

Estrategias para disminuir la necrosis apical en la multiplicación y el enraizamiento *in vitro* del Pistacho

Strategies to reduce the apical necrosis *in vitro* multiplication and rooting of Pistachio

Mariela Cid*, Danilo Pina*, Iris Capote*, Maritza Escalona*, Marcos Daquinta*

DOI: 10.15446/rev.colomb.biote.v18n2.61527

Resumen

El pistacho (*Pistacia* sp.) es uno de los frutales menos explotados, entre las principales causas está el elevado costo del material vegetal por las dificultades de propagación de la especie. La propagación *in vitro* ofrece un gran potencial para la industria de esta especie por la multiplicación a gran escala de clones seleccionados. El objetivo del presente trabajo fue controlar la necrosis apical de los brotes en la propagación *in vitro* del pistacho. A partir de brotes jóvenes de plantas de esta especie mantenidas en casas de cultivo, se procedió a su desinfección con hipoclorito de sodio al 1% durante diferentes tiempos. Las yemas apicales y axilares se establecieron en el medio de cultivo Murashige & Skoog (1962) modificado y enriquecido con 1 mg/L de Metatopolina. Se evaluaron diferentes tipos de frascos, número y tipo de explantes y formulaciones de medios de cultivo durante dos subcultivos de multiplicación y en el enraizamiento. El frasco de cristal de 200 ml de capacidad, la línea prolifera y el medio de cultivo DKW lograron los valores más bajo de necrosis apical. En la fase de multiplicación se presentaron valores bajo en todos los tratamientos ensayados sin diferencia estadísticas entre ellos en comparación con el enraizamiento donde la necrosis apical alcanzó valores superiores. El medio DKW y las líneas prolíferas lograron los menores valores. El medio de cultivo MS modificado, favoreció el número de segmentos enraizados y el DKW (Driver & Kuniyuki, 1984) el número de segmentos que brotaron, presentando este último menor incidencia de necrosis apical.

Palabras clave: forestales, medios de cultivo, nueces, propagación *in vitro*.

Abstract

The pistachio (*Pistacia* sp.) is one of the least exploited fruit among the main causes is the high cost of plant material by the difficulties of propagation of the species. The propagation *in vitro* offers great potential for the industry of this species by multiplication scale of selected clones. The aim of this study was to control the apical necrosis of outbreaks in the *in vitro* propagation Pistachio. From young shoots of plants of this species kept in growing houses, proceeded to disinfection with sodium hypochlorite 1% for different times. The apical and axillary buds were established in the culture medium Murashige and Skoog (1962) modified and supplemented with 1 mg/L Metatopolina. Different types of bottles, number and type of explants and culture media formulations for two subcultures multiplication and rooting were evaluated. Glass flask of 200 ml capacity, and line proliferates DKW medium achieved the lowest values apical necrosis. In the multiplication phase values were low in all treatments tested no statistical difference between them compared to rooting where apical necrosis reached higher values. The average DKW and prolific lines obtained lower values. MS medium modified crop, favored the number of segments rooted and DKW (Driver and Kuniyuki, 1984) the number of segments that sprouted, the latter having lower incidence of apical necrosis.

Key words: forest, culture medium, nuts, *in vitro* propagation.

Recibido: diciembre 10 de 2015 **Aprobado:** octubre 18 de 2016

* Laboratorio de Cultivo de Células y Tejidos. Centro de Bioplantas. Universidad de Ciego de Ávila. Carretera a Morón Km 9. CP 69450. Cuba. e-mail: mdaquinta1962@gmail.com, mariela@bioplantas.cu, danilo@bioplantas.cu, icapote@bioplantas.cu, mescalona@bioplantas.cu

Introducción

El pistachero es uno de los frutales menos explotados, entre las principales causas se puede citar: el largo período que se requiere para la entrada en producción (empieza a dar sus primeros frutos en el quinto año de su plantación y no llega a la plena producción hasta el décimo año, siendo el rendimiento medio por árbol de 10 a 12 kilogramos) y el elevado costo del material vegetal por las dificultades de propagación de la especie (dificultad de propagación por injerto de las variedades de interés y la selección de un patrón clonal propagado vegetativamente). Se encuentra entre los frutos secos más demandados a nivel mundial, siendo Irán el mayor productor mundial de este frutal con más de 230 000 toneladas por año.

