

Enraizamiento *in vitro* de los portainjertos de ciruelo Mariana GF 8/1, Mirabolano B y San Julián GF 655/2

Arena, M.E. , O.H. Caso y P.E. Perelman

RESUMEN

Se estudió la elongación y el enraizamiento *in vitro* de los brotes de los portainjertos de ciruelo Mariana GF 8/1, Mirabolano B y San Julián GF 655/2.

El subcultivo de los brotes de 1,5 a 2 cm de longitud en un medio de alargamiento compuesto por las sales de Murashige & Skoog (MS), la composición orgánica de de Fossard *et al.* (DF), 0,5 mg/l de GA₃, 0,2 mg/l de BA y 0,01 mg/l de ANA, permitió obtener como mínimo un 60% de brotes con buena calidad para ser enraizados, después de 21 días en Mirabolano B y San Julián GF 655/2 y de 42 días en Mariana GF 8/1.

El medio de cultivo con la composición orgánica de MS modificada y 1 mg/l de IBA favoreció el enraizamiento del 100% de los brotes a los 12 y 16 días de iniciado dicho proceso en San Julián GF 655/2 y Mariana GF 8/1 respectivamente. Al mismo tiempo permitió la formación de sistemas radicales con un número aceptable de raíces por brote y mayor longitud total de los mismos. En Mirabolano B se obtuvo un 45% de enraizamiento, con 3 raíces primarias y la mayor longitud de las raíces cuando en el medio de cultivo se incluyó la composición orgánica de DF modificada junto con 1 mg/l de IBA

Palabras clave: portainjertos, *Prunus*, propagación *in vitro*, enraizamiento.

Arena, M.E. , O.H. Caso and P.E. Perelman, 1994. *In vitro* rooting of the plum rootstocks Mariana GF 8/1, Mirabolano B and San Julián GF 655/2. Agriscientia XI : 61-67.

SUMMARY

Shoot elongation and *in vitro* rooting of the plum rootstocks Mariana GF 8/1, Mirabolano B and San Julián GF 655/2 were studied.

The subculture of the shoots of 1.5 to 2 cm long on an elongation medium with Murashige & Skoog (MS) salts, the organic composition of de Fossard *et al.* (DF), 0.5 mg/l GA₃, 0.2 mg/l BA and 0.01 mg/l ANA, allowed to obtain at least 60% of shoots with good quality for rooting after 21 days in Mirabolano B and San Julián GF 655/2 while in Mariana GF 8/1 42 days were needed.

The culture medium with modified MS organic composition and 1 mg/l IBA induced 100% of rooted shoots after 12 and 16 days in San Julián GF 655/2 and Mariana GF 8/1 respectively. At the same time, root systems with an acceptable number of roots

per shoot and the highest total length of the roots were obtained. In Mirabolano B, 45% of rooted shoots with 3 primary roots and the highest length of the roots were obtained with the modified DF organic composition and 1 mg/l IBA.

Keywords: rootstocks, *Prunus*, *in vitro* propagation, rooting.

M.E. Arena, O.H. Caso y P.E. Perelman. Centro de Ecofisiología Vegetal (CONICET). Serrano 665 (1414) Capital Federal, Argentina.

INTRODUCCIÓN

El enraizamiento de los brotes es un paso crítico en la propagación por cultivo *in vitro* para numerosas plantas leñosas (Wang, 1991). Es por ello que si bien en numerosas publicaciones sobre la micropropagación de árboles frutales se dieron a conocer protocolos sobre el enraizamiento *in vitro*, aún hay algunas dificultades en la práctica, las cuales disminuyen la eficiencia y utilidad de la micropropagación (Orlikowska, 1992). La obtención de brotes de buena calidad para enraizar así como brotes con un adecuado sistema radical aseguran el éxito de la micropropagación y posterior adaptación de las plantas a las nuevas condiciones ambientales.

El empleo de los portainjertos San Julián GF 655/2, Mirabolano B y Mariana GF 8/1, ofrece una alternativa viable al cultivo del duraznero (al utilizar como pie al clon San Julián GF 655/2) y del ciruelo injertado sobre cualquiera de los tres portainjertos, en suelos pesados, con problemas de asfixia radical. Su micropropagación tiene como finalidad obtener plantas de origen certificado y sanidad controlada para la ejecución de posteriores ensayos de comportamiento en el campo (Arena y Caso, 1992).

