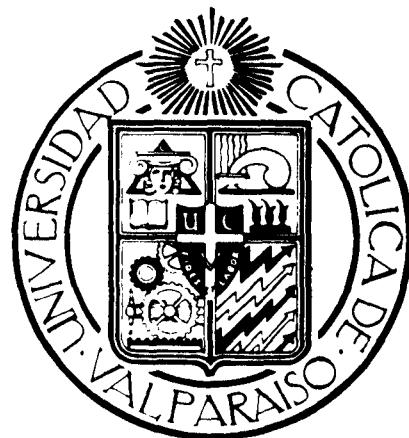


UNIVERSIDAD CATOLICA DE VALPARAISO
FACULTAD DE AGRONOMIA

AREA DE FRUTICULTURA



TALLER DE LICENCIATURA

PROPAGACION *in vitro* DE PORTAINJERTOS DE PALTO (*Persea americana* Mill.) cvs. "LULA" Y "VELVICK", RESISTENTES A SALINIDAD: ENRAIZAMIENTO Y ACLIMATACION.

SOLANGE SAN MARTIN SAAVEDRA

**QUILOTA CHILE
1996**

INDICE DE MATERIAS

| | | |
|----------|--|----|
| 1. | INTRODUCCION | 1 |
| 2. | REVISION BIBLIOGRAFICA | 4 |
| 2.1 | Micropropagación del palto | 4 |
| 2.1.1. | Explante | 5 |
| 2.1.2. | Epoca de explantación | 6 |
| 2.1.3. | Desinfección | 7 |
| 2.2. | Pardeamiento | 8 |
| 2.2.1. | Control del pardeamiento | 11 |
| 2.2.1.1. | Etiolación | 13 |
| 2.3. | Rizogénesis | 16 |
| 2.3.1. | Formación de raíces adventicias | 16 |
| 2.3.2. | Origen del material vegetal y potencial de enraizamiento | 17 |
| 2.3.3. | Respuesta auxínica | 18 |
| 2.3.4. | Compuestos fenólicos | 20 |
| 2.3.5. | Sales minerales | 20 |
| 2.4. | Aclimatización | 21 |
| 2.4.1. | Sistemas de aclimatización | 23 |
| 3. | MATERIAL Y METODO | 26 |
| 3.1. | Ubicación | 26 |
| 3.2. | Material vegetal | 26 |
| 3.3. | Desinfección | 27 |
| 3.4. | Medio de cultivo | 29 |
| 3.5. | Condiciones de cultivo | 29 |
| 3.6. | Ensayo 1. Efecto de la transferencia sucesiva del explante a un medio fresco sobre el pardeamiento y formación de brotes a partir de yemas axilares de material de campo de los cvs. 'Lula' y 'Velvick' | 29 |
| 3.6.1. | Recolección y manipulación del material vegetal | 29 |
| 3.6.2. | Diseño experimental | 31 |
| 3.6.2.1. | Tratamientos | 31 |
| 3.6.2.2. | Variables evaluadas | 32 |
| 3.6.2.3. | Ánálisis estadístico | 35 |

| | | |
|-------|--|----|
| 3.7. | Ensayo 2. Efecto de diferentes concentraciones de AIB en el enraizamiento <i>in vitro</i> de los cvs. 'Lula' y 'Velvick' a partir de yemas axilares de material de campo | 36 |
| | 3.7.1. Recolección y manipulación del material vegetal | 36 |
| | 3.7.2. Diseño experimental | 37 |
| | 3.7.2.1. Tratamientos | 37 |
| | 3.7.2.2. Variables evaluadas | 38 |
| 3.8. | Ensayo 3. Influencia de diferentes concentraciones de AIB en el enraizamiento directo de secciones natales de material de campo e invernadero del cv. 'Lula' | 38 |
| | 3.8.1. Recolección y manipulación del material vegetal | 38 |
| | 3.8.2. Diseño experimental | 39 |
| | 3.8.2.1. Tratamientos | 39 |
| | 3.8.2.2. Variables evaluadas | 40 |
| | 3.8.2.3. Análisis estadístico | 42 |
| 3.9. | Ensayo 4. Efecto del hipoclorito de sodio y el medio de cultivo en los niveles de oxidación y contaminación de secciones natales del cv. 'Lula' | 42 |
| | 3.9.1. Recolección y manipulación del material vegetal | 43 |
| | 3.9.2. Medio de cultivo | 43 |
| | 3.9.3. Tratamientos | 44 |
| | 3.9.4. Variables evaluadas | 44 |
| | 3.9.4.1. Oxidación | 44 |
| | 3.9.4.2. Contaminación | 45 |
| | 3.9.5. Diseño experimental y análisis estadístico | 45 |
| 3.10. | Ensayo 5. Efecto de la etiolación sobre la oxidación y organogénesis de yemas axilares del cv. 'Lula' | 47 |
| | 3.10.1. Recolección y manipulación del material vegetal | 47 |
| | 3.10.1.1. Material etiolado | 47 |
| | 3.10.1.2. Material sin etiolar | 48 |
| | 3.10.2. Tratamientos | 48 |

| | |
|--|----|
| 3.10.3. Variables evaluadas | 48 |
| 3.10.3.1. Brotación | 48 |
| 3.10.3.2. Oxidación | 48 |
| 3.10.3.3. Contenido de fenoles totales | 49 |
| 3.10.3.4. Diseño experimental y análisis estadístico | 49 |
| 3.11. Ensayo 6. Evaluación de dos sistemas de aclimatación sobre la sobrevivencia y desarrollo radical, de plantas <u>in vitro</u> del cv. 'Lula' y 'Velvick' | 50 |
| 4. PRESENTACION Y DISCUSION DE RESULTADOS | 53 |
| 4.1. Ensayo 1. Efecto de la transferencia sucesiva del explante a un medio fresco sobre el pardeamiento y formación de brotes a partir de yemas axilares de material de campo de los cvs. 'Lula' y 'Velvick' | 53 |
| 4.1.1. Oxidación y brotación | 53 |
| 4.1.2. Contaminación | 58 |
| 4.2. Ensayo 2. Efecto de diferentes concentraciones de AIB en el enraizamiento <u>in vitro</u> de los cvs. 'Lula' y 'Velvick' a partir de yemas axilares de material de campo | 58 |
| 4.3. Ensayo 3. Influencia de diferentes concentraciones de AIB en el enraizamiento directo de secciones nodales de material de campo e invernadero del cv. 'Lula' | 59 |
| 4.3.1. Contaminación | 60 |
| 4.3.1.1. Identificación de agentes contaminantes de material campo | 63 |
| 4.3.1.2. Identificación de agentes contaminantes material invernadero | 67 |
| 4.3.2. Oxidación | 70 |
| 4.3.3. Enraizamiento y callo basal | 73 |
| 4.3.4. Brotación | 78 |

| | | |
|----------|---|-----|
| 4.4. | Ensayo 4. Efecto del hipoclorito de sodio y el medio de cultivo en los niveles de oxidación y contaminación de secciones nodales del cv. 'Lula' | 84 |
| 4.4.1. | Oxidación | 84 |
| 4.4.1.1. | Efecto del hipoclorito de sodio y medio de cultivo | 84 |
| 4.4.2 | Contaminación | 87 |
| 4.4.2.1. | Efecto del medio de cultivo | 87 |
| 4.4.2.2. | Efecto del hipoclorito de sodio | 88 |
| 4.5. | Ensayo 5. Efecto de la etiolación sobre la oxidación y organogénesis de yemas axilares del cv. 'Lula' | 90 |
| 4.5.1. | Oxidación | 90 |
| 4.5.2. | Brotación | 98 |
| 4.6. | Ensayo 6. Evaluación de dos sistemas de aclimatisación sobre la sobrevivencia y desarrollo radical, de plantas <u>in vitro</u> del cv. 'Lula' y | 99 |
| 5. | CONCLUSIONES | 101 |
| 6. | RESUMEN | 103 |
| 7. | LITERATURA CITADA | 104 |
| (ANEXOS) | | |

1. INTRODUCCION

El palto (Persea americana Mill.) se ha transformado en una especie relevante en Chile, debido a la evolución de su superficie plantada. De las 4500 hectáreas existentes en 1974, se produjo un crecimiento anual de 4,16% determinándose para el año 1992 una superficie de 9376 ha, concentrándose principalmente entre la V y VI Regiones (CIREN-CORFO, 1993). Dentro de esta distribución geográfica se encuentran zonas con problemas de salinidad producto del agua de riego provenientes del Río Mapocho y Maipo, los cuales presentan altas concentraciones de sales. Por lo cual, la posibilidad de disponer de portainjertos resistentes a salinidad, permitiría aumentar su plantación en zonas con tales limitaciones.

En la colección de germoplasma de la empresa Agrícola Huerto California Ltda., se encuentran dos portainjertos de palto resistentes a salinidad: 'Lula' (hibrido guatemalteco x mexicano), obtenido hace unos treinta años en Florida. Árbol de rápido crecimiento y de gran capacidad de fructificación, se cultiva en el valle de Jordán (Israel) por su gran resistencia a la salinidad; y 'Velvick' (hibrido guatemalteco) de origen australiano,

que presenta además, resistencia a Phytophthora.

La micropropagación ofrece una alternativa rápida de multiplicación de patrones si se superan las dificultades en el cultivo de tejidos de la especie, dando la posibilidad de disponer de patrones clonales uniformes genéticamente, con buenas producciones y resistencia a condiciones adversas.

Esta investigación forma parte de la segunda etapa de un proyecto para determinar la factibilidad de la propagación *in vitro* de dos portainjertos de palto cvs. 'Lula' y 'Velvick'.

En su primera fase se determinó las primeras etapas de la micropropagación: establecimiento y proliferación de explantes, por lo cual, los objetivos planteados para esta segunda fase, enraizamiento y aclimatización, son los siguientes:

- Determinar el efecto de la transferencia sucesiva del explante a un medio fresco, sobre el pardeamiento y formación de brotes de yemas axilares de los cvs. 'Lula' y 'Velvick'.

- Establecer el efecto de diferentes concentraciones de ácido indol-butírico en el enraizamiento in vitro mediante el cultivo de yemas axilares de los cvs. 'Lula' y 'Velvick'.
- Evaluar diferentes concentraciones de ácido indol-butírico sobre el enraizamiento directo de secciones nodales.
- Determinar el efecto del medio de cultivo y la desinfección con hipoclorito de sodio sobre la oxidación y contaminación de secciones nodales del cv. 'Lula'.
- Establecer el efecto de la etiolación en la oxidación y organogénesis de yemas axilares del cv. 'Lula'.
- Evaluar dos sistemas de aclimatización, que permitan la adaptación de una condición in vitro a una ex vitro, requerida para el éxito de la microporpagación.

2. REVISION BIBLIOGRAFICA

2.1. Micropropagación del palto (*Persea americana* Mill.):

La micropropagación del palto, por ser una especie recalcitrante (DALSASO y GUEVARA, 1989; PLIEGO-ALFARO et al., 1990), se ha caracterizado por la fácil propagación del material juvenil, mientras que es difícil la manipulación *in vitro* del material que ha alcanzado la fase adulta.

Los modelos de propagación llevados a cabo van dirigidos hacia la puesta a punto de técnicas de rejuvenecimiento que restauren el potencial morfogenético del material adulto de *Persea americana* Mill. para hacer efectiva su propagación *in vitro* (PLIEGO-ALFARO et al., 1990).

Se ha intentado establecer *in vitro* yemas adultas procedentes de tallos en crecimiento activo de los portainjertos GvarAm-13 y IV-8 (selecciones de la Estación Experimental La Mayora), obteniéndose resultados negativos producto de una alta necrosis apical que impide su cultivo continuado (PLIEGO-ALFARO et al., 1990).

En cambio, DALSASO y GUEVARA (1989) han logrado resultados satisfactorios cultivando in vitro yemas axilares y microestacas de material adulto del cv. 'Fuerte'.

2.1.1. Explante

Diversos explantes de palto, como: embriones maduros e inmaduros, tallos, yemas axilares de material juvenil y adulto, hojas, flores, frutos (mesocarpo), pedúnculo, polen y protoplasto han sido cultivados in vitro (MOHAMED-YASSEEN, 1993).

Plantas de palto completas se han obtenido a partir de embriones axilares (MOHAMED-YASSEEN *et al.*, 1992) y yemas axilares (SCHALL, 1987; GONZALEZ-ROSAS, SALAZAR-GARCIA y VAZQUEZ, 1985).

Se ha logrado germinación con el cultivo in vitro de polen (SAHAR y SPIGEL-ROY, 1984) y embriones maduros, técnica posible de aplicar en la obtención de patrones para micro injertación (PLIEGO-ALFARO y MURASHIGE, 1987; GONZALEZ-ROSAS, LLANO-AGUDELO y SALAZAR-GARCIA, 1990).