Los avances en la propagación de cuatro especies de la familia anacardiaceae, donde se incluye *Pistacia vera* son señalados por Moyo & Van Staden (2013). Los protocolos propuestos para la propagación *in vitro* del Pistacho presentan como principal deficiencia la necrosis apical que afecta la calidad del brote para su comercialización, este desorden fisiológico es característico de las plantas leñosas y el Pistacho ha sido una especie muy recalcitrante ante este desorden fisiológico (Arbeloa *et al.*, 2013, García *et al.*, 2013 y González-Padrón *et al.*, 2013) y consiste en la muerte de la parte apical del brote con la siguiente muerte progresiva del mismo. La necrosis apical está relacionada con múltiples factores dentro de ellos varios autores hacen referencia al suministro nutricional en el medio de cultivo y con las condiciones físicas que garantizan la translocación de nutrientes desde la base hasta el ápice, principalmente del boro y el calcio. Recientemente Akdemir *et al.* (2014), y Tilkat *et al.* (2014), señalan que este síntoma no se produce en los brotes obtenidos en la inmersión temporal.

Entre las principales causas que favorecen la necrosis apical en este cultivo, está la composición del medio de cultivo y las condiciones que afecten la disponibilidad de los nutrientes para ser absorbido por el explante (capacidad del frasco y el volumen de medio de cultivo por explante). En este trabajo, se estudia el efecto de tres formulaciones basales de medios de cultivo DKW liofilizado (DUCHEFA), DKW preparado en el laboratorio según Driver & Kuniyuki (1984) y el medio de cultivo MS modificado por Daquinta, 2011.

Después de seleccionar las plantas según las características recomendadas, es decir, con bordes lisos en las hojas. Se puede observar que todas las líneas no respondían igual en cuanto a la respuesta fisiológica. Sobre esta base se seleccionaron dos tipos de líneas: líneas prolíferas, aquellas en que el coeficiente de multiplicación era alto y líneas poco prolíferas, donde había poca proliferación.

El objetivo propuesto en el presente trabajo es el desarrollo de estrategias para disminuir la necrosis apical

en la multiplicación y el enraizamiento *in vitro* del Pistacho.

Materiales y Métodos

Efecto de tres tipos de frascos con diferente capacidad y tres densidades de inóculo en la multiplicación y necrosis apical del Pistacho

Con el objetivo de evaluar el tipo de frasco de cultivo y su espacio gaseoso, sobre los brotes de pistacho se desarrolló el presente experimento. Los tres tipos de frascos utilizados en el estudio fueron, el NEYKER, frasco de cristal de 200 ml de capacidad, las magentas plásticas cuadradas de 350 ml de capacidad y los frascos de cristal de 350 ml de capacidad y se evaluaron tres densidades de inóculo (4, 7, 10 brotes por frascos). Como explantes se tomaron segmentos nodales de 1 cm de longitud con dos nudos a partir de brotes con cuatro subcultivos. El medio de cultivo utilizado es el MS (1962) modificado, según Daquinta (2011). A los 21 días se evaluó el número de brotes por explantes, el coeficiente de multiplicación y la necrosis apical.

Estudio de tres formulaciones basales de medios de cultivo y dos tipos de explantes (LP-Líneas prolíferas y LPP- Líneas poco prolíferas) en la multiplicación y la necrosis apical del Pistacho

Para estudiar la influencia de la composición química de los medios de cultivo sobre dos tipos de explantes se realizó este experimento. Como explantes se tomaron segmentos nodales de 1 cm de longitud con dos nudos a partir de brotes con siete subcultivos. Los brotes se subcultivaron en medio de cultivo como se describe a continuación, con sacarosa a 30 g.L-1, tiamina 1 mg.L-1, mioinositol 100 mg.L-1, metatopolina 1.07 mg.L-1 y AIB 0.2 mg.L-1, se tuvo en cuenta dos tipos de explantes (líneas prolíferas y líneas poco prolíferas). El volumen de medio de cultivo por explantes fue de 25 ml. Al realizar el subcultivo se evaluó el número de brotes emitidos por explantes, el coeficiente de multiplicación y el número de brotes necrosados. Esta evaluación se realizó en dos subcultivos para evaluar el efecto residual de las formulaciones basales sobre el explante.

- Medio de Daquinta, 2011 (MS modificado, mitad de la concentración de los nitratos y haluros, el doble de la concentración de los sulfatos y se le agregó nitrato de calcio a una concentración de 1.2 g.L-1.
- Medio DKW preparado en el laboratorio según Driver & Kuniyuki (1984).
- Medio DKW liofilizado (Duchefa).

Las condiciones de luz fueron bajo un fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas de oscuridad, con una inten-

sidad luminosa de aproximadamente 1000-3000 lux (12.5-37.5 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$). La temperatura de incubación fue de $25\pm 2^\circ\text{C}$. A los 21 días se evaluó el número de brotes por explantes, el coeficiente de multiplicación y la necrosis apical.

Efecto de tres formulaciones basales de medios de cultivo y dos tipos de líneas (prolíferas y poco prolíferas) en el enraizamiento y la necrosis apical del Pistacho

La influencia de la composición química de tres medios de cultivo sobre el enraizamiento se evaluó en el presente experimento. Se emplearon brotes de pistacho procedentes de la fase de multiplicación, en medio de cultivo semi-sólido, con siete subcultivos, con una longitud entre 1.5-2.5 cm y 2-4 entrenudos, el medio de cultivo en el cual se desarrollaban los explantes al momento de montar el experimento era el medio de cultivo MS modificado propuesto por Daquinta, 2011.