El objetivo de este trabajo es estudiar la elongación de los brotes de los portainjertos de *Prunus* y comparar el efecto de diferentes composiciones orgánicas con y sin el agregado de ácido indol-3-butírico (IBA) sobre el enraizamiento de los mismos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal y preparación de los explantos

Los brotes de los portainjertos *Prunus munsoniana* Wight et Hedr x *Prunus cerasifera* Ehrh Mariana GF 8/1, *Prunus cerasifera* Ehrh Mirabolano B y *Prunus insititia* L. San Julián GF 655/2, se obtuvieron según la metodología descrita en un trabajo anterior (Arena y Caso, 1992), luego de 10 meses de cultivo *in vitro*, con subcultivos cada tres semanas.

Para el alargamiento, se emplearon brotes axilares de 1 a 1,5 (Grupo A) y de 1,5 a 2 cm (Grupo B) de longitud, producidos durante la etapa de multiplicación. Al momento de iniciar el alargamiento de los brotes, se cortaron 2-3 mm de las bases de los tallos así como también las hojas basales.

Para el enraizamiento se utilizaron brotes con una longitud mínima de 2 cm, con sus entrenudos alargados y sus hojas expandidas. Los brotes que presentaban estas características se consideraron con calidad enraizable.

Medios y condiciones de cultivo

Los brotes se cultivaron en un medio de alargamiento de entrenudos compuesto por la solución salina de Murashige & Skoog (1962), mientras que la composición orgánica usada fue la de de Fossard *et al.* (1974). Se agregaron los siguientes reguladores del crecimiento según Zuccherelli (1979): ácido giberélico (GA₃) 0,5 mg/l; 6-benciladenina (BA) 0,2 mg/l y ácido naftalénacético (ANA) 0,01 mg/l. Además el medio de cultivo fue suplementado con 30.000 mg/l de sacarosa y 8.000 mg/l de agar.

Para el enraizamiento se empleó la solución salina de Murashige & Skoog, con los macronutrientes reducidos a la mitad. Se probaron dos composiciones orgánicas: la del medio citado, modificada con 0,4 mg/l de tiamina —MS— y la de de Fossard *et al.* —DF—, modificada con 0,37 mg/l de riboflavina, para lo cual se tuvieron en cuenta los resultados obtenidos por Drew *et al.* (1991). Además se ensayaron dos concentraciones de IBA: 0,0 y 1,0 mg/l. A todos los medios se les agregó (mg/l): GA₃, 0,1; sacarosa, 30.000 y agar, 8.000.

Tanto para el alargamiento como para el enraizamiento se distribuyeron 50 ml de medio en frascos de 350 ml, colocándose 5 brotes por frasco para el alargamiento y 4 brotes por frasco para el enraizamiento. El pH de los medios se ajustó a 5,75 ± 0,02 con KOH 1 N y su esterilización se llevó a cabo en autoclave durante 20 min a 1013 mb de presión. Las condiciones de cultivo fueron de 24 ± 1°C de temperatura, con un fotoperiodo de 16 hs de luz sumi-

nistrado por tubos fluorescentes de luz blanca fría con una radiación fotosintéticamente activa (PAR) de $57 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Evaluaciones y análisis estadístico

Luego de 21 días de iniciado el período de alargamiento se evaluaron las siguientes características: variación de la longitud de los brotes y % de brotes ≥ 2 cm de longitud.

Para el enraizamiento quedó diseñado un ensayo con tres factores (composición orgánica, concentración de IBA y portainjerto), con 5 frascos por tratamiento. A los 28 días de iniciado el período de enraizamiento se evaluaron: porcentaje de enraizamiento, número de raíces primarias (N), longitud promedio (L) y longitud total (LT) de las mismas por brote enraizado. Además durante el enraizamiento se evaluaron los porcentajes de enraizamiento parciales cada 4 días. Los datos de los porcentajes de enraizamiento se analizaron considerando los tres factores mencionados a través del Análisis de la Varianza, mediante la Prueba de Fisher, mientras que para el análisis de N, L y LT se consideró como único factor al tratamiento.