2.1.2. Época de explantación

Las condiciones internas del explante y el estado fisiológico de la planta madre afectan el desarrollo in vitro, por lo cual, la época de recolección del material vegetal determina una potencialidad diferencial en su respuesta de crecimiento.

Así lo demuestra DALSASO y GUEVARA (1989) logrando los mejores resultados en la multiplicación clonal de *Persea americana* cv. "Fuerte" por medio de yemas axilares recolectadas durante el inicio del crecimiento vegetativo, el cual fue decreciendo al iniciarse el periodo floral y durante el desarrollo del fruto.

La respuesta del material según la época de recolección, se relaciona con lo expresado por WHILEY y SCHAFFER (1993), los cuales han demostrado que el brote vegetativo presenta su máxima capacidad de "sink" a los 18 días de iniciada la brotación (DDIB), recibiendo los fotoasimilados que producen las hojas maduras. En cambio, a los 34 DDIB se produce un mayor flujo basipétalo de los fotosintatos, momento en el cual la capacidad de "sink" de las raíces supera a la de los brotes nuevos. De esta

forma, los DDIB indican una fecha de referencia para establecer el momento de recolección de explantes.

2.1.3. Desinfección

El objetivo de la desinfección del material vegetal previo a la iniciación del cultivo *in vitro* es esencial para superar la etapa de establecimiento. Los diferentes tratamientos se orientan a eliminar los microorganismos que se encuentran en altas poblaciones sobre el tejido vegetal, teniendo en cuenta que no deben causar daño en los explantes. Los agentes contaminantes, como hongos y bacterias, dificultan el cultivo *in vitro* debido a las condiciones ambientales y los componentes del medio de cultivo que favorecen su crecimiento, cubriendo el explante y alterando la composición química del medio nutritivo (DE FOSSARD, 1992).

El hipoclorito de sodio (NaClO) es uno de los desinfectantes más efectivos y usados en la micropropagación (DE FOSSARD, 1992; McCLELLAND, 1993); su efectividad está en función de la concentración y duración del tratamiento. Una solución del 1% por 20 minutos puede probablemente ser efectiva contra un amplio

rango de microorganismos con sus estructuras reproductivas en estado vegetativo, en cambio, las esporas requieren mínimo cuatro horas para su control.

El alcohol es también, un desinfectante de material vegetal empleado en la micropagación en conjunto con el hipoclorito de sodio. Es así, como DYANEDEL (1995) logra las tasas más bajas de contaminación en Persea americana Mill. cvs. 'Lula' y 'Velvick' al sumergir los explantes en etanol al 95% por cinco segundos y posteriormente tratarlos con hipoclorito de sodio en concentraciones de 0.25% o 0.5%. Ambos esterilizantes químicos producen oxidación en plantas leñosas (KURTZ y TOLLEY, 1990; McCLELLAND, 1993). El hipoclorito de sodio puede ser tóxico para el tejido vegetal en concentraciones superiores al 10% (McCLELLAND, 1993).

2.2. Pardeamiento:

El establecimiento en cultivo in vitro de diversas especies de plantas, en especial las leñosas, se dificulta debido al pardeamiento letal del explante y medio de cultivo. El pardeamiento es considerado en general como el resultado de la oxidación atmosférica y

enzimática (polifenol oxidasa) de compuestos fenólicos liberados a través del corte final efectuado a los explantes (BHAT y CHANDEL, 1991).

Polifenol oxidasa (PPO) es una enzima plastidial que cataliza la oxidación de O-difencoles a O-diquinonas, así como la O-hidroxilación de monofenoles. Su rol en el metabolismo fenólico está claro durante la senescencia y el daño, momento en que los contenidos de plastidios y vacuolas se mezclan, originando pardeamiento y posterior necrosis (VAUGHN y DUKE, 1984).

Las plantas pueden presentar una gran diversidad de compuestos fenólicos, tales como fenoles simples, ácidos fenólicos, cumáricos, flavonoides y taninos. Los ácidos fenólicos son generalmente secuestrados en la vacuola celular o espacios tisulares. Sin embargo, cuando se produce ruptura celular son liberados y oxidados a quinonas, las cuales se polimerizan y producen pardeamiento, reacción observada en superficies cortadas de frutos de (Persea americana Mill.) (TORRES, MAU-LASTOVICKA y REZAAIYAN, 1987), en los cuales el pardeamiento potencial es directamente relacionado con la actividad de la polifenol oxidasa (PPO) y el contenido de

fenoles.

Estudios en Annona muricata L. (LIMA DE OLIVIERA et al., 1994) revelan resultados similares determinando una correlación no solamente entre actividad de la PPO y la concentración de fenoles ($r=0.845$, $p < 0.01$), sino también entre intensidad de pardeamiento y los niveles de compuestos fenólicos ($r=0.8117$, $p < 0.05$), por lo cual, la actividad de la polifenol oxidasa y la concentración de fenoles en el tejido vegetal son importantes factores involucrados en el pardeamiento.

De igual forma, SCIANCALEPORE y LONGONE (1984) en ensayos efectuados en cinco variedades de Olea europaea L. determinaron una correlación positiva entre pardeamiento del fruto de olivo y la actividad de la polifenol oxidasa ($r=0.998$). Los valores obtenidos del contenido de PPO y la tasa de pardeamiento fueron significativamente diferentes en las variedades estudiadas, esta respuesta diferenciada se explica en forma directa con la actividad de la PPO, estableciendo que la baja actividad de la enzima se debe a la presencia de inhibidores o factores que la degradan.

TORRES, MAU-LASTOVICKA y REZAAIYAN (1987) han determinado concentraciones totales de fenoles e identificado 16 ácidos fenólicos en frutos (mesocarpo) y semillas (cotiledones) de diversas variedades de palto (Persea americana Mill.). Los ácidos fenólicos fueron extraídos mediante hidrólisis alcalina e identificados con las técnicas de cromatografía líquida de alta resolución, espectrofotometria y cromatografía líquida de bajo espectro.

2.2.1. Control del pardeamiento.

Las estrategias empleadas para superar los efectos nocivos del pardeamiento en el cultivo *in vitro*, aplicadas en pre-siembra o durante el desarrollo del cultivo, procuran neutralizar o anular la concentración de sustancias tóxicas en el medio. Estas incluyen: 1) utilización de explantes juveniles o recolectados a partir de crecimientos nuevos del flush vegetativo, 2) pre-tratamiento al plantel madre de etiolación o crecimiento bajo condiciones de baja intensidad lumínica (YU y MEREDITH, 1986), 3) cultivo en oscuridad (BAHT y CHANDEL, 1991), 4) transferencias a un medio fresco durante cortos intervalos de tiempo (BROOME y ZIMMERMAN,

1978; DALSASO y GUEVARA, 1989), 5) cultivo en medio líquido, 6) inclusión de antioxidantes en el medio de cultivo, o la inmersión de explantes en agua o soluciones que contienen antioxidantes previo a la inoculación (ZIV y HALEVY, 1983), 7) uso de agentes adsorbentes, tales como carbón activado y polivinilpirrolidona, 8) utilización de medios con bajos contenido de sales y adecuados reguladores de crecimiento y, 9) aplicación de una técnica simple que implica el sellado del corte final del explante con parafina, que controla el pardeamiento previniendo la exudación de sustancias dañinas (BHAT y CHANDEL, 1991).

Tratamientos de pre-siembra en Persea americana Mill. han permitido controlar en forma satisfactoria el pardeamiento. OYANEDEL (1995) contrarresta la oxidación sumergiendo ápices con yemas axilares en una solución de ácido cítrico 500 mg/l y ácido ascórbico 500 mg/l, con hielo 50% v/v hasta el momento de sembrar. DALSASO y GUEVARA (1989) logran buenos resultados en microestacas, las cuales son inmersas posterior a la desinfección, en una solución de PVP estéril durante 45 minutos. El pre-tratamiento con una solución de metasulfato de potasio 5% reduce la oxidación debido a su alto poder

reductor (SOLORZANO, 1989).

Yemas de palto cv. "Fuerte" logran un desarrollo satisfactorio, al realizar varias transferencias sucesivas de los explantes a un medio fresco, observándose un menor porcentaje de oxidación (DALSASO y GUEVARA, 1989).

2.2.1.1. Etiolación

La etiolación es considerada una técnica aplicable en la propagación por estacas de especies leñosas de difícil enraizamiento (MAYNARD y BASSUK, 1985; VIEITEZ y BALLESTER, 1988; BLAKESLEY, WESTON y ELLIOTT, 1992) y en el cultivo de tejidos de especies susceptibles al pardeamiento disminuyendo la pérdida y muerte de explantes por oxidación (MARKS y SIMPSON, 1990; YU y MEREDITH, 1986).

La etiolación por definición es la exclusión total de la luz, sin embargo, también es aplicada en plantas madres en forma localizada como un pretratamiento en la multiplicación por estacas, en el cual brotes en activo crecimiento se desarrollan en ausencia de luz, generando

como respuesta crecimientos con internudos largos, tejido suculento y deficientes en clorofila que se manifiesta en una coloración amarillenta o alba (HARTMANN, KESTER y DAVIES, 1990).

Estos mismos autores, establecen que la etiolación ha sido asociada con la variación de sustancias fenólicas que pueden actuar como cofactores o inhibidores de la acido-indol-acético oxidasa, y con diferencias anatómicas a nivel de tejido que incrementarian el potencial de enraizamiento relacionado con la indiferenciación de células parenquimáticas y la ausencia de barreras físicas.

VIEITEZ y BALLESTER (1988) logran superar las limitaciones en la propagación de castaño por estacas, restringida por su inhabilidad para enraizar mediante la etiolación previa a la recolección del material, generando 100% de enraizamiento complementado con tratamiento auxínico. El análisis químico, utilizando la técnica de Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC), efectuado a estacas provenientes de material etiolado y sometido a condiciones naturales de luminosidad demuestran que la etiolación previene la

formación de inhibidores del enraizamiento derivados del ácido elágico y que se encuentran presentes en las estacas del tratamiento control. La síntesis de estas sustancias inhibitorias del crecimiento requerirían la exposición a la luz.

Incrementos en el enraizamiento y sobrevivencia de estacas de Cotinus coggyrya se observaron al aplicar el pretratamiento de etiolación al plantel madre (BLAKESLEY, WESTON y ELLIOTT, 1992). Estos autores reportan además la existencia de un componente estacional que afecta la respuesta rizogénica de las estacas, al manifestar diferencias en el porcentaje de enraizamiento del material vegetal etiolado en dos fechas diferentes en el clon SB de Cotinus coggyrya.

Respuestas favorables en la organogénesis y sobrevivencia asociados al pretratamiento de etiolación y crecimiento en condiciones de baja intensidad lumínica al cual es sometido el material vegetal, se reportan en la micropropagación. MARKS y SIMPSON (1990) utilizando explantes de plantas sometidas a condiciones de oscuridad e irradación del 1% logran minimizar la oxidación fenólica en Hamamelis mollis "Pallida", Garrya elliptica

'James Roof' y Acer platanoides 'Crimson King'. De igual forma, YU y MEREDITH (1986) determinan la influencia del origen del explante sobre el pardeamiento y formación de brotes adventicios en el cultivo in vitro de ocho cultivares de Vitis vinifera L., encontrando una correlación negativa entre sobrevivencia in vitro y el contenido inicial de fenoles en los explantes, el cual es significativamente inferior en ápices de brotes sometidos a condiciones de baja intensidad lumínica.

2.3. Rizogénesis:

2.3.1. Formación de raíces adventicias

En base a un estudio histológico efectuado a microestacas enraizadas in vitro de Persea americana Mill. en un medio basal (GARCIA-GOMEZ et al., 1994), se observó en el inicio del cultivo (día cero) que las células del cambium no manifestaban ningún tipo de actividad y que el xilema contenía un elevado grado de lignificación. Después de tres días de permanecer en el medio de enraizamiento, el cambium muestra actividad, reflejado por condensaciones a nivel nuclear en sus células. A los seis días se

distinguen numerosas células de origen cambial dispuestas en forma radial en el xilema, también se aprecia un anillo xilemático y grupos de fibras floemáticas. Durante los días seis y nueve, se observa la formación de meristema de origen cambial dispuesto siempre muy próximo al floema. Después de los 9 a 12 días, los primordios de raíz continuan su desarrollo, una alta densidad celular se observa en la periferia y una diferenciación de elementos vasculares son visualizados en la parte inferior del primordio radical. Finalmente, a los 15 días las raíces de novo han traspasado la epidermis y son visibles en la base de la microestaca.