El tipo de medio de cultivo y las variables experimentales se describen en el experimento de multiplicación, solo difiere el regulador de crecimiento que en el caso del enraizamiento se utilizó el AIB a una concentración de 3 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, los explantes se colocaron 5 días a la oscuridad y el resto del tiempo bajo el fotoperiodo e intensidad luminosa descrita anteriormente. A los 30 días se evaluó, la longitud del brote (cm), el porcentaje de plantas enraizadas (%) y el número de raíces por planta y el porcentaje de plantas con necrosis apical.

Estudio de tres formulaciones basales de medios de cultivo sobre la brotación, enraizamiento y necrosis apical de brotes emitidos a partir de segmentos nodales del Pistacho

Para el montaje de este experimento se utilizaron segmentos nodales de pistacho de 1 cm de longitud con dos nudos y siete subcultivos, las condiciones para la experimentación son las mismas descrita para el primer experimento. En este caso se realizó la evaluación con el clon prolífero y la cantidad de inóculo utilizada fue de siete explantes por frasco. Se utilizaron ocho frascos por tratamiento.

A los 30, 45 y 60 días se evaluó el porcentaje de segmentos brotados y enraizados y a los 60 días el porcentaje de necrosis apical de los segmentos brotados.

En el procesamiento estadístico de los datos se utilizó el SPSS (versión 11.5 para windows, SPSS Inc.). Se comprobó el ajuste a la distribución normal de los datos de cada tratamiento (Kolmogorov-Smirnov) y la homogeneidad de las varianzas (Levene). Se realizó el análisis de varianza (ANOVA) y prueba de rangos múltiples de Tukey para valores de $p\leq 0.05$. En algunos casos fue necesaria la transformación de los datos para lograr los supuestos de las pruebas paramétricas rea-

lizadas las cuales aparecen descritas en los pie de las figuras y tablas.

Resultados y Discusión

Efecto de tres tipos de frascos con diferente capacidad y tres densidades de inóculo en la multiplicación y necrosis apical del Pistacho

Los frascos de cristal de tapa de polipropileno tienen una capacidad de 200 ml, las magentas son plásticas y de forma cuadrada con una tapa de polipropileno que garantiza un cierre hermético, su capacidad es de 350 ml y los frascos de cristal con tapa plástica de igual capacidad que las magenta. Como se observa hay una diferencia en la capacidad de los frascos y en la calidad de la luz que reciben las plantas en el interior de los recipientes de cultivo.

Como se puede observar en la tabla 1, el número de brotes por explantes y el coeficiente de multiplicación no se vieron afectados por los factores estudiados, no mostrando diferencias estadísticas entre los tratamientos. Sin embargo, cuando se analiza el porcentaje de necrosis apical se puede observar que se vio influenciado por ambos factores. Independientemente de la densidad de inóculo ensayada, el frasco de cristal de 200 ml de capacidad presentó menor necrosis apical que los demás frascos estudiados, las magentas presentaron el mayor porcentaje de necrosis con diferencias estadísticas con el frasco de 200 ml de capacidad, con respecto al frasco de cristal de 350 ml de capacidad, sólo difirió cuando se empleó la densidad de inóculo menor.

La necrosis apical aumentó a medida que se incrementó el número de explantes por frasco, en los tres frascos estudiado, aspecto este que se justifica pues el volumen de medio de cultivo por explantes se reduce, al igual que el volumen de aire por explantes lo que provoca agotamiento de los nutrientes y aumento de la toxicidad, respectivamente. Estos resultados son similares a los obtenidos por García *et al.* (2012), cuando compararon dos densidades de inóculo (5 y 7) y obtuvieron el menor número de explantes necrosado con 5 explantes por frasco con diferencia con el control (7 explante). En general las condiciones óptimas tanto de la forma como del tamaño del frasco de cultivo son muy diferentes entre especies y varían también al variar otros factores como el tipo de material del recipiente, tipo de cierre o volumen del medio de cultivo (George, 1993).

González-Padrón *et al.* (2013), han disminuido los porcentajes de necrosis, aumentando la tasa de multiplicación y la longitud de los brotes utilizando brotes apicales (frente a secciones nodales); sales DKW (frente a MS y OM), medio sólido (frente a líquido, doble fase o alternado) y cultivo en frascos (frente a tubos).

Tabla 1. Efecto del tipo de frasco y la densidad de inóculo sobre el número de brotes, el coeficiente de multiplicación y el porcentaje de explantes necrosados en la multiplicación de Pistacho.