Tanto para el alargamiento como para el enraizamiento las experiencias fueron repetidas dos veces.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Alargamiento de los brotes

Luego de 21 días de iniciado el alargamiento de los brotes, la totalidad de estos correspondientes al Grupo A del clon Mariana GF 8/1, no alcanzó los 2 cm establecidos para poder ser enraizados. Sólo el 30% de los brotes del Grupo B alcanzó una longitud igual o mayor que 2 cm (Tabla 1). Por tal motivo, se decidió continuar con el tiempo de alargamiento de éstos por un nuevo período de 21 días en el mismo medio fresco. Así al cabo de dicho período, el 24% de los brotes del Grupo A alcanzó el tamaño enraizable, mientras que el 100% de aquellos con una longitud inicial mayor (Grupo B), alcanzó dicho tamaño. En el clon Mirabolano B, un período de alargamiento de 21 días en el medio de cultivo probado, fue suficiente para la obtención de un 65% como mínimo de brotes con calidad enraizable. En el clon San Julián GF 655/2, al cabo de 21 días del período de alargamiento, el 25% de los brotes del Grupo A alcanzó el tamaño enraizable, mientras que en aquellos del grupo B, el 60% alcanzó dicho tamaño.

Puede observarse que mientras en Mariana GF 8/1 el incremento en longitud fue similar en los dos

Tabla 1. Variación de la longitud de los brotes y porcentaje de brotes ≥ 2 cm de longitud obtenidos al final del período de alargamiento.

Clones	Long. de los brotes al inicio del alargamiento			
	Grupo A 1 a 1,5 cm		Grupo B 1,5 a 2 cm	
	Variación long (%)	Brotes \geq 2 cm (%)	Variación long (%)	Brotes \geq 2 cm (%)
Mariana GF 8/1	- 41,17*	0 24*	- 43,40*	30 100*
Mirabolano B	66,92	65	53,19	96
San Julián GF 655/2	50,00	25	19,77	60

* Datos obtenidos a los 42 días.

rangos de tamaño inicial al cabo de los 42 días de alargamiento, en Mirabolano B y San Julián GF 655/2 los brotes del Grupo A tuvieron un incremento mayor de su longitud con respecto a los del Grupo B. A pesar de ello, los brotes del Grupo B alcanzaron en mayor porcentaje el tamaño enraizable con respecto a aquellos inicialmente más cortos, en los tres clones.

La aparición de necrosis en los ápices sólo se observó en unos pocos brotes durante su elongación, posiblemente debido a la presencia de citocininas (BA) en el medio de cultivo, tal como ha sido observado en el cultivo *in vitro* de *Castanea* spp. (Vieitez Martin *et al.*, 1987), *Prunus avium* (Druart *et al.*, citado por Vieitez Martin *et al.*, 1987) y en el enraizamiento de *Malus domestica* (Kataeva *et al.*, 1991). La aparición de necrosis apical en los brotes fue importante cuando en ensayos preliminares no se adicionó BA en el medio de alargamiento.

La obtención de brotes con sus entrenudos alargados, láminas foliares expandidas y sin necrosis en sus ápices en la etapa de alargamiento es muy importante, ya que si éstos son demasiados cortos y sus láminas foliares pequeñas y arrossetadas, no enraizan o bien lo hacen con dificultad y de manera discontinua (Zuccherelli, 1979).

Enraizamiento de los brotes

La composición orgánica, la concentración de IBA y el portainjerto afectaron significativamente el

porcentaje de enraizamiento final de los brotes (Tabla 2). El porcentaje de enraizamiento final obtenido con la composición orgánica de MS fue significativamente superior con respecto al obtenido con la composición orgánica de DF. El agregado de 1 mg/l de IBA aumentó significativamente el porcentaje de enraizamiento con respecto a la ausencia de dicho regulador del crecimiento. Por otra parte, en los clones San Julián GF 655/2 y Mariana GF 8/1 los porcentajes de enraizamiento obtenidos fueron sig-

nificativamente superiores con respecto a los obtenidos en Mirabolano B. Las interacciones entre los factores no fueron significativos a los 28 días.

Al analizar el efecto de la composición orgánica, la concentración de IBA y el clon sobre los porcentajes de enraizamiento parciales, se encontraron interacciones significativas particularmente entre composición orgánica y clon (Tabla 2), lo cual estaría indicando que el efecto de la composición orgánica depende del clon.

Tabla 2. Efecto de la composición orgánica, de la concentración de IBA y del clon sobre el porcentaje de enraizamiento.