2.3.2. Origen del material vegetal y potencial de enraizamiento.

La formación de raíces adventicias es crucial para el éxito de la propagación clonal *in vitro*. En palto (Persea americana Mill), explantes de material juvenil pueden ser enraizados en un 100% bajo condiciones apropiadas de cultivo, en cambio, tallos obtenidos del cultivo *in vitro* de yemas de árboles adultos son extremadamente difíciles de enraizar (GARCIA-GOMEZ et al., 1994).

2.3.3. Respuesta auxinica

Microestacas de Persea americana Mill. responden en forma favorable al enraizamiento cuando se cultivan en un medio con auxina. La incorporación de AIB en rangos de 5 - 100 μM durante tres días no manifestó diferencias significativas en el porcentaje de enraizamiento comparado con el tratamiento testigo, sin embargo, concentraciones de AIB de 100 μM incrementó el número de raíces por sección nodal y un 80% de ellas manifestó desarrollo de callo basal. Concentraciones superiores de AIB no aumentaron el número de raíces por explante (GARCIA-GOMEZ et al., 1994).

Estos mismos autores señalan que en ausencia de AIB los niveles de AIA endógenos se mantienen constante durante el proceso de enraizamiento, sin embargo, en tratamientos con AIB los niveles de Ácido-indol-acético (AIA) aumentan durante los primeros seis días de cultivo in vitro. La adición de TIBA (un inhibidor del transporte de auxina polar) en concentraciones de 200 μM induce a una leve disminución de AIA e inhibe la formación de raíces.

PLIEGO-ALFARO *et al.* (1990) señalan un modelo de propagación con material juvenil obtenido a partir de semillas germinadas *in vitro* del portainjerto GvarAm-13 (procedente de Israel), tolerante a salinidad y caliza. El material se multiplica en un medio con benziladenina (BA); sin embargo, tras sucesivas multiplicaciones, los tallos sufren un proceso de miniaturización que hace imposible su paso a la fase de enraizamiento. Se ha logrado un 80% de enraizamiento, cultivando los tallos en un medio con menor dosis de BA y una inducción durante tres días de AIB (1 mg/l), posteriormente se transfiere a un medio basal MS (1/3 de su concentración) y carbón activado. SCHALL (1987) al cultivar yemas axilares, superando las etapas de proliferación y crecimiento, ha logrado enraizar en un 87% secciones nodales con AIB (5 mg/l) en combinación con carbón activado.

Se ha logrado enraizamiento de material juvenil de palto, empleando dos medios de cultivo en secuencia, el primero con AIB (25 mg/l) durante tres días y el segundo libre de auxina por un periodo de ocho semanas (PLIEGO-ALFARO, 1988). Se ha producido resultados similares trabajando con embriones axilares de semillas maduras de palto, utilizando un medio MS con 2 mg/l de AIB (MOHAMED-

YASSEEN, 1993).

GONZALEZ-ROSAS y SALAZAR-GARCIA (1984) obtienen respuestas favorables al enraizamiento de secciones nodales aplicando concentraciones de AIB entre 7.5- 10 mg/l, induciendo la formación de raíces y elongación de yema axilar.

2.3.4. Compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos son empleados para favorecer el enraizamiento de varias especies; el beneficio que otorgan es atribuido a que protegen la auxina evitando su inactivación. En Persea americana Mill. el Ácido cafeico, catecol y floroglucinol han sido testeados como cofactores de enraizamiento de palto in vitro. Sin embargo, PLIEGO ALFARO, 1988) determinó que el catecol y floroglucinol fueron inefectivos, en cambio, el ácido cafeico incrementó el número de raíces.

2.3.5. Sales minerales

PLIEGO-ALFARO (1988) señala que la reducción de sales

inorgánicas aumentó el enraizamiento de brotes de Persea americana Mill. originados de la germinación in vitro de semillas, la reducción de la concentración en 1/3 de la solución mineral del medio MS originó mayor número de raíces y el desarrollo de brotes más vigorosos. Las microestacas enraizadas en un medio libre de sales generó raíces excesivamente largas y débiles.

2.4. Aclimatización:

BRAINERD y FUCHIGAMI (1981) especifican que la aclimatización es un proceso regulado por el hombre mediante el cual un organismo vivo es adaptado a condiciones ambientales diferentes.

La aclimatización constituye la última etapa de un programa de multiplicación in vitro, determinando el éxito de la micropagación, ya que las plántulas que han crecido heterotróficamente bajo condiciones de una alta humedad (90 a 100%) deben adaptarse a condiciones autotróficas y desarrollarse bajo condiciones de humedad moderadas a baja (ZIMMERMAN, 1988).

La transferencia de las plantas generadas in vitro a

invernadero es a menudo problemática, porque las plantas son muy susceptibles a la excesiva desecación inmediatamente después de removidas desde el cultivo (SUTTER y LANGHANS, 1979; BRAINER y FUCHIGAMI, 1981; SUTTER, 1988), producto de una rápida pérdida de agua pudiendo morir en un corto periodo de tiempo.

VOTIATZIS y GRANAHAN (1994) señalan que, para minimizar los efectos del estrés de transplante a condiciones de campo es necesario acondicionar las plantas generadas *in vitro* a través de un proceso de aclimatización.

KOZAI (1990) indica que durante el periodo de aclimatización cerca de un 20 - 50 % de las plantas se pierden. Esta baja tasa de sobrevivencia se atribuye a diversos factores:

- Una baja tasa fotosintética e incompleto desarrollo autotrófico de las plantas *in vitro*, que influye en el cambio de nutrición provocado al momento de la transferencia.
- Un funcionamiento defectuoso de los estomas de plantas propagadas *in vitro*, afectando la regulación estomática de la transpiración, al ser incapaz de cerrar los estomas

bajo condiciones de humedad relativa reducida (SUTTER, NOVELLO y SHACKEL, 1988), lo cual provoca una gran pérdida de agua (MARIN y GELLA, 1988; KOZAI, 1990).

- Una excesiva transpiración debido a una delgada capa cuticular presentada por las plantas micropropagadas (SUTTER y LANGNANS, 1982; KOZAI, 1990).
- Un bajo transporte hidrico, producto de una unión deficiente entre vasos conductores del sistema radical y aéreo o anomalías de tipo estructural de los vasos que reduce el transporte de agua (MARIN y GELLA, 1988).

SCHALL (1987) indica una serie de precauciones para asegurar una aclimatización progresiva, que incluye considerar la época de transferencia, el equipamiento y estructuras disponibles. Por otra parte, establece dos aspectos esenciales para efectuar dicha transferencia, evitar el stress hidrico y crear un ambiente óptimo sanitario.

2.4.1. Sistemas de aclimatización

Para maximizar el potencial de la micropagación, es necesario aumentar la sobrevivencia de las plantas durante la aclimatización y reducir el tiempo requerido

para este proceso; una posibilidad es controlar la humedad, previo o posterior a la transferencia de la condición in vitro a ex vitro. WHISH, WILLIAMS y TAJI (1992) han mejorado la sobrevivencia de Ptilotus sp. reduciendo la humedad de los recipientes de cultivo. Resultados similares se han logrado en Allium sp., observándose un mayor enraizamiento, aumento de materia seca en hojas y producción profusa de cera (FARI y NEMETH, 1987).

Otra opción es el uso de retardantes del crecimiento (PGR), el cual aminora la desecación de las plantas cuando son trasladadas bajo condiciones de invernadero. Paclobutrazol (PAC) reduce el crecimiento a través de la inhibición de la biosíntesis de giberelina; al ser aplicado, las plantas manifiestan una reducción del tamaño de las hojas (CURRY y WILLIAMS, 1983), un aumento del número de capas celulares del mesófilo, mayor deposición de cera cuticular e incremento de tamaño del cloroplasto. HERDENSON, TAJI y WILLIAMS (1993) reportan resultados erráticos aplicando Paclobutrazol durante la etapa final de la micropropagación en Rosa "Red Cascade".

SCHALL (1987) ha logrado aclimatar plántulas de palto

(Persea americana Mill. cv. "Fuerte") logrando un 60% de sobrevivencia, al transferirlas a potes sobre una cama de propagación recubiertos por un tunel de polietileno transparente para generar una condición de alta humedad. Las paredes del tunel se perforaron progresivamente apartir del tercer dia y fue suprimido totalmente a los 8 o 10 días. Estos resultados mejoraron aumentando el porcentaje de sobrevivencia a 80%, con aplicaciones foliares de un antitranspirante constituido de cera de parafina en emulsión.

Para asegurar una adecuada condición sanitaria, el mismo autor utiliza como sustrato perlita y suelo en partes iguales, previamente esterilizado, aplicando un programa fitosanitario semanal que incluye aplicaciones de fungicidas (dirigidos al control de Pythium y Botrytis) e insecticidas.

PLIEGO-ALFARO et al. (1990) indican resultados satisfactorios en el proceso de aclimatización al inocular plántulas de palto con un hongo (Glomus fasciculatum), formador de micorriza. Se favorece la formación de un sistema radical bien desarrollado, el cual se origina del sistema micorrítico (VIDAL et al., 1992).

3. MATERIAL Y METODO

3.1. Ubicación:

Los ensayos se desarrollaron en el Laboratorio de Micropropagación de la Facultad de Agronomía de la Universidad Católica de Valparaíso, ubicado en Quillota, durante el periodo comprendido entre enero de 1995 y marzo de 1996.

3.2. Material Vegetal:

El material vegetal utilizado proviene :

- a) de árboles del cv. "Lula" (8 años de edad) y del cv. "Velvick" (5 años) injertados sobre patrón franco del cv. Mexicola, pertenecientes a la Empresa Agrícola Huerto California Ltda., ubicada en el sector de San Isidro, Comuna de Quillota, V región de Valparaíso.
- b) Plantas de vivero de 1 año, injertadas sobre patrón franco del cv. Mexicola, mantenidas en invernadero en la Estación Experimental de la Escuela de Agronomía de la Universidad Católica de Valparaíso, ubicada en Quillota.

En ambos casos se seleccionaron púas de 5-8 cm de largo,

según el procedimiento descrito por OYANEDEL (1995), las cuales fueron defoliadas y sumergidas en una solución de ácido ascórbico (500 mg/l) más ácido cítrico (500 mg/l), con hielo 50% v/v hasta el momento de efectuar la siembra.

Del material recolectado se obtuvieron yemas axilares y microestacas. Las primeras, de una dimensión de 3 a 5 mm y las segundas estaban formadas por secciones nodales compuestas por un nudo con su yema axilar y porciones de entrenudo de 5 mm, tanto en la parte superior como inferior.

3.3. Desinfección:

En ambos casos, yemas y microestacas, se estableció el protocolo de desinfección basado en los resultados obtenidos por OYANEDEL (1995): las porciones del vegetal con yemas fueron inmersas en alcohol de 95° por espacio de 5 seg, luego los fragmentos se colocaron en una solución de hipoclorito de sodio al 0.5% (para diluirlo se utilizó una solución estéril de Ácido ascórbico 500 mg/l y ácido cítrico 500 mg/l).

3.4. Medio de cultivo:

Para todos los ensayos la formulación mineral del medio utilizado es la descrita por LLOYD y McCOWN (1981), WPM, con los compuestos orgánicos descritos por NEL y KOTZE (1982): glicina (2 mg/l), piroxidina (1 mg/l), ácido nicotínico (1 mg/l), tiamina (0.4 mg/l), adenina (80 mg/l), ácido ascórbico (25 mg/l), inozitol (100 mg/l), caseína (500 mg/l), glutamina (200 mg/l) y sacarosa (30 g/l). El medio incluye como antioxidantes el Polivinil pirrolidona (PVP-360) 500 mg/l y Polivinil polipirrolidona (PVPP-6755) 500 mg/l.

El pH del medio en todos los tratamientos fue ajustado a 5.7, con alicuotas de ácido clorhídrico 0.1 N o hidróxido de potasio 0.1 N.

El medio se solidificó con Gelrite (2 g/l) más Agar Nacional (2 g/l) en todos los casos.

La esterilización se realizó en un autoclave de control manual a una presión 1.1 bar a 121 °C, durante 15 minutos.

3.5. Condiciones de cultivo:

Los explantes se depositaron en tubos de vidrio de 60 ml, disponiendo 10 ml de medio por unidad y cubriendolos con un cuadrado de aluminio laminado de 25 cm². La siembra se efectuó en una cámara de flujo laminar, con aire filtrado a 0.2 micras.

Una vez realizada la inoculación, los tubos fueron sometidos al tratamiento de luz progresiva descrito por OYANEDEL (1995), oscuridad por 14 días, luz indirecta por 7 días e iluminación total a partir del día 21, momento en que son almacenados en una cámara de crecimiento a 25 +/- 5°C, con tubos de luz fluorescente (luz blanca fria), con una intensidad lumínica de 3500 lux. El fotoperíodo corresponde a 16 horas luz por 8 de oscuridad.