T. Frasco	Densidad de inóculo	N. brotes/explantes	CM	% necrosis
F. cristal, 200ml	4	1.4	1.8	0d
Magenta, 350 ml		2.3	2.7	49 ^a
F. cristal, 350 ml		1.8	2.9	29bc
F. cristal, 200ml	7	2.1	3.6	20c
Magenta, 350 ml		1.8	2.2	63 ^a
F. cristal, 350 ml		1.5	2.8	44ab
F. cristal, 200ml	10	1.7	2.5	23bc
Magenta, 350 ml		1.8	2.0	53 ^a
F. cristal, 350 ml		2.1	3.0	47ab
Sig		ns	ns	*

Cada tratamiento se evaluó con 28 explantes, letras diferentes en una misma columna denota diferencia estadística entre los tratamientos para valores $p \leq 0,5$ (ANOVA, Tukey). Las variables número de brotes y coeficiente de multiplicación se transformaron según $(x+0.5)^{1/2}$ (x)^{1/2}, la variable porcentaje de necrosis se transformó según $2 \arccos(x/100)^{1/2}$.

Este ensayo permitió concluir que el frasco más adecuado para la multiplicación del pistacho es el de cristal con 200 ml de capacidad, por presentar menor necrosis apical. En cuanto a la densidad de inóculo, utilizando este frasco, 4 y 7 mostraron los valores más bajo en cuanto a necrosis apical. Como el objetivo de este trabajo es reducir los porcentajes de necrosis para la producción comercial de este cultivo, la densidad de inóculo seleccionada para continuar la experimentación fue la de 7 explantes por frascos pues los valores de necrosis (20%) están por debajo de los valores normales referidos para esta especie (25%). En cuanto a las demás variables estudiadas (número de brotes y coeficiente de multiplicación) no existieron diferencias. Al utilizar 4 explantes por frascos se está desaprovechando medio de cultivo y espacio en el interior del mismo.

Durante el cultivo de brotes, la aparición de necrosis apical fue perjudicial para la obtención de brotes adecuados para enraizar. Entre los diferentes tratamientos estudiados estuvieron los reguladores de crecimiento, la composición del medio de cultivo, el "bottom cooling" y la densidad de explantes en el frasco. Todos influyeron en la tasa de necrosis apical (Arbeloa *et al.*, 2013).

Sobre esta base los siguientes experimentos se realizarán con el frasco de cristal con 200 ml de capacidad y una densidad de inóculo de 7 explantes por frascos.

Estudio de tres formulaciones basales de medios de cultivo y dos tipos de explantes (LP-Líneas prolíferas y LPP- Líneas poco prolíferas) en la multiplicación y la necrosis apical del Pistacho

Cuando se evaluó el efecto de las tres formulaciones basales en el primer subcultivo (tabla 2), se puede observar que el medio de cultivo MS modificado y el DKW preparado favorecieron el número de brotes emitidos y el coeficiente de multiplicación existiendo diferencia estadísticas con el medio DKW liofilizado (DUCHEFA). En cuanto al tipo de explantes no existió influencia de este factor sobre el número de brotes y el coeficiente de multiplicación, no existiendo diferencias estadísticas entre ellos.

Los factores evaluados no tuvieron un efecto marcado estadísticamente sobre la necrosis apical aunque se debe destacar que las líneas poco prolíferas mostraron numéricamente valores más elevados de necrosis que las prolíferas.

Una de las diferencias más notables entre los diferentes medios de cultivo empleados es la concentración de calcio, el medio de cultivo DKW triplica su concentración respecto a MS. La deficiencia de calcio en las plantas ha sido asociada con necrosis apical y un pobre crecimiento de las raíces en diversas especies cultivadas *in vitro*, como el pistacho (Barghchi & Alderson, 1989 y 1996) y otras plantas leñosas (Singha *et al.*,

Tabla 2. Respuesta de tres formulaciones basales de medio de cultivo y dos tipos de explantes (LP, líneas prolíferas; LPP- líneas poco prolíferas) sobre las variables de calidad en el primer subcultivo en la multiplicación del Pistacho.

Medio de cultivo	Explante	N. Brotes	CM	% necrosis
MS- Modificado	LPP	1.0a	1.8b	14.3
	LP	1.4a	2.1ab	1
DKW (Driver & Kuniyuki, 1984)	LPP	1.3a	2.3 ^a	8.6
	LP	0.9a	2ab	0
DKW-L Duchefa	LPP	0.1b	1c	7.1
	LP	0.1b	1c	0
Sig		*	*	Ns

Cada tratamiento se evaluó con 35 explantes, letras diferentes en una misma columna denota diferencia estadística entre los tratamientos para valores $p \leq 0,5$ (ANOVA, Tukey). Las variables número de brotes y coeficiente de multiplicación se transformaron según $(x+0.5)^{1/2}$ $(x)^{1/2}$, la variable porcentaje de necrosis se transformó según $2 \arccos(x/100)^{1/2}$.

