tree and tropical fruits. New York: Wiley. pp. 1 -78 Disponible en: <https://goo.gl/psZGmP>
- Lara, L. 2009. Pillaro de ayer y hoy. Riobamba: Gráficas Freire. 99 p.
- Laurens, F., Durel, C., Patocchi, A., Peil, A., Salvi, S., Tartarini, S., Velasco, R., y Van de Weg, W. 2010. Review on apple genetics and breeding programs and presentation of a new initiative of a news European initiative to increase fruit breeding efficiency. *Journal Fruit Science*, 27, p. 102-107. Disponible en: <https://goo.gl/13Jt6k>
- Martin, K. 2003. Rapid in vitro multiplication and ex vitro rooting of *Rotula aquatica* Lour., a rare rheophytic woody medicinal plant. *Plant Cell Reports*, 21(5), p. 415-420. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00299-002-0547-8>
- Noiton, D., y Alspach, P. 1996. Founding clones, inbreeding, coancestry, and status number of modern apple cultivars. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 121, p. 773-782. Disponible en: <https://goo.gl/KJkSXp>
- Priolli, R., Mendes, C., Sousa, S., Sousa, N. y Contel, E. 2004. Soybean genetic diversity in time and among breeding programs in Brazil. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 39(10), p. 967-975. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-204X2004001000004>
- Senula, A. y Keller, E. 2000. Morphological characterization of a garlic core collection and establishment of a virus-free in vitro genebank. *Allium Improv News*, 10, p. 3-5. Disponible en: <https://goo.gl/LQkJXV>
- Towill, L., Forsline, P., Walters, C., Waddell, J. y Laufmann, J. 2004. Cryopreservation of *Malus* germplasm using a winter vegetative bud method: results from 1915 accessions. *Cryo Lett*, 25, p. 323-334. Disponible en: <https://goo.gl/nYXKrU>
- Verdeil, J., Alemanno, L., Niemenak, N. y Tranbarger, T. 2007. Pluripotent versus totipotent plant stem cells: dependence versus autonomy? *Trends in plant science*, 12(6), p. 245-252. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2007.04.002>