Clones	Comp. org.	IBA mg/l	ENRAIZAMIENTO (%)					
			Días de enraizamiento					
			8	12	16	20	24	28
Mariana GF 8/1	DF	0	0	0	0	5	25	45
	DF	1	10	40	65	70	80	85
	MS	0	10	40	45	45	50	55
	MS	1	5	85	100	100	100	100
Mirabolano B	DF	0	0	0	0	5	5	5
	DF	1	15	25	25	30	45	45
	MS	0	0	0	0	0	0	0
	MS	1	25	35	40	40	45	50
San Julián GF 655/2	DF	0	0	10	20	20	30	40
	DF	1	40	80	90	90	90	90
	MS	0	10	60	60	70	70	70
	MS	1	60	100	100	100	100	100

Efectos principales:

Composición orgánica	*	**	**	**	**	*
Concentración de IBA	**	**	**	**	**	**
Clon	**	**	**	**	**	**

Interacciones:

Comp org x IBA	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Comp org x Clon	ns	**	*	*	*	ns
IBA x Clon	**	ns	ns	ns	ns	ns
Comp org x IBA x Clon	**	*	*	*	ns	ns

ns, *, **, diferencias no significativas, significativas al nivel de confianza del 95% y 99%, respectivamente.

Tabla 3. Número de raíces primarias (N), longitud promedio (L) y longitud total (LT) de las mismas por brote enraizado, luego de 28 días de iniciado el período de enraizamiento.

Comp. Org.	IBA (mg/l)	N	L (cm)	LT (cm)
Mariana GF 8/1				
DF	0	2,25 ± 0,31 ¹ a	1,63 ± 0,13 c	3,93 ± 0,75 b
DF	1	3,05 ± 0,92 ab	3,23 ± 0,38 b	8,74 ± 1,75 a
MS	0	2,35 ± 0,45 b	4,68 ± 0,94 a	10,82 ± 2,59 a
MS	1	4,65 ± 0,53 a	2,20 ± 0,22 bc	9,30 ± 1,01 a
Mirabolano B				
DF	0	1,00 ± 0,00 ²	2,20 ± 0,00 ²	1,00 ± 0,00 ²
DF	1	3,00 ± 0,60 a	2,68 ± 0,20 a	7,75 ± 1,88 a
MS	0	–	–	–
MS	1	2,38 ± 0,45 a	1,14 ± 0,18 b	2,73 ± 0,61 b
San Julián GF 655/2				
DF	0	1,33 ± 0,33 b	2,35 ± 0,42 a	2,98 ± 0,54 c
DF	1	2,80 ± 0,33 a	3,26 ± 0,51 a	7,07 ± 0,66 b
MS	0	1,25 ± 0,25 b	5,25 ± 1,47 a	5,68 ± 1,16 bc
MS	1	2,80 ± 0,46 a	4,80 ± 0,42 a	12,15 ± 1,34 a

1 Promedio ± ES. Letras distintas entre los tratamientos de un mismo clon indican diferencias significativas al nivel de confianza del 95%, de acuerdo con la Prueba de Duncan.

2. Datos no introducidos en el análisis por número reducido de repeticiones.

Las diferencias observadas en el enraizamiento entre MS y DF con o sin el agregado de IBA, podrían deberse no sólo a la diferente composición orgánica sino también a la probable acción fotooxidante que la riboflavina podría ejercer tanto sobre los niveles de auxina endógenos como sobre la auxina agregada. Es sabido que la riboflavina sensibiliza la fotooxidación *in vitro* de un número de compuestos tales como ácido indol-3-acético (AIA) e IBA (Gals-ton, 1949), ANA (Gortner and Kent, 1953) entre otros. Sin embargo los niveles de IBA remanentes luego de su probable fotooxidación parcial por acción de la riboflavina serían suficientes como para estimular los altos porcentajes de enraizamiento observados en San Julián GF 655/2 y en Mariana GF 8/1. Estos resultados concuerdan con los reportados por Miller *et al.* (1982) quienes encontraron que la riboflavina presente en las vitaminas de Staba (Staba, 1969) juntamente con ANA, inhibía el enraizamiento del portainjerto de duraznero "Nemaguard". Probablemente la

oxidación rápida del ANA exógeno impidió el tiempo suficiente de exposición a dicha auxina para la iniciación de las raíces (Drew *et al.*, 1991).