1990; Piagnani *et al.*, 1996; Bairu *et al.*, 2009; Thakur & Kanwar, 2011). La menor incidencia de la necrosis apical observada en el tratamiento MS modificado podría estar dada en que los incrementos de calcio añadido al medio de cultivo MS, modificado por Daquinta, 2011, igualan a los contenidos de calcio del medio de cultivo DKW.

En *Pistacia vera*, la adición de calcio al medio de cultivo produjo una reducción en la incidencia de necrosis

cuando los brotes se multiplicaron en medio de cultivo MS, sin afectar a la multiplicación de brotes, y no así la adición de boro (Abousalim & Mantell, 1994; Barghchi & Alderson, 1996). García *et al.*, (2012) cuando añadió gluconato de calcio al medio DKW no tuvo un efecto sobre la necrosis lo que sugiere que el medio DKW tiene una concentración de calcio suficiente.

Cuando se observa el efecto continuado de estos tratamientos (tabla 3), se puede destacar que el medio de

Tabla 3. Respuesta de tres formulaciones basales de medio de cultivo y dos tipos de explantes (LP, líneas prolíferas; LPP- líneas poco Prolíferas) sobre las variables de calidad en el segundo subcultivo en la multiplicación del Pistacho.

Medio de cultivo	Explante	N. Brotes	CM	% necrosis
MS- modificado	LPP	1.3	2.1 bc	6.7
	LP	1.7	2.8 a	2.9
DKW (Driver y Kuniyuki, 1984)	LPP	1.7	1.7 cd	2.9
	LP	1.0	2.2 b	0.0
DKW-L Duchefa	LPP	1.0	1.1 e	0.0
	LP	1.0	1.3 de	0.0
Sig		ns	*	Ns

Cada tratamiento se evaluó con 35 explantes, letras diferentes en una misma columna denota diferencia estadística entre los tratamientos para valores $p \leq 0,5$ (ANOVA, Tukey). Las variables número de brotes y coeficiente de multiplicación se transformaron según $(x+0.5)^{1/2}$ $(x)^{1/2}$, la variable porcentaje de necrosis se transformó según $2 \arccos(x/100)^{1/2}$.

cultivo MS modificado alcanzó el mayor coeficiente de multiplicación con diferencias estadísticas con el resto, el medio de cultivo DKW liofilizado mostró los valores más bajos.

En cuanto a la necrosis apical no existió diferencia entre los tratamientos evaluados, hubo una tendencia a la disminución cuando se empleó el medio de cultivo DKW (Driver & Kuniyuki, 1984) y el DKW liofilizado (DUCHEFA). García *et al.* (2010), comparando diferentes medios de cultivo en la multiplicación de *Pistacia vera* determinaron que el medio DKW mostró brotes con mayor calidad y menor necrosis apical con respecto al medio MS y al WP.

En la figura 1 se muestra los brotes en las tres formulaciones basales de medios de cultivo, como se puede apreciar entre el medio MS modificado y el DKW (Driver & Kuniyuki, 1984) no existen diferencias cualitativas. Sin embargo, al observar los brotes en el medio DKW liofilizado se destaca el bajo número de brotes emitidos y estos presentan un color clorótico, además son de menor tamaño, lo que hace que no puedan ser divididos por segmentos nodales.

Como se señala con anterioridad, la modificación realizada por Daquinta (2011) incrementa considerablemente los niveles de Ca del medio de cultivo MS, en forma de nitrato de calcio (1.2 g.L^{-1}), a niveles casi tres veces los contenidos en MS. Otras alteraciones realizadas al medio de cultivo originalmente propuesto, son la mitad de los nitratos (por ser el medio de cultivo MS muy rico en estos compuestos y pueden ser tóxico para determinadas plantas leñosas) y los haluros (para incrementar el calcio en forma de nitrato y no de cloruro, que pudiera ser tóxico para las plantas) y el doble de los sulfatos. Faltando modificar los niveles de boro, que es el otro elemento junto al calcio que influye notablemente en la necrosis apical de esta planta, lo cual es un elemento a tener en cuenta en futuros trabajos a realizar.

Efecto de tres formulaciones basales de medios de cultivo y dos tipos de líneas (prolíferas y poco prolíferas) en el enraizamiento y la necrosis apical del Pistacho

En la tabla 4 se muestra el efecto de tres formulaciones basales de medio de cultivo y dos tipos de líneas sobre los indicadores de calidad en el enraizamiento del Pistacho, como se puede apreciar existió un efecto mayor del tipo de explantes utilizado sobre todas las variables evaluadas, donde la línea prolífera presentó mejores resultados con diferencias estadísticas con respecto a la línea poco prolífera. El valor más alto de enraizamiento se logró en el tratamiento DKW-L (DUCHEFA) con un 60%, sin diferencia estadística con el resto de los medios ensayados cuando se combinaron con las líneas prolíferas.