3.6. Ensayo 1 : Efecto de la transferencia sucesiva del explante a un medio fresco sobre el pardeamiento y formación de brotes a partir de yemas axilares procedentes de material de campo de los cvs. 'Lula' y 'Velvick.'

Esta experiencia se diseña a partir de ensayos preliminares (efectuados en enero de 1995), en el cual no se logra brotación producto de una necrosis total de

los explantes iniciada a los 30 días de establecido el cultivo.

3.6.1. Recolección y manipulación del material vegetal.

Se seleccionaron brotes en activo crecimiento (previamente identificados), recolectados a los 30 DDIB correspondiente al "flush" vegetativo de primavera, en ambos cultivares. No fue posible obtener material a los 18 DDIB, debido al escaso crecimiento vegetativo que presentaron los árboles, producto de las temperaturas poco favorables manifestadas durante este periodo. Se repitió el procedimiento de recolección, desinfección, lavado y manipulación de los explantes mencionado anteriormente.

Las yemas axilares se inocularon en un medio WPM con los compuestos orgánicos descritos por NEL y KOTZÉ (1982), incluyendo, además, PVP-360 (500 mg/l) y PVPP 6755 (500 mg/l) como antioxidantes y CPPU (Forchlorfenuron (1-(2-cloro-4-piridil)-3-fenilurea)) en concentraciones de 0.1 mg/l para el cv. "Velvick" y 0.5 mg/l para el cv. "Lula".

Desde el momento de la inoculación los tubos se sometieron a un tratamiento de luz progresiva.

3.6.2. Diseño experimental.

El experimento se diseñó completamente al azar, con tres réplicas de 10 tubos cada una por tratamiento para ambos cultivares.

3.6.2.1. Tratamientos.

Los tratamientos para ambos cultivares son los siguientes:

T0 : sin transferencia a un medio fresco.

T1 : transferencia a los 14 días de iniciado el cultivo, momento en el cual los explantes se someten a luz indirecta.

T2 : transferencia a los 14 y 21 días (inicio de iluminación total).

T3 : transferencia a los 14, 21 y 28 días.

T4 : transferencia a los 14, 21, 28 y 35 días.

T5 : transferencia a los 14, 21, 28, 35 y 42 días.

3.6.2.2. Variables evaluadas.

Para todos los tratamientos se efectuaron mediciones a los 14, 21, 28, 35 y 42 días de iniciado el cultivo, evaluándose:

- a) Número de yemas brotadas, determinado por el alargamiento de la yema axilar (Figura 1)

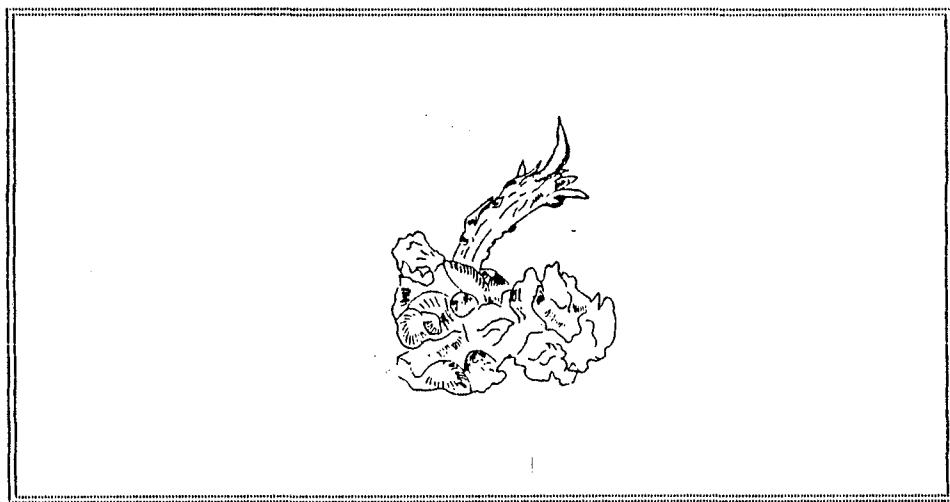


FIGURA 1. Alargamiento de yema axilar (DALSAGO y GUEVARA, 1989).

- b) Contaminación a través de la determinación visual del agente patógeno, hongo y/o bacteria, se estableció un porcentaje de tubos contaminados).
- c) Porcentaje de pardeamiento para cada tratamiento.

Para apoyar los resultados de este ensayo, con respecto al pardeamiento, se determinó en forma cuantitativa los niveles de sustancias fenólicas a yemas axilares sometidas al tratamiento T0 que no considera trasvasaje, y al tratamiento T6 (6 trasvases). Para llevar a cabo este método destructivo, se requirió un número adicional de yemas, las cuales no formaban parte de las réplicas por tratamiento, pero se cultivaron en las mismas condiciones descritas anteriormente.

Se determinó en forma cuantitativa las sustancias fenólicas, en los días 0, 14, 21, 28, 35 y 42 desde el inicio de la inoculación.

En cada medición se utilizó un número de 10 yemas axilares, aplicando la metodología de determinación de fenoles totales por espectrofotometría descrita por SWAIN y HILLIS (1959).

Cada muestra (1 yema axilar), previamente pesada, se sometió por una semana a un tratamiento con etanol al 90%, para lo cual, cada yema se introduce en un recipiente tapado con 50 ml de esta solución.

Posteriormente, el extracto se evaporó al vacío a 80 °C, logrando así separar el alcohol de los fenoles.

Para cuantificar las sustancias fenólicas, cada muestra se prepara agregando 3 ml de agua destilada al extracto y 0.5 ml de reactivo Folin-Ciocalteau, agitando a temperatura ambiente por 3 minutos. Posteriormente, se adiciona 1 ml de una solución saturada de carbonato de sodio como buffer, preparada con tres días de anticipación, y 8 ml de agua destilada logrando un volumen final de 12 ml. Después de una hora se efectuó la lectura en espectrofotómetro.

En cada medición es necesario construir una curva patrón con concentraciones conocidas de sustancias fenólicas (Anexo 1). Previo a la lectura en el espectrofotómetro, a cada concentración se agrega 0.5 ml de reactivo Folin Ciocalteau agitando por tres minutos para posteriormente incorporar 1 ml de carbonato de sodio, luego se adiciona 10 ml de agua destilada obteniendo un volumen final de 12 ml.

Cada lectura, se efectuó a 735 μm , con la cual se obtiene el porcentaje de transmisión. Los valores de densidad

óptica se logran aplicando la siguiente fórmula:

$$\text{Absorbancia} = 2 - \log \% \text{ transmisión}$$

Con los valores de absorbancia obtenidos en la curva patrón y sus respectivas concentraciones se efectúa una regresión lineal simple, generando la siguiente ecuación:

$$Y_i = b * X_i + a, \text{ donde :}$$

Y_i = Concentración de fenoles ($\mu\text{g/l}$) estimados de cada observación.

b = Pendiente de la recta de regresión.

a = intercepto.

Los valores de concentración de sustancias fenólicas ($\mu\text{g/l}$) de cada muestra se interpolan en la curva patrón, reemplazando los datos de absorbancia en la ecuación. El resultado final se expresa en porcentaje del peso fresco.

3.6.2.3. Análisis estadístico.

Los resultados de las variables oxidación se analizan mediante el test de Fisher, con un nivel de significancia al 5%, para cada fecha de evaluación. En los casos en que

al menos un tratamiento presenta diferencias estadísticas significativas, se realiza el test de Tukey de separación de medias. Las variables contaminación y brotación no fueron analizadas estadísticamente, debido a los resultados obtenidos que se explican en el ítem 4.1.1.

3.7. Ensayo 2. Efecto de diferentes concentraciones de AIB en el enraizamiento in vitro de los cultivares 'Lula' y 'Velvick' a partir de yemas axilares de material de campo

3.7.1. Recolección y manipulación del material vegetal.

Fase 1: Obtención de plantas in vitro.

El material utilizado en ambos cultivares corresponde a crecimientos apicales del "flush" de primavera (30 DDIB).

Las yemas son inyectadas en un medio WPM con los compuestos orgánicos descritos por NEL y KOTZÉ (1982) y CPPU en concentraciones de 0.1 mg/l para 'Velvick' y 0.5 mg/l para 'Lula' (OYANEDEL, 1995).

Se efectuaron transferencias sucesivas a un medio fresco, en forma semanal desde el día 14.

Fase 2 : Enraizamiento.

Los explantes in vitro en etapa II, se siembran en un medio WPM (LLOYD y McCOWN, 1981) con los compuestos orgánicos descritos por NEL y KOTZÉ (1982), utilizando sacarosa 20 g/l.

Los tubos se almacenan en la cámara de crecimiento.

3.7.2. Diseño experimental

El diseño es completamente al azar, con tres réplicas de 10 yemas cada una por tratamiento.

3.7.2.1. Tratamientos para los cvs. "Lula" y "Velvick".

T0 : control, medio WPM sin AIB.

T1 : IBA 1 mg/l (SKENE y BARLASS, 1993)

T2 : IBA 7 mg/l (GONZALEZ y SALAZAR, 1984)

T3 : Medio WPM sin AIB, incluye trasvasaje del explante al tercer día de efectuada la inoculación en un medio con las mismas características.

T4 : inducción con AIB 25 mg/l durante tres días, siendo traspasado el explante a un medio sin AIB.

3.7.2.2. Variables evaluadas.

Durante este ensayo no fue posible evaluar las variables, enraizamiento (un porcentaje en base al total de tubos inoculados), el número de raíces por explantes y la longitud promedio de las raíces. Las razones son explicadas en el ítem 4.3.3.

3.8. Ensayo 3. Influencia de diferentes concentraciones de AIB en el enraizamiento directo de secciones nodales provenientes de material de campo e invernadero del cv. 'Lula'.

3.8.1. Recolección y manipulación del material vegetal.

Se seleccionó brotes apicales y laterales constituidos a lo menos por cinco yemas axilares del cv. 'Lula' de material vegetal de campo y de plantas cultivadas en invernadero en activo crecimiento (30 DDIB), previamente marcadas para establecer el momento de inicio de la brotación de primavera.

Se efectuó el mismo protocolo de desinfección utilizado en los ensayos anteriores. Posteriormente, el material

vegetal es fraccionado bajo una solución de antioxidante estéril (Ac. ascórbico 500 mg/l y Ac. cítrico 500 mg/l), obteniéndose microestacas compuestas de una yema y porciones de entrenudo superior e inferior de 5 milímetros.

Estas secciones se colocan durante 45 min, en una solución de PVP estéril (1000 mg/l). Posteriormente son depositadas en el medio de cultivo.

Los tubos de cultivo son sometidos a un tratamiento de luz progresiva que considera 14 días en oscuridad y 7 días de luz indirecta, para ser traspasados a luz directa a la cámara de crecimiento el día 21.

3.8.2. Diseño experimental

El diseño es completamente al azar con tres repeticiones de 10 secciones nodales cada una.

3.8.2.1. Tratamientos para material de campo e invernadero

T0: medio de cultivo WPM sin AIB.

T1: 1 mg/l AIB (SKENE y BARLASS, 1983)

T2: 2 mg/l AIB (MOHAMED-YASSEEN, 1993)

T3: 7 mg/l AIB (GONZALEZ y SALAZAR, 1984)

T4: 5 mg/l AIB + Carbón activado. (SCHALL, 1987)

3.8.2.2. Variables evaluadas

Se evaluó la respuesta de las microestacas a través de:

- a) Nivel de oxidación, determinando el número de secciones nodales oxidadas.
- b) Brotación, por la elongación de la yema de la microestaca (Figura 2). Se registró el número de secciones nodales brotadas. Se evaluó a los 65 días del cultivo in vitro.
- c) Crecimiento del brote (mm) y formación de tallo (Figura 2).