Las diferencias en el porcentaje de enraizamiento particularmente entre los clones Mariana GF 8/1 y San Julián GF 655/2 con respecto a Mirabolano B, podrían sugerir que probablemente sean distintas las concentraciones hormonales endógenas (relación citoquininas/auxinas) en estos portainjertos, hecho que posiblemente provocaría respuestas diferenciales entre los clones ante similares composiciones de los medios de cultivo.

Los porcentajes de enraizamiento obtenidos con la composición orgánica de MS en San Julián GF 655/2 fueron similares a los descriptos por Rosati e Marino (1979), mientras que en Mirabolano B coincidieron con los reportados por Hammerschlag (1982) para el clon Mirabolano. En el portainjerto Mariana GF 8/1, Monsion *et Dunez* (1971) obtuvieron

porcentajes de enraizamiento de alrededor del 77% cuando utilizaron el mismo medio de cultivo, aunque adicionado con AIA y cinetina.

El agregado de 1 mg/l de IBA favoreció la formación de un mayor número de raíces por brote enraizado tanto con MS como con DF, con respecto a la ausencia de dicho regulador (Tabla 3). A su vez, las raíces que crecieron con IBA y con MS fueron más cortas, o a lo sumo similares con respecto a aquellas que lo hicieron sin regulador del crecimiento. Sin embargo, con DF la longitud de las raíces aumentó cuando al medio de cultivo se le agregó 1 mg/l de IBA, aunque sólo dicho incremento fue significativo en Mariana GF 8/1. Es posible que al adicionar IBA juntamente con riboflavina e incubar al medio de cultivo en la luz, la auxina sea efectivamente removida y las raíces resultantes comparativamente más largas (Gorst *et al.*, 1983).

En Mirabolano B, la composición orgánica de DF juntamente con IBA (Figura 1) permitió la obtención de raíces más largas y la mayor longitud total de las mismas que con MS y el agregado de IBA. Por otro

lado, el número de raíces fue similar con ambas composiciones orgánicas al comparar medios con iguales concentraciones de IBA, en los tres portainjertos.

No se observó la presencia de callo en las bases de los brotes en ninguna de las combinaciones probadas. Esto es un hecho positivo para la funcionalidad del sistema radical dado que la continuidad de los vasos entre la raíz y el brote contribuye para tal fin (Filiti *et al.*, 1987).

BIBLIOGRAFÍA

- Arena, M E y O.H. Caso, 1992. "Factores que afectan la multiplicación *in vitro* de los brotes de portainjertos de *Prunus*". *Phyton* 53 (1). 29-38, VII.
- de Fossard, R.A., A Myint and E.C.M. Lee, 1974. "A broad spectrum tissue culture experiment with tobacco (*Nicotiana tabaccum* L.) pith tissue callus". *Physiol Plant* 31, 125-30
- Drew, R A, B.W Simpson and W.J. Osborne, 1991 "Degradation of exogenous indole-3-butyric acid and riboflavin and their influence on rooting response of papaya *in vitro*". *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 26:29-34