La falta de enraizamiento o un número escaso de raíces por brote es frecuente en la propagación de Pistacho. El enraizamiento mejoró tras largos periodos de cultivo. Además, entre los diferentes factores ensayados, los reguladores de crecimiento, la composición del medio de cultivo y el pH mostraron mayor efecto en el enraizamiento (Arbeloa *et al.*, 2013).

Los reguladores del crecimiento en los medios de cultivo permiten direccionar la morfogénesis de los tejidos y modificar las respuestas fisiológicas en condiciones *in vitro*. Dentro de ellos, se encuentran las auxinas, cuyos efectos están relacionados con la dominancia apical y con la inducción de los procesos rizogénicos en las plantas, y promueven el crecimiento por medio de los mecanismos de elongación celular (Sihna, 2004).

En la micropropagación convencional de Gerbera se evaluó el efecto de tres tipos de auxinas (AIA, AIB y ANA) a diferentes concentraciones en la formación *in vitro* de raíces. El AIB resultó ser la auxina de mayor influencia en el número y longitud de las raíces (Rahman *et al.*, 2014),

En cuanto a la necrosis apical las líneas prolíferas presentaron los menores valores en las tres formulaciones



Figura 1. Explantes de Pistacho en fase de multiplicación en las tres formulaciones basales. MS modificado, DKW (Driver & Kuniyuki, 1984) y DKW-L (DUCHEFA).

Tabla 4. Efecto de tres formulaciones basales de medio de cultivo, 2 tipos de explantes sobre las variables de calidad a los 30 días de enraizado el Pistacho.

Medio de cultivo	Explante	Long. Brote. (cm)	Plantas enraizadas (%)	No raíces/pta.	Necrosis (%)
MS- modificado	LPP	2.7 b	2 c	0.4 bc	80 a
	LP	3.45 a	54 ab	0.7 ab	23 c
DKW (Driver y Kuniyuki (1984))	LPP	2.71 b	9 d	0.1 c	20 c
	LP	3.43 a	43 abc	0.6 bc	31 c
DKW-L Duchefa	LPP	2.70 b	34 bc	0.6 bc	46 b
	LP	3.30 a	60 a	1.5 a	20 c
<i>Sig</i>		*	*	*	*

Cada tratamiento se evaluó con 35 explantes, letras diferentes en una misma columna denota diferencia estadística entre los tratamientos para valores $p \leq 0,5$ (ANOVA, Tukey). La variable número de raíces se transformó según $(x+0.5)^{1/2}$ (x) $^{1/2}$, la variable de porcentajes se transformó según $2 \arccos(x/100)^{1/2}$. LPP-Líneas poco prolíferas; LP- Líneas prolíferas.

estudiadas, sin diferencias estadísticas entre estas, el mayor valor lo manifestó el tratamiento del medio de cultivo MS modificado y la línea poco prolifera con un 80% de necrosis.

Evaluación de tres formulaciones basales de medios de cultivo sobre la brotación, enraizamiento y necrosis apical de brotes emitidos a partir de segmentos nodales del Pistacho

En la tabla 5 se muestra el efecto de tres formulaciones basales de medio de cultivo sobre la brotación y enraizamiento de segmentos nodales de plantas de pistacho y la necrosis apical sobre el número de segmentos brotados. En cuanto a la brotación el medio de cultivo DKW (Driver & Kuniyuki, 1984) mostró los mejores resultados con diferencias estadísticas con el resto de los medios de cultivo empleados. En los primeros 30 días el mayor número de segmentos estaban brotados,

en el resto del tiempo siguió la misma tendencia los tres tipos de medios pero con incrementos muy bajos. El medio DKW-L (DUCHEFA) presentó los valores más bajo de brotación.

En cuanto al número de segmento enraizado el medio MS modificado mostró a los 60 días un 73% de brotes enraizados, casi el doble de lo logrado en los restantes medios de cultivos estudiados.

Cuando se analiza el número de segmento que logro brotar y enraizar del número total de segmento (datos no mostrado), el medio de cultivo MS modificado mostró un 32% de explantes que brotaron y enraizaron seguido por el medio de cultivo DKW (Driver & Kuniyuki (1984) que obtuvo un 28.56% y el DKW-L de la DUCHEFA alcanzó el valor más bajo con 3.59%.

En cuanto a la necrosis apical el medio DKW (Driver & Kuniyuki, 1984) mostró los valores más bajo (26%) del total de segmentos brotados con diferencias esta-

Tabla 5. Efecto de tres formulaciones basales de medios de cultivo sobre la brotación, enraizamiento y necrosis apical de segmentos nodales de Pistacho.