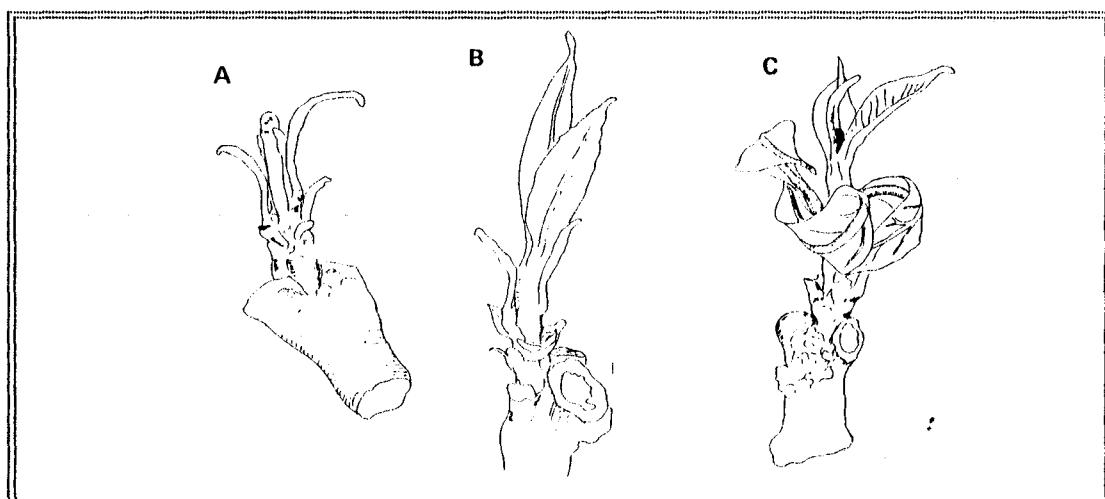


FIGURA 2. Etapas del desarrollo de tallos de *Persea americana* a partir de microestacas cultivadas in vitro. A) alargamiento inicial de la yema axilar. B) expansión de lámina foliar. C) formación de tallo (DALSASO y GUEVARA, 1989).

d) Contaminación, obteniendo un porcentaje en base al total de tubos sembrados por tratamiento y la identificación del patógeno.

La determinación de bacterias a nivel de género se efectuó mediante el crecimiento en agar nutritivo de Lawry, constituido por 10 g/l de bactopeptona, 5 g/l de NaCl, 5 g/l de extracto de levadura y 15 g/l de agar. La siembra de cada muestra se efectuó en forma aséptica en placas de petri y se incubaron durante 48 hr. a 25°C. Posteriormente, se observó al microscopio las bacterias fijadas mediante la Tinción Gram y se efectuaron pruebas bioquímicas.

La identificación de hongos a nivel de género se efectuó por observación al microscopio y lupa. El medio utilizado para aislar hongos fue agar Sabouraud, constituido por 10 g/l de peptona, 40 g/l de D-Glucosa y 15 g/l de agar.

e) Desarrollo de callo, se determinó su presencia y ausencia en cada explante.

f) Enraizamiento, determinando un porcentaje de enraizamiento (número de raíces por sección nodal y longitud promedio de raíces).

Se considera una microestaca enraizada a aquella que manifieste un primordio de raíz emergido y visible de una

longitud mínima de 1 milímetro.

3.8.2.3. Análisis estadístico

Los resultados de la variable oxidación se analizaron mediante el test de Fisher (con un nivel de significancia al 5%), y de existir diferencias significativas entre los distintos tratamientos, se aplicó el test de Tukey de separación de medias. Para la variable contaminación se realizó un análisis descriptivo, identificando a nivel de género el agente contaminante mediante análisis fitopatológico.

No fue posible efectuar análisis estadístico a las variables formación de callo, enraizamiento, brotación, expansión foliar y formación de tallo, debido a la elevada pérdida de unidades experimentales por contaminación.

3.9. Ensayo 4. Efecto del hipoclorito de sodio y el medio de cultivo en los niveles de contaminación y oxidación de secciones nodales del cv. 'Lula'.

Se diseña este experimento para superar los problemas de

contaminación obtenidos en el ensayo 3.

3.9.1. Recolección y manipulación del material vegetal.

El material corresponde al crecimiento activo del "flush" vegetativo de verano, manteniendo el procedimiento de recolección y desinfección aplicado en todos los ensayos.

En algunos tratamientos se aplica una dosis superior de hipoclorito de sodio.

Las microestacas se cultivan en las mismas condiciones descritas en el ensayo 3.

3.9.2. Medio de cultivo.

El ensayo contempla dos tipos de medio de cultivo:

a) WPM sin modificación utilizado en el ensayo 2, contiene la formulación mineral descrita por LLOYD y McCOWN (1981) y los siguientes componentes: tiamina 0.4%, inositol 100 mg/l, hidrolizado de caseína 500 mg/l, glutamina 200 mg/l, ácido ascórbico 25 mg/l, PVP 500 mg/l

y PVPP 500 mg/l, PVP 500 mg/l, PVPP 500 mg/l y sacarosa 30g/l.

b) WPM modificado, que mantiene la formulación mineral, los antioxidantes (Ac. ascórbico 25 mg/l, PVP 500 mg/l y PVPP 500 mg/l), y la sacarosa disminuyendo su concentración a 15 g/l.

3.9.3. Tratamientos

T0 : WPM sin modificación + (5 seg alcohol 95% + hipoclorito de sodio 0.5% por 10 min)

T1 : WPM sin modificación + (5 seg alcohol 95% + hipoclorito de sodio 1% por 10 min)

T2 : WPM modificado + (5 seg alcohol 95% + hipoclorito de sodio 0.5% por 10 min)

T3 : WPM modificado + (5 seg alcohol 95% + hipoclorito de sodio 1% por 10 min)

3.9.4. Variables evaluadas

3.9.4.1. Oxidación

Se realizaron observaciones sobre el número de secciones nodales oxidadas, clasificando en 5 niveles:

- Ausencia: no existe oxidación en las secciones nodales.
- Apical: existe oxidación en la parte superior de las secciones nodales.
- Basal: existe oxidación en la base de las secciones nodales.
- Basal+apical: existe oxidación, tanto en la parte superior como en la base de las secciones nodales.
- Total: existe oxidación en más del 50% de las secciones nodales.

3.9.4.2. Contaminación.

Se observó el número de secciones nodales contaminadas, diferenciando el agente contaminante (hongo y/o bacteria).

Las mediciones para ambas variables se realizaron a los 3, 7, 14 y 21 días de cultivo.

3.9.5. Diseño experimental y análisis estadístico.

El análisis de la información se basó en un "Diseño Completamente Aleatorizado". Los datos recolectados para las variables oxidación y contaminación, corresponden a

observaciones binarias (observaciones 0's y 1's, usados en forma genérica para nominar las categorías "fracaso" y "éxito", respectivamente). Se realizó la suma de observaciones, obteniendo la frecuencia de éxitos. El experimento es a dos factores. El modelo factorial es $2 * 2 = 4$ tratamientos con 20 repeticiones cada uno.

El modelo para cada variable fue:

$$Y_{ijk} = \mu + (\text{Medio})_i + (\text{Dosis})_j + (\text{Medio} * \text{Dosis})_{ij}, \\ i=1, 2 ; j=1, 2 ; k=1, \dots, 20.$$

Donde, Y_{ijk} es la k -ésima observación en el i -ésimo medio de cultivo con la j -ésima dosis de hipoclorito de sodio, μ es la media general, $(\text{Medio})_i$ es el efecto del i -ésimo nivel del factor medio de cultivo (con niveles 1=WPM sin modificar y 2=WPM modificado), $(\text{Dosis})_j$ es el efecto del j -ésimo nivel del factor dosis de hipoclorito de sodio (con niveles 1=0.5% y 2=1%) y $(\text{Medio} * \text{Dosis})_{ij}$ es el efecto de interacción del i -ésimo medio con la j -ésima dosis.

El análisis de la información se realizó utilizando la Teoría de Modelos Lineales Generalizados, a través de la comparación de proporciones para cada categoría de oxidación, con un nivel de significancia del 5%.

3.10. Ensayo 5. Efecto de la etiolación sobre la oxidación y organogénesis de yemas axilares del cv. 'Lula'

3.10.1. Recolección y manipulación del material vegetal.

El ensayo fue llevado a cabo durante el "flush" vegetativo de verano utilizando brotes etiolados y sin etiolar, de los cuales se obtuvieron yemas axilares.

El procedimiento de recolección y desinfección del material vegetal especificado en los ensayos previos se mantuvo.

Las yemas axilares obtenidas de cada tipo de material se inocularon en un medio WPM con las mismas características al utilizado en los ensayos 1 y 2.

3.10.1.1. Material etiolado:

Se seleccionó ramillas con brotes en activo crecimiento de los árboles del cv. 'Lula', las que fueron sometidas a condiciones de oscuridad durante 20 días, empleando tubos de cartulina negra de doble fase de 50 cm de longitud y 18 cm de diámetro.

3.10.1.2. Material sin etiolar:

Se utilizó púas provenientes de ramillas que no fueron sometidas a condiciones de oscuridad, similares a las empleadas en los anteriores ensayos.

3.10.2. Tratamientos:

E : Material vegetal etiolado.

NE: Material vegetal sin etiolación.

3.10.3. Variables evaluadas.

3.10.3.1. Brotación

Determinada por el alargamiento de la yema axilar (Figura 1). Se registra el número de yemas brotadas en cada tratamiento.

3.10.3.2. Oxidación.

Se realizaron observaciones sobre el número de yemas axilares oxidadas, clasificando en cinco niveles de oxidación.

-Ausencia: no existe oxidación en las yemas axilares.

-Apical: existe oxidación en la parte superior de las yemas.

- Basal: existe oxidación en la base de la yema axilar.
- Apical+basal: existe oxidación, tanto en la parte superior como en la base de las yemas axilares.
- Total: existe oxidación en más del 50% del explante.

Las evaluaciones se efectuaron a los 14, 21 y 35 días de cultivo.

3.10.3.3. Contenidos de fenoles totales.

Se mide el nivel de sustancias fenólicas iniciales a 10 yemas axilares por tratamiento mediante la técnica descrita por SWAIN y HILLIS (1959), especificada en el ensayo 1.

3.10.3.4. Diseño experimental y análisis estadístico.

El ensayo se diseñó completamente al azar con 39 repeticiones por tratamientos. El modelo lineal utilizado para el análisis fue el siguiente:

$$Y_{ij} = \mu + (\text{Etiolación})_i$$

$$i=1, 2 ; j=1, \dots, 39$$

donde, Y_{ij} es la j -ésima observación con el i -ésimo nivel del factor, μ es la media general y $(\text{Etiolación})_i$ es el

efecto del i-ésimo nivel del factor de tratamiento (con niveles 1=sin etiolar y 2=etiolado).

Los datos recolectados para la variable oxidación presentan las mismas características expresadas en el ítem 3.8.5. del ensayo 5, por lo cual fueron analizadas de la misma forma.

Para la variable brotación, en base a los resultados obtenidos y especificados en el ítem 4.5.2., no se efectuó análisis estadístico.

Se efectuó un análisis de varianza con un nivel de significancia al 5%, a la variable contenido de fenoles totales expresados en porcentajes en base al peso fresco.

3.11. Ensayo 6. Evaluación de dos sistemas de aclimatación sobre la sobrevivencia y desarrollo radical, de plantas in vitro del cv. 'Lula' y cv. 'Velvick' transferidas a condiciones ex vitro.

Sistema A:aclimatación bajo condiciones de invernadero.

Sistema B:aclimatación en cámara de crecimiento.

Las plántulas enraizadas in vitro de ambos cultivares se accliman en cada sistema, utilizando dos tipos de sustratos previamente esterilizados:

A.1.- turba (50%) + arena (50%)

A.2.- turba (50%) + perlita (50%)

Se considera 20 réplicas para cada sustrato.

Las plantas in vitro previamente lavadas con agua estéril se plantan en potes de plástico con el sustrato correspondiente y se cubren con bolsas de polietileno transparente para generar una condición de alta humedad. Estas se someten a una perforación progresiva a partir del tercer día (SCHALL, 1987).

Durante la aclimatación en cada sistema se registra la temperatura máxima y mínima. Además, se tiene la precaución de controlar la condición sanitaria y el nivel hídrico.

Al transcurrir 30 días de aclimatización se evalúa los siguientes aspectos:

- a) Número de plantas que sobreviven a los tratamientos.
- b) número de raíces.

c) longitud promedio de las raíces.

El diseño es completamente al azar, tomando como unidad experimental una planta in vitro enraizada, con 20 repeticiones. El modelo factorial es $2 \times 2 = 4$ tratamientos.

Este ensayo de aclimatización no fue llevado a cabo, las especificaciones se indican en el ítem 4.6.

4. PRESENTACION Y DISCUSION DE RESULTADOS

4.1. Ensayo 1. Efecto de la transferencia sucesiva del explante a un medio fresco, sobre el pardeamiento y formación de brotes a partir de yemas axilares procedentes de material de campo de los cvs. 'Lula' y 'Velvick'.

4.1.1. Oxidación y brotación

Al analizar los porcentajes de oxidación en el cv. 'Velvick' (Cuadro 1), se determina que la transferencia sucesiva a un medio fresco no logró superar los problemas de pardeamiento durante el desarrollo del cultivo. Los niveles de oxidación se incrementaron a través del tiempo en todos los tratamientos, observándose la misma tendencia en el cv. 'Lula' (Cuadro 2) pero con inferiores niveles de oxidación final.