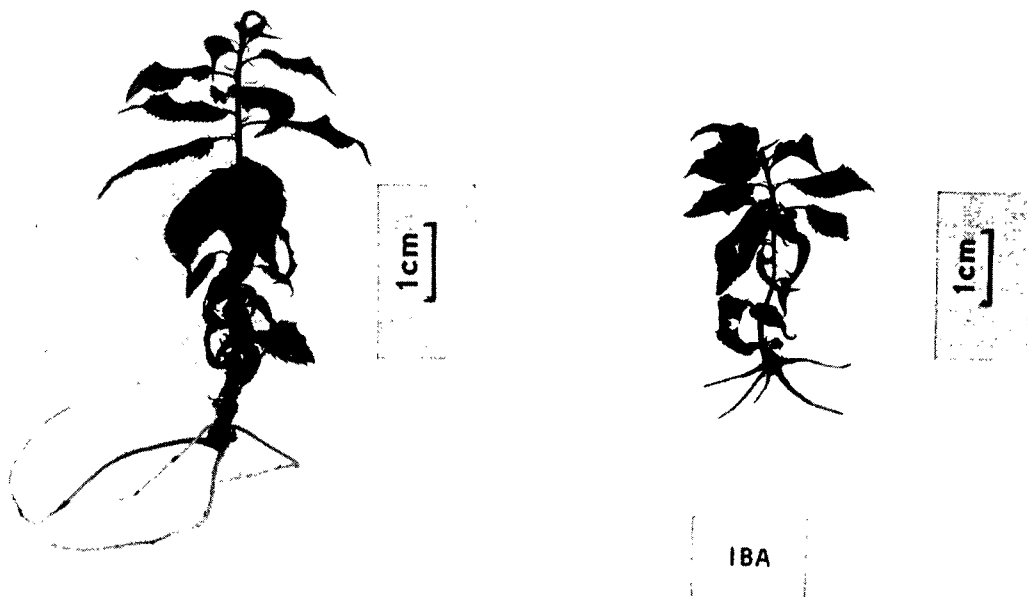


Figura 1. Brotes enraizados del clon Mirabolano B con 1 mg/l de IBA en los medios con la composición orgánica de de Fossard *et al.* (Izquierda) y Murashige & Skoog (derecha).

- Filiti, N., N. Montuschi and P. Rosati, 1987. "In vitro rhizogenesis: histo-anatomical aspects on *Prunus* rootstock". *Adv Hort Sci* 1: 34-38.
- Galston, A.W., 1949. "Riboflavin-sensitized photooxidation of indole-acetic acid and related compounds". *Proceedings of the National Academy of Science, U.S.A.* 35, 10-17.
- Gorst, J.R., M. Slaytor and R.A. de Fossard, 1983. "The effect on Indole-3-Butyric Acid and Riboflavin on the Morphogenesis of Adventitious Roots of *Eucalyptus ficifolia* F. Muell. Grown *in vitro*". *J. Exp. Bot.*, Vol. 34, Nº 148, 1503-1515.
- Gortner, W.A. and M.J. Kent, 1953. "Indoleacetic acid oxidase and an inhibitor in pineapple tissue". *J. Biol.Chem.*, 204, 593-603.
- Hammerschlag, F., 1982. "Factors influencing *in vitro* Multiplication and Rooting of the Plum Rootstock Myrobalan (*Prunus cerasifera* Ehrh.)". *J. Amer. Soc. Hort. Sci* 107 (1): 44-47.
- Kataeva, N.V., I.G. Alexandrova, R.G. Butenko and E.V. Dragavtceva, 1991. "Effect of applied and internal hormones on vitrification and apical necrosis of different plants cultured *in vitro*". *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 27: 149-154.
- Miller, G.A., D.C. Coston, E.G. Denny and M.E. Romeo, 1982. "In vitro propagation of "Nemaguard" peach rootstock". *HortScience* 17 (2): 194.
- Monsion, M. et J. Dunez, 1971 "Obtention de jeunes plants de *Prunus mariana* à partir de boutures cultivées *in vitro*". *C.R. Acad Sc Paris Serie D* 272, 1861-1864.
- Murashige, T. and F. Skoog, 1962. "A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures". *Physiol Plant* 15, 473-497.
- Orlikowska T., 1992. "Effects of mineral composition and acidity of media, saccharose level, brand and quantity of agar on rooting of fruit rootstocks *in vitro*". *Biol Plant* 34 (1-2): 45-52.
- Rosati, P. e G. Marino, 1979. "Micropropagazione dei portainnesti degli alberi da frutto. Nota I: Micropropagazione di quattro portainnesti del pesco". *Centro di Studio di tecnica Frutticola del C.N.R.* 141, pp. 155-165.
- Staba, J.E., 1969. "Plant tissue culture as a technique for the phytochemist". *Recent Adv. in Phytochem.* 2:80.
- Vieitez Martin, A.M., A. Ballester Alvarez-Pardiñas, M.L. Vieitez Madiñan, M.C. San José Capilla, F.J. Vieitez Madiñan y E. Vieitez Cortizo, 1987. "Cultivo *in vitro* del castaño". En *Propagación de plantas leñosas por cultivo in vitro*, Diputación Provincial de Pontevedra, España pp. 33-50.
- Wang, Q.C., 1991. "Factors affecting rooting of microcuttings of the pear rootstock BP10030". *Sci Hort.* 45: 209-213.
- Zuccherelli, G., 1979. "Moltiplicazione *in vitro* dei portainnesti clonali del pesco". *Frutticoltura* 41, 15-20