Medio de cultivo	Segmentos brotados (%)			Segmentos enraizados (%)			Necrosis (%)
	30d	45d	60d	30d	45d	60d	
MS- modificado	36b	39b	43b	61a	70a	73a	33a
DKW (Driver y Kuniyuki, 1984).	61a	61a	70a	25b	29b	38b	26b
DKW-L Duchefa	4c	4c	5c	25b	29b	34b	33a
<i>Sig</i>	*	*	*	*	*	*	*

Cada tratamiento se evaluó con 56 explantes, letras diferentes en una misma columna denota diferencia estadística entre los tratamientos para valores $p \leq 0,5$ (ANOVA, Tukey). Las variables de porcentaje se transformaron según $2 \arccos(x/100)^{1/2}$.

dísticas con el MS modificado y el DKW-L (DUCHEFA), que ambos obtuvieron un 33% de necrosis. Este medio también obtuvo el menor porcentaje de brotes necrosados, del número de segmento totales que lograron brotar y enraizar, sólo 1 para un 6.25%. (Datos no mostrados).

La figura 2 muestra los segmentos de tallos en las tres formulaciones de medio de cultivo, se puede apreciar la brotación de las yemas en el medio MS modificado, Daquinta, 2011 y el DKW (Driver & Kuniyuki, 1984). Sin embargo, en el DKW-L (DUCHEFA) la brotación fue muy escasa, casi nula, este comportamiento fue similar durante todo el tiempo del experimento.

Conclusiones

Entre las estrategias para lograr reducir la necrosis apical del pistacho estuvo la capacidad del frasco, la procedencia del explante y las formulaciones basales de los medios de cultivo, donde el frasco de cristal de 200 ml de capacidad, la línea prolifera y el medio de cultivo DKW lograron los valores más bajo.

La necrosis apical en la fase de multiplicación presentó valores bajo en todos los tratamientos ensayados, sin diferencias estadísticas entre ellos en comparación con el enraizamiento, donde la necrosis apical alcanzó valores superiores. El medio DKW y las líneas prolíferas lograron los menores valores.

No existe una sincronía entre el número de segmentos que brotan y los que emiten raíz, el medio de cultivo MS modificado, favoreció el número de segmentos enraizados y el DKW el número de segmento que brotaron, el primero, MS modificado, obtuvo la mayor sincronía (32%) seguido por el DKW (28.56%), presentando este menor incidencia de necrosis apical.

Referencias bibliográficas

Abousalim, A., & Mantell, S.H. (1994). A practical method for alleviating shoot tip-necrosis symptoms in *in-vitro* shoot cultures of *Pistacia vera* cv mateur. *Journal of horticultural science*, 69(2), 357-365.

Akdemir, H., Süzerer, V., Onay, A., Tilkat, Ersali, E., & Ozden Ciftci, Y. (2014). Micropropagation of the *pistachio* and its rootstocks by temporary immersion system. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 117, 65-76.

Arbeloa, A., García, E., Lorente, P., Andreu, E., & Marín, J.A. (2013). Factores críticos que limitan la micropropagación del Pistacho. X Reunión de la Sociedad Española de Cultivo *in Vitro* de Tejidos Vegetales, 1.6, 44.

Barghchi, M., & Alderson, P.G. (1996). The control of shoot tip necrosis in *Pistacia vera* L. *in vitro*. *Plant Growth Regulation*, 20, 31-35.

Benmahioul, B., Kaid-Harche, M., Dorion, N., & Daquin, F. (2009). *In vitro* embryo germination and proliferation of pistachio (*Pistacia vera* L.). *Scientia Horticulturae*, 122(3), 361-365

Daquinta, M. (2011). Establecimiento de un protocolo de *Pistacho* proveniente de semilla gruesa y de yemas apicales y axilares de plantas de Pistacho de casas de cultivo. Informe Técnico. Centro de Bioplasmas. 11 pp.

Driver, J.A., & Kuniyuki, A.H. (1984). *In vitro* propagation of Paradox walnut rootstock. *HortScience*, 19, 507-509.

García, E., Lorente, P., Marín, J.A., Arbeloa, A., & Andreu, P. (2010). Micropropagación e injerto *in vitro* de *Pistacho*. Información Técnica Económica Agraria, 106(4), 294-302.

García, E., Lorente, P., Marín, J.A., Arbeloa, A., & Andreu, P. (2012). Factores que afectan a la necrosis apical de brotes de *Pistacia vera* L. cultivados *in vitro*. Información Técnica Económica Agraria, 106: 294-02.

García, E., Lorente, P., Marín, J.A., Andreu, P., & Arbeloa, A. (2013). Cultivo *in vitro* de *Pistacia vera*: Factores que afectan la necrosis apical. X Reunión de la Sociedad Española de Cultivo *in Vitro* de Tejidos Vegetales, 1.7, 45.