En el cv. 'Velvick' (Cuadro 1) los problemas de oxidación se manifiestan tempranamente. A los 14 días de iniciado el cultivo los niveles de oxidación son importantes (30%). En el mismo periodo se observa una respuesta diferente en el cv. 'Lula' (Cuadro 2), con menores porcentajes de oxidación, la que puede ser explicada por

el origen genético de cada cultivar generando respuestas diferenciadas (PLIEGO-ALFARO *et al.*, 1990).

Sin embargo, estos resultados no se relacionan con los contenidos de fenoles totales (Cuadro 3), ya que tanto el cv. 'Lula' como el 'Velvick' inician el cultivo con los mismos niveles.

CUADRO 1. Efecto de la transferencia sucesiva del explante a un medio fresco sobre el pardeamiento de yemas axilares del cv. 'Velvick'.

| Tratamientos | Días (**) | | | | | |
|--------------|---------------|-------|-------|-------|------|-------|
| | 0 | 14 | 21 | 28 | 35 | 42 |
| | Oxidación (%) | | | | | |
| T0 | 0 a | 30 a | 40 a | 52 a* | 77 a | 100 a |
| T1 | 0 a | 33 a | 50 ab | 67 a | 75 a | 90 a |
| T2 | 0 a | 30 a | 35 a | 54 a | 79 a | 93 a |
| T3 | 0 a | 25 a | 38 a | 63 a | 69 a | 86 a |
| T4 | 0 a | 38 a | 50 ab | 67 a | 70 a | 88 a |
| T5 | 0 a | 40 ab | 63 b | 70 a | 85 a | 100 a |

** Días transcurridos desde iniciado el cultivo.

T0 : Sin transferencia a un medio fresco.

T1 : Transferencia a los 14 días.

T2 : Transferencia a los 14 y 21 días.

T3 : Transferencia a los 14, 21 y 28 días.

T4 : Transferencia a los 14, 21, 28 y 35 días.

T5 : Transferencia a los 14, 21, 28, 35 y 42 días.

* : valores con letras iguales en la misma columna indican que no hay efecto de los tratamientos sobre la oxidación, según test de Tukey, al 5% de significancia.

CUADRO 2. Efecto de la transferencia sucesiva del explante a un medio fresco sobre el pardoamiento de yemas axilares del cv. 'Lula'.

| Tratamientos | Días (**) | | | | | |
|--------------|---------------|-------|------|-------|------|------|
| | 0 | 14 | 21 | 28 | 35 | 42 |
| | Oxidación (%) | | | | | |
| T0 | 0 | 16 a* | 20 a | 40 ab | 47 a | 77 a |
| T1 | 0 | 13 a | 13 a | 17 a | 40 a | 70 a |
| T2 | 0 | 0 a | 3 a | 20 a | 57 a | 80 a |
| T3 | 0 | 3 a | 7 a | 33 a | 50 a | 73 a |
| T4 | 0 | 13 a | 17 a | 43 ab | 48 a | 66 a |
| T5 | 0 | 0 a | 13 a | 33 a | 53 a | 73 a |

** Días transcurridos desde iniciado el cultivo.

T0 : Sin transferencia a un medio fresco.

T1 : Transferencia a los 14 días.

T2 : Transferencia a los 14 y 21 días.

T3 : Transferencia a los 14, 21 y 28 días.

T4 : Transferencia a los 14, 21, 28 y 35 días.

T5 : Transferencia a los 14, 21, 28, 35 y 42 días.

* : valores con letras iguales en la misma columna indican que no hay efecto de los tratamientos sobre la oxidación, según test de Tukey, al 5% de significancia.

Durante el desarrollo del cultivo los niveles de fenoles totales (Cuadro 3) disminuyen en ambos cultivares, observándose la misma tendencia en el tratamiento T0 (sin transferencia a un medio fresco) y T6 (transferencias sucesivas). Los contenidos de fenoles totales en los cvs. 'Lula' y 'Velvick' manifiestan una elevada reducción a los 14 días de iniciado el cultivo, lo que puede atribuirse al efecto de los antioxidantes incorporados

en el medio de cultivo (PVP y PVPP), disminuyendo la disponibilidad del sustrato de la enzima PPO por medio de la adsorción de fenoles. Estos resultados coinciden con los reportados por JORDAN (1991), donde obtuvo los menores niveles de fenoles de secciones nodales de Annona cherimola Mill. (0.08-0.12% del peso fresco) con el uso de antioxidantes PVP-6755 y PVP-360.

CUADRO 3. Composición fenólica y oxidación en yemas axilares de palto cvs. 'Lula' y 'Velvick', provenientes de distintos tratamientos de transferencia de medios, expresados en porcentaje.

| T | | Días (*) | | | | | |
|-----------|----|----------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | | 0 | 14 | 21 | 28 | 35 | 42 |
| "Velvick" | | | | | | | |
| % SF ** | T0 | 0.853 | 0.167 | 0.112 | 0.098 | 0.085 | 0.078 |
| % OD | | 0 | 30 | 40 | 52 | 77 | 100 |
| % SF ** | T5 | 0.988 | 0.156 | 0.097 | 0.079 | 0.075 | 0.062 |
| % OD | | 0 | 40 | 63 | 70 | 85 | 100 |
| "Lula" | | | | | | | |
| % SF ** | T0 | 0.988 | 0.204 | 0.132 | 0.119 | 0.097 | 0.094 |
| % OD | | 0 | 16 | 20 | 40 | 47 | 77 |
| % SF ** | T5 | 0.905 | 0.187 | 0.101 | 0.089 | 0.081 | 0.075 |
| % OD | | 0 | 0 | 13 | 33 | 53 | 73 |

* Días transcurridos desde el inicio del cultivo.

T : tratamientos.

SF : Sustancias fenólicas.

OD : Oxidación.

** Según SWAIN y HILLIS (1959) (Anexos 1, 2, 3, 4, 5 y 6).

Los resultados no establecen una relación entre los niveles de oxidación y los contenidos de fenoles evaluados a través del tiempo (Cuadro 3). Aunque los niveles de sustancias fenólicas se reducen, se debe considerar que la técnica descrita por SWAIN y HILLIS (1959) no es cualitativa, solamente determina los niveles totales que varían en los diferentes estados de desarrollo de los vegetales. CURIR et al. (1993), analizando sustancia fenólicas en estacas leñosas y herbáceas de Chamaelaucium uncinatum registraron similares contenidos totales de fenoles, pero mediante la Técnica de Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) determinaron diferencias cualitativas, que determinaba la respuesta rizogénica. por lo cual, sería interesante identificar las sustancias fenólicas que pueden favorecer o inhibir el crecimiento.

Los niveles de oxidación obtenidos en este ensayo explican la respuesta organogénica en ambos cultivares. Las yemas axilares del cv. 'Velvick' no superaron la etapa de establecimiento. Aunque los niveles de oxidación del cv. 'Lula' fueron levemente inferiores las yemas axilares que no manifestaron oxidación tampoco brotaron. Esta respuesta puede estar relacionada por las

condiciones internas del explante y el estado de la planta madre que afectan el desarrollo *in vitro* (DALSASO y GUEVARA, 1989), considerando que los árboles del cultivar 'Lula' y 'Velvick' manifestaron durante la primavera 1995 un escaso desarrollo vegetativo.

4.1.2. Contaminación.

Durante el transcurso del ensayo no se observaron problemas de contaminación que afectaran el desarrollo del cultivo. El trasvasaje sucesivo no fue un factor que favoreciera la incidencia de agentes contaminantes.

4.2. Ensayo 2. Efecto de diferentes concentraciones de AIB en el enraizamiento *in vitro* de los cvs. 'Lula' y 'Velvick' a partir de yemas procedentes de material de campo.

Este experimento se inició en forma paralela al ensayo 1 utilizando material vegetal del flush de crecimiento vegetativo de primavera.

No fue posible establecer el efecto de diferentes concentraciones de AIB en el enraizamiento in vitro de los cvs. 'Lula' y 'Velvick' a partir de yemas axilares, debido a que no se logró desarrollar plantas in vitro (fase 1) requeridas para evaluar la fase 2 (enraizamiento). Las causas se explican con los resultados obtenidos en el ensayo 1 que determinaron la respuesta organogénica desfavorable producto de tasas elevadas de pardeamiento.

4.3. Ensayo 3. Efecto de diferentes concentraciones de AIB en el enraizamiento directo de secciones nodales provenientes de material de campo e invernadero del cv. 'Lula'.

Los resultados de este ensayo no permiten determinar el efecto de diferentes concentraciones de AIB en la rizogénesis de secciones nodales del cv. 'Lula' empleando material vegetal de campo e invernadero (Cuadro 4), debido a los altos niveles de contaminación de las unidades experimentales en cada tratamiento durante el desarrollo del cultivo in vitro.

4.3.1. Contaminación.

Los niveles de contaminación son claramente superiores en el material de campo (Cuadro 4). Esto se relaciona con las condiciones de crecimiento de la fuente de material vegetal, puesto que PIERIK (1990) señala que explantes aislados de una planta cultivada en el exterior tienen mayores probabilidades de que se produzca una infección. Los niveles de contaminación pueden minimizarse sometiendo al stock de plantas madres a condiciones ambientales controladas (GEORGE y SHERRINGTON, 1990), lo que indicaría que el cultivo in vitro utilizando material de invernadero sería una opción para superar los problemas de establecimiento de las secciones nodales.

Los resultados coinciden con lo establecido por DALSASO y GUEVARA (1989), en que el principal obstáculo para el establecimiento in vitro de microestacas provenientes de material de campo es el alto porcentaje de contaminación por bacterias, como se observa en el Cuadro 5, en que la incidencia de este agente contaminante es de un 66 por ciento.

CUADRO 4. Porcentaje de contaminación de secciones nodales de Palto cv. 'Lula' proveniente de material de campo e invernadero.

| Tratamientos | Porcentaje de Contaminación (%) | |
|--------------|---------------------------------|-------------|
| | Campo | Invernadero |
| T0 | 60 | 27 |
| T1 | 17 | 17 |
| T2 | 37 | 20 |
| T3 | 50 | 17 |
| T4 | 34 | 20 |

T0 :testigo

T1 :1 mg/l AIB

T2 :2 mg/l AIB

T3 :7 mg/l IB

T4 :5 mg/l AIB + CA (500 mg/l)

OYANEDEL (1995) no reporta problemas de contaminación de secciones nodales de material de campo evaluadas 15 días después de su inoculación, en cambio, en el presente ensayo a los 14 días de iniciado el cultivo se manifestó contaminación en bajos niveles aumentando con apariciones tardías durante el desarrollo del cultivo. Tales diferencias pueden ser explicadas por la época de establecimiento del cultivo; OYANEDEL (1995) utilizó material del "flush" vegetativo de verano, en cambio en este ensayo correspondió al flush de primavera. DALSASO y GUEVARA (1989) indican que paralelamente a las fluctuaciones en el crecimiento vegetativo, se manifiestan variaciones en la contaminación, y que las

condiciones ambientales afectan el grado de infección.

La contaminación de las microestacas de material de vivero que crecía bajo condiciones de invernadero frío, fue causada en igual proporción por bacterias y hongos (Cuadro 5).

CUADRO 5. Porcentaje de contaminación de secciones nodales de Palto cv. 'Lula' por hongos y bacterias en material de campo e invernadero.

| Agente Contaminante | Campo (%)* | Invernadero (%)** |
|---------------------|------------|-------------------|
| Hongos | 33 | 55 |
| Bacterias | 66 | 45 |

* El porcentaje total de tubos contaminados fue de un 40%, en base a este se calculó el % de hongos y bacterias.

** El porcentaje total de tubos contaminados fue de 20%, en base a este se calculó el % de hongos y bacterias.

Debido a los serios problemas de establecimiento de las secciones nodales por agentes contaminantes, se consideró importante efectuar análisis fitopatológico de hongos y bacterias para ambos tipos de material vegetal, para determinar estrategias que permitan superar estas limitaciones en la propagación *in vitro* de este tipo de explante.

4.3.1.1. Identificación de los agentes contaminantes observados en el ensayo 2, utilizando material de campo:

Hongos:

En primer lugar se realizó una observación directa para determinar la extensión y tipo de crecimiento de los hongos presentes, con la finalidad de establecer si eran fitopatógenos o solamente contaminantes facultativos.

Los géneros identificados luego de un exhaustivo estudio fueron:

Rhizopus spp.: con la especie R. nigricans parásito facultativo, que en este caso aparece formando amplias zonas de crecimiento dadas principalmente por el aporte nutricional que representa el medio de cultivo utilizado.

Al ser un hongo que aparece generalmente en post-cosecha es fácil entender su presencia en las secciones nodales, ya que cumplirían con los requisitos básicos para su establecimiento. A pesar de esto, se puede desarrollar una estrategia de control basada en un protocolo de desinfección más estricto.

Mucor spp.: Al igual que el anterior es un hongo que

aparece como principal contaminante de alimentos, frutas y hortalizas, produciendo ciertos grados de fermentación en los tejidos vegetales. En este caso su presencia se debe a problemas de manejo de material vegetal.

Aspergillus spp.: ataca principalmente frutas y hortalizas en períodos de post-cosecha, por lo que es probable que se haya asociado, tanto al explante como al medio de cultivo (por los nutrientes y altos contenidos de hidratos de carbono). Tal como los hongos anteriores, su presencia se puede restringir al mínimo manteniendo niveles de desinfección y esterilización adecuados.

Monilia spp.: Este hongo está presente en aproximadamente 20% de los tubos contaminados con hongos, creciendo en la zona de corte superior de la sección nodal, lo que indica que su presencia está dada por el tipo de manipulación y manejo realizado (esterilización del instrumental ineficiente o desinfección del material vegetal).

Bacterias:

Serratia spp.: Bacteria que presenta crecimiento de colonia de color rojo, Gram negativa y forma cocoide

perteneciente a la familia Enterobacteriaceae. Presente normalmente como agente contaminante de alimentos y hortalizas que son mantenidas en almacenamiento. De este modo, las condiciones favorables de temperatura, humedad y nutrientes en los cuales se desarrolla el tejido vegetal, se convierten en un excelente hábitat. Pueden producir alteraciones por su actividad proteolítica.

Flavobacterium spp.: Colonias de color amarillo anaranjado a rojo, Gram negativa, crecimiento en forma de bacilo y mesófilos (15-30 °C). Asociado generalmente a plantas por lo que es habitual que contamine cultivos in vitro.

Brochotrix spp.: colonias blancas con bacterias de forma cocoide (en fase exponencial son bacilos y las células más viejas son coccoides), Gram positiva, crecen en forma de acúmulos irregulares. Generalmente presentes contaminando cultivos in vitro de diversos tejidos vegetales, puede representar un problema en cuanto a número, pero prácticamente son inócuas dada la baja densidad poblacional que se encuentra limitada por nutrientes (lactosa).

Bacillus spp.: colonias blancas con bacterias formadoras de endosporas, Gram positiva, crecimiento bacilar, mesófilas, asociadas al agua, polvo, suelo, utensilios y animales en general, por lo que es habitual que estén presente en cualquier medio. No son patógenos vegetales pudiendo ser controlados a través de una adecuada desinfección.

Proteus spp.: colonias blancas, con bacterias Gram negativa, de forma bacilar, aerobios y entéricos. Al ser el tracto intestinal humano y animal su principal hábitat es común que invadan utensilios y zonas de trabajo, pudiendo provocar alteraciones en alimentos y vegetales que se descomponen a temperaturas mesófilas. Controlables a través de un protocolo en base a antibióticos.

Micrococcus spp.: colonias café rosadas, Gram positivas, crecimiento cocoide, productora de pigmento. Ampliamente distribuidos en la naturaleza por lo que es fácil encontrarlas en diversos ambientes como en vegetales, animales y manipuladores. Su asociacion a las muestras está dada principalmente por la disponibilidad de nutrientes. Controlables a través de una desinfección adecuada.

Pseudomonas spp.: colonias de color café verdoso, Gram negativa, forma bacilar, ampliamente distribuidas en alimentos en general y especialmente en vegetales, producen pigmentos y son fuente de alteración de productos refrigerados. Es poco probable que se presente en cultivos en donde la temperatura es muy alta para su sobrevivencia y limitará ampliamente su presencia provocando su desaparición posterior.

4.3.1.2. Identificación de los agentes contaminante observados en el Ensayo 2, utilizando material vegetal de invernadero.

Hongos:

Están presentes los géneros Rhizopus, Mucor y Aspergillus.

Bacterias:

Se identificaron los siguientes géneros de bacterias: Proteus, Micrococcus, Serratia, Flavobacterium, Bacillus y Pseudomonas.

Los resultados del análisis patológico establece que los

problemas de contaminación no corresponden a fitoparásitos, por lo cual su control en el desarrollo del cultivo *in vitro* debe estar orientado al protocolo de desinfección, considerando desinfectantes y manipulación del material vegetal.

No existen diferencias marcadas en los géneros de bacterias y hongos que atacan a las microestacas de campo e invernadero. En secciones nodales de material de invernadero se observa la ausencia del hongo del género Monilia spp. y la bacteria del género Brechotrhix asociados solamente a material de campo (Cuadro 6).

Se descarta la posibilidad , en el caso de contaminación bacteriana, que su presencia sea endógena debido a que en el cultivo de yemas aisladas no es un problema, utilizando el mismo protocolo de desinfección descrito por OYANEDEL (1995) para ambos tipos de material vegetal.

Los niveles de contaminación de microestacas se asocian a problemas de desinfección y manipulación del material vegetal. La dosis de hipoclorito de sodio 0.5% no es efectiva en el control de agentes contaminantes,

considerando el tamaño del explante, por lo cual se establece el ensayo 4.

CUADRO 6. Separación por género de hongos y bacterias contaminantes de secciones nodales de Palto cv. 'Lula' en material de campo e invernadero.

| Género | Campo | Invernadero |
|-----------------------|-------|-------------|
| | Nº * | Nº * |
| Hongos | | |
| <u>Aspergillus</u> | 4 | 7 |
| <u>Monilia</u> | 9 | 0 |
| <u>Mucor</u> | 7 | 4 |
| <u>Rhizopus</u> | 8 | 8 |
| Bacterias | | |
| <u>Bacillus</u> | 1 | 1 |
| <u>Brochotrich</u> | 4 | 0 |
| <u>Flavobacterium</u> | 7 | 2 |
| <u>Micrococcus</u> | 2 | 3 |
| <u>Proteus</u> | 6 | 1 |
| <u>Pseudomonas</u> | 11 | 3 |
| <u>Serratia</u> | 8 | 3 |

* Se refiere a la frecuencia de aparición de cada género de bacteria y hongo en los tubos contaminados. Se identificó en algunas muestras dos agentes contaminantes colonizando medio de cultivo y explante, correspondiente a los géneros Rhyzopus spp. y Mucor spp. Por lo cual, la sumatoria de valores no representa el número total de tubos contaminados.

A pesar de los problemas de establecimiento anteriormente mencionados, se presentan como antecedente mediciones

efectuadas al material que no sufrió contaminación a los 65 días de inoculado, con excepción de la variable oxidación evaluada en la totalidad de las muestras (Cuadro 7).

4.3.2. Oxidación.

Los niveles de oxidación de microestacas fueron relativamente bajos (Cuadro 7), considerando que OYANEDEL (1995) no logra establecer *in vitro* secciones nodales provenientes de material de campo del cv. 'Lula', producto de una necrosis total a los 15 días de iniciada la inoculación. Estos resultados favorables se explican por el tratamiento de pre-siembra usado en este ensayo y descrito por DALSASO y GUEVARA (1989), en donde el explante es sumergido en una solución de PVP estéril, actuando como agente adsorbente de sustancias fenólicas (Fig. 3). La combinación de dos antioxidantes en el medio de cultivo WPM como el PVP y PVPP contribuyeron favorablemente en controlar la oxidación (GEORGE y SHERRINGTON, 1984).

CUADRO 7. Oxidación, formación de callo y enraizamiento de secciones nodales provenientes de material de campo e invernadero del cv. 'Lula' a los 65 días de cultivo in vitro.

| Tipo de material | T | oxidación (%) * | formación callo ** | enraizamiento (%) |
|------------------|----|-----------------|--------------------|-------------------|
| Campo | T0 | 40.0 a | 1(12) | --- |
| | T1 | 30.0 a | 19(25) | --- |
| | T2 | 36.3 a | 9(19) | --- |
| | T3 | 33.3 a | 6(20) | --- |
| | T4 | 46.6 a | 6(15) | --- |
| Invernadero | T0 | 43.3 a | 2(22) | --- |
| | T1 | 26.6 a | 12(25) | --- |
| | T2 | 30.0 a | 7(26) | --- |
| | T3 | 33.3 a | 14(23) | --- |
| | T4 | 46.6 a | 7(21) | --- |

* Las medias entre tipo de material no presentaron diferencias al 5% de significancia, según test de Fisher para la variable oxidación.

** Se refiere al número de secciones nodales que manifestaron presencia de callo basal. Los valores entre paréntesis (), indican el número de microestacas por tratamiento al finalizar el ensayo. La reducción del número inicial de explantes (30) se debe a problemas de contaminación.

T : tratamientos

T0 : testigo

T1 : 1 mg/l AIB

T2 : 2 mg/l AIB

T3 : 7 mg/l AIB

T4 : 5 mg/l AIB + CA (500 mg/l)

do se manifestaron diferencias significativas entre los tratamientos de cada tipo de material para la variable oxidación. Los tratamientos con invernadero y sin invernadero presentaron un porcentaje de oxidación similar.

4.3.3. Sección nodal

No se observó ningún efecto de los tratamientos de invernadero ni desarrollo de imprescrito en la sección que se observó en este tipo de explante (DAVIES, 1990).

En alguna

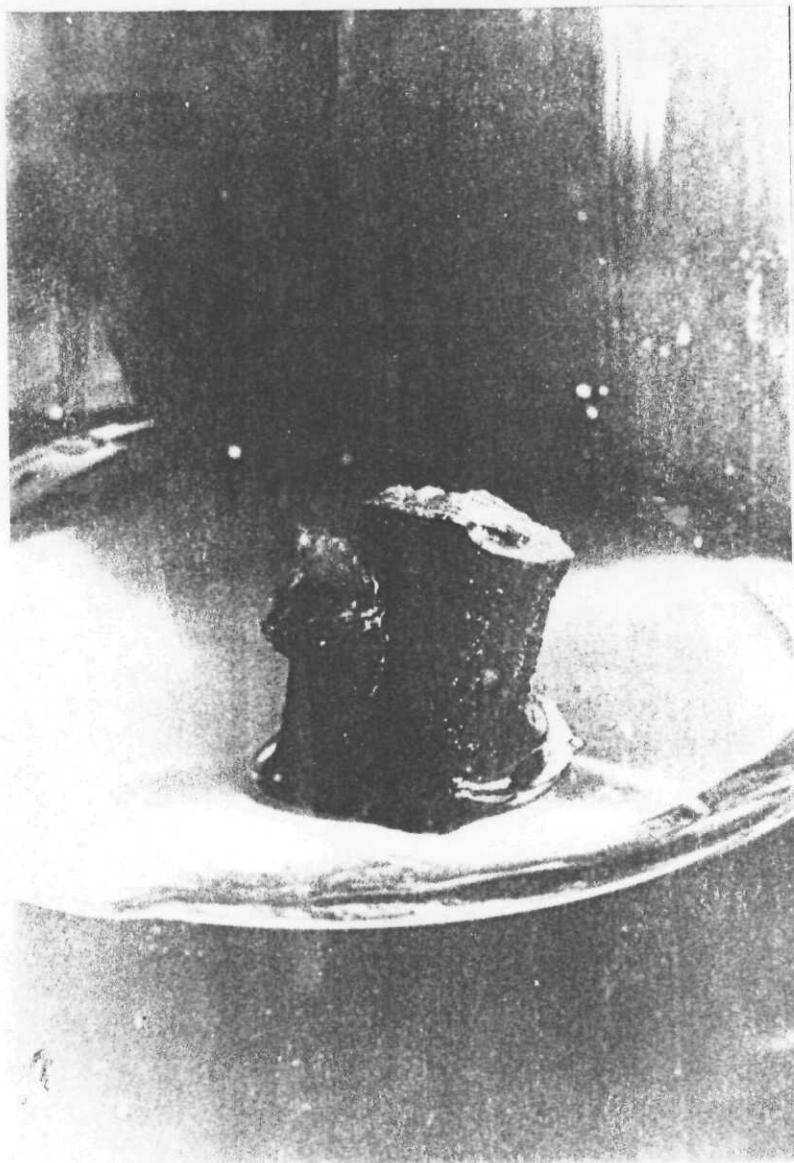


FIGURA 3. Sección nodal de cv. 'Lula' proveniente de material de sección que se ha invernadero a los 15 días asociado al origen de cultivo. No se observó efecto de la oxidación del explante.