García, E., Imbroda, I., Lorente, P., Marín, J.A., Arbeloa, A., Padilla, I.M.G., Barceló, A., & Andreu, P. (2014). Micropropagation and *in vitro* grafting techniques to assist the selection of a pistachio rootstock from a population of terebinth (*Pistacia terebinthus* L.) collected in the SE of Spain. Proc. VI th IS on Almonds and Pistachios Eds.: F. Dicenta et al. Acta Hort. 1028.

George, E.F. (1993). Plant Propagation by Tissue Culture. Part 1 The Technology. Exegetics Ltd. England. 555 pp.

González-Padrón, M.Y., Imbroda, I., Padilla, I.M.G., & Barceló-Muñoz, A. (2013). Establecimiento de un protocolo de micropro-

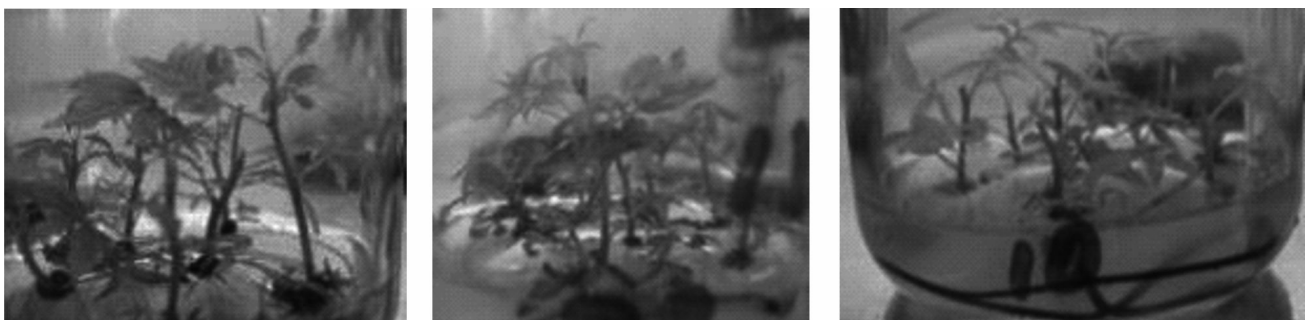


Figura 2. Enraizamiento de segmento de tallos de Pistacho en tres formulaciones de medios de cultivo a los 30 días de enraizados. MS Modificado (Daquinta, 2011), DKW (Driver & Kuniyuki, 1984) y DKW-L (DUCHEFA).

- pagación para *Pistacia terebinthus* L. X Reunión de la Sociedad Española de Cultivo *in Vitro* de Tejidos Vegetales, 1.5, 43.
- Mobli, M., & Baninasab, B. (2009). Effect of indolebutyric acid on root regeneration and seedling survival after transplanting of three *Pistacia* species. *Journal of Fruit and Ornamental Plant Research*, 17(1), 5-13.
- Moyo, M., & Van Staden, J. (2013). Micropropagation of Anacardiaceae species of economic importance: advances and future prospects. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant.*, 49(2), 85-96.
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.*, 15, 473-497.
- Rahemi, M., & Baninasab, B. (2000). Effect of gibberellic acid on seedling growth in two wild species of pistachio. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 75(3).
- Rahman, M., Ahmed, B., Islam, R., Mandal, A., & Hossain, M. (2014). A Biotechnological Approach for the Production of Red Gerbera (*Gerbera Jamesonii* Bolus). *Nova Journal of Medical and Biological Sciences*, 2(1), 1-6.
- Sinha, R.K. (2004). Modern Plant Physiology. Chapter 19 Hormones/ Growth Regulator. Alpha Science International Ltd. Pangbourne; England 461-472 pp.
- Tilkat, E., Onay, A., Yildirim, H., & Ozen, C. (2008). Micropropagation of mature male pistachio, *Pistacia vera* L. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 83(3), 328-333.
- Tilkat, E., & Onay, A. (2009). Direct shoot regeneration from *in vitro*-derived mature leaf explants of pistachio. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant*, 45(1), 92-98.
- Tilkat, E., Onay, A., & Tokatli, O. (2009 a). *In vitro* rooting Improvement of Adult Pistachio, *Pistacia vera* L. 'Atli'. *Acta Horticulturae*, 839.
- Tilkat, E., Onay, A., Yildirim, H., & Ayaz, E. (2009 b). Direct plant regeneration from mature leaf explants of pistachio, *Pistacia vera* L. *Scientia Horticulturae*, 121(3), 361-365.
- Tilkat, E., Süzerer, V., Ersali, Y., Hoser, A., Kiliç, F.M., Tilkat, E.A., Akdemir, H., Özden Çiftçi, Y., Onay, A., & Kapla, A. (2014). Mass Shoot Proliferation of *Pistacia khinjuk* Stocks Using Temporary Immersion Bioreactor System (TIS). Proc. VI th IS on Almonds and Pistachios, Eds.: F. Dicenta et al. *Acta Hort.* 1028.