No se manifestaron diferencias significativas entre tratamientos de cada tipo de material para la variable oxidación. Se hubiese esperado que el material de invernadero manifestara niveles inferiores de oxidación con respecto al proveniente de campo, pero los porcentajes de oxidación en todos los tratamientos son similares.

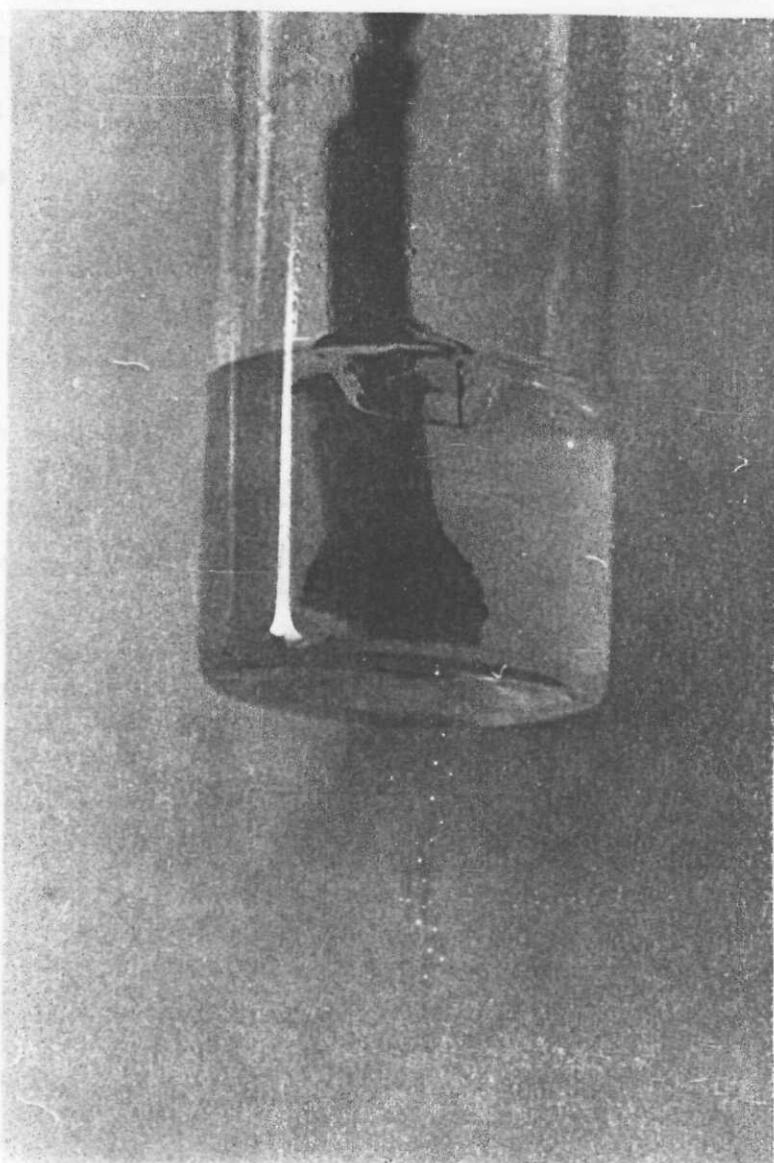
4.3.3. Enraizamiento y callo basal.

No se observó enraizamiento de secciones nodales en ningún tipo de material. Sin embargo, en todos los tratamientos, tanto para microestaca de campo e invernadero (Cuadro 7), se aprecia una respuesta al desarrollo de callo basal (Figura 4), aunque éste no es imprescindible para la rizogénesis, sería un indicador de que se están proporcionando condiciones favorables para este tipo de organogénesis (HARTMANN, KESTER y DAVIES, 1990).

En algunas especies la formación de callo aparentemente es un precursor de raíces adventicias (HARTMANN, KESTER y DAVIES, 1990). Los mismos autores señalan que se ha asociado el origen de raíces adventicias desde el

callo con especies de difícil enraizamiento, como por ejemplo, *Chionanthus* (var. *virginicus*) y *Hedera helix* (fase adulta). El desarrollo del callo es más lento que el de los cultivos vegetativos y se observan diferencias entre las variedades. Los resultados indican que la velocidad de formación del callo es menor en las variedades que generan actividad vegetativa.

Se observó que las variedades que respondieron bien al tratamiento con IBA fueron: *cv. Lula*, *cv. Chico*, *cv. basal* (Figs. 4 y 5) y *cv. Pintado*. Los resultados de concentración óptima de IBA para la obtención de callo reportados en la literatura varían entre 0.01 y 10 mg/l. Se han asociado las altas tasas de respuesta a la aplicación de estímulos auxinicos con la presencia de exuberantes crecimientos radiculares. En el caso de *cv. Lula* se observó una tasa de respuesta de 0.3% de los explantos tratados con 10 mg/l de IBA y 100% de respuesta a 0.01 mg/l de IBA.



Las concentraciones de IBA que controlan la producción de callo, sin embargo, varían entre 0.01 y 10 mg/l. La Figura 4. Sección nodal de cv. "Lula" tratada con 10 mg/l de IBA, muestra el desarrollo de un grueso callo basal a los 21 días de cultivo.

callo con especies de difícil enraizamiento, como por ejemplo, Pinus radiata, Sedum y Hedera helix (fase adulta). Esto se relaciona con los trabajos de CUTTING y VUUREN (1988), donde se ha vinculado el desarrollo de callo basal con todas las estacas enraizadas de Persea americana Mill. cvs. 'Duke' y 'Fuerte' y concuerda con los resultados de GONZALEZ y SALAZAR (1984) donde la formación de raíces in vitro fue acompañada por la generación de callo.

Se observó en las secciones nodales sometidas a los tratamientos auxínicos un desarrollo excesivo de callo basal (Figura 5), manifestándose en mayor grado en las concentraciones más altas de IBA . Esta respuesta ha sido reportada por CUTTING y VUUREN (1988), autores que asocian la ausencia o reducidos niveles de enraizamientos de estacas de los cvs. 'Duke' y 'Fuerte' con el exuberante crecimiento de callo basal con concentraciones de 0.3% de IBA en talco, lo que podría explicar en parte, los resultados de enraizamiento asociado a concentraciones de AIB que controla la producción de callo. Sin embargo, GARCIA y SALAZAR (1984) empleando 7,5 y 10 mg/l de IBA, ocasionalmente observaron esta división celular masiva en la base del explante.

Estudios en *Persea americana* Mill. (RAVIV y REUVENI, 1984) han determinado una correlación entre la habilidad para enraízear y los niveles de actividad de cofactores del enraizamiento. La actividad de los cofactores es generalmente menor en explantes que no presentan raíces que en explantes que tienen raíces bien desarrolladas. Por lo tanto, la presencia de raíces en los explantes es una medida útil para evaluar la actividad de los cofactores.

La respuesta de los explantes a las auxinas endógenas o exógenas es más difícil de evaluar. Los autores reportan resultados contradictorios. Algunos autores dicen que la respuesta es débil, otros que es fuerte y otros que no existe respuesta.

Por último, se ha sugerido que el desarrollo excesivo del callo basal en sección nodal de explantes originados en la base de la rama, han tenido éxito en *Persea americana* Mill. han sido utilizados como criterio para evaluar la actividad de los cofactores. Sin embargo, este criterio no es muy preciso ya que el desarrollo excesivo del callo basal es un signo de actividad de los cofactores, pero no es un signo de actividad de los cofactores.

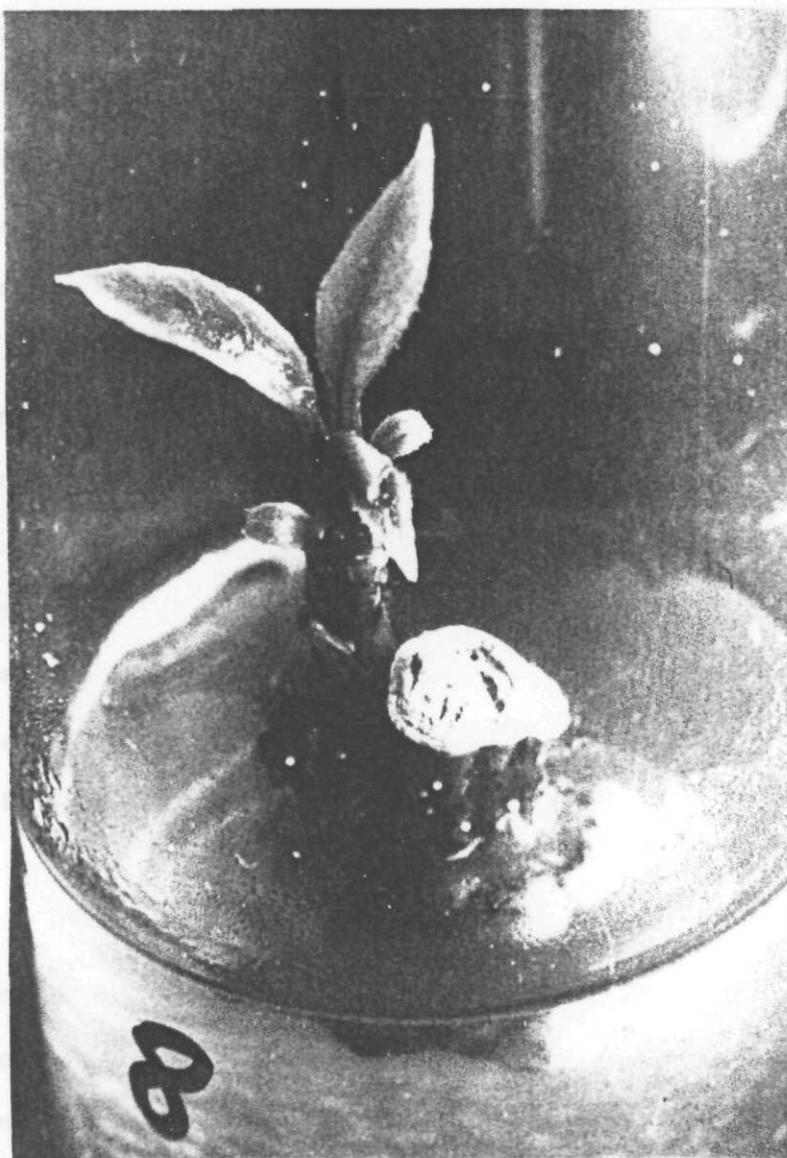


FIGURA 45. Desarrollo excesivo de callo basal en sección nodal de cv. 'Lula'. *adn* adulto.

Estudios en Persea americana Mill. (RAVIV y REUVENI, 1984) han determinado una correlación entre la habilidad para enraizar y los niveles de actividad de cofactores del enraizamiento extraídos de las hojas. La tendencia general fue una alta actividad de promotores en los clones de fácil enraizamiento (Northrop-28/5). Por lo cual, la ausencia de rizogénesis puede ser explicada por la presencia de inhibidores del enraizamiento en el explante utilizado, considerando que estos mismos autores reportaron altos niveles de inhibidores en clones de difícil enraizamiento, como 'Lula 3' y 'Nahlat-7'.

La respuesta rizogénica de las secciones nodales podría estar relacionada con los niveles de sustancias fenólicas endógenas, que facilitan o inhiben el enraizamiento (ROY et al., 1972; VIEITEZ y BALLESTER, 1988; CURIR et al., 1993).

Por ultimo, los resultados logrados en el ensayo pueden ser explicados por el tipo de material vegetal utilizado, considerando que los sistemas de propagación *in vitro* que han tenido éxito en Persea americana Mill. han empleado material juvenil, en contraste con el cultivo de explantes originados de árboles en estado adulto,

caracterizado por su deficiente capacidad rizogénica (PLIEGO-ALFARO y BERGH, 1992). Los resultados más satisfactorios han sido logrados aplicando la técnica de rejuvenecimiento, que restaura el potencial morfogenético del material adulto (PLIEGO-ALFARO *et al.*, 1990; PLIEGO ALFARO y BERGH, 1992).

4.3.4. Brotación.

Los niveles de brotación desarrollados por este tipo de explantes fueron relativamente bajos, manifestando una respuesta más favorable las microestacas de material de invernadero (Cuadro 8). No todas las yemas brotadas (elongación de yema axilar, Figura 6) de la sección presentaron expansión foliar y desarrollo de tallo como se aprecia en la Figura 7. Este tipo de desarrollo concuerda con el descrito por DALSASO y GUEVARA (1989).

Se aprecia (Cuadro 8) una tendencia diferencial en cuanto a la respuesta de cada tipo de explante a los diferentes tratamientos. Las microestacas de material de invernadero generan algún nivel de desarrollo en todos los tratamientos, en cambio, el material originado de campo no responde a los tratamientos T3 y T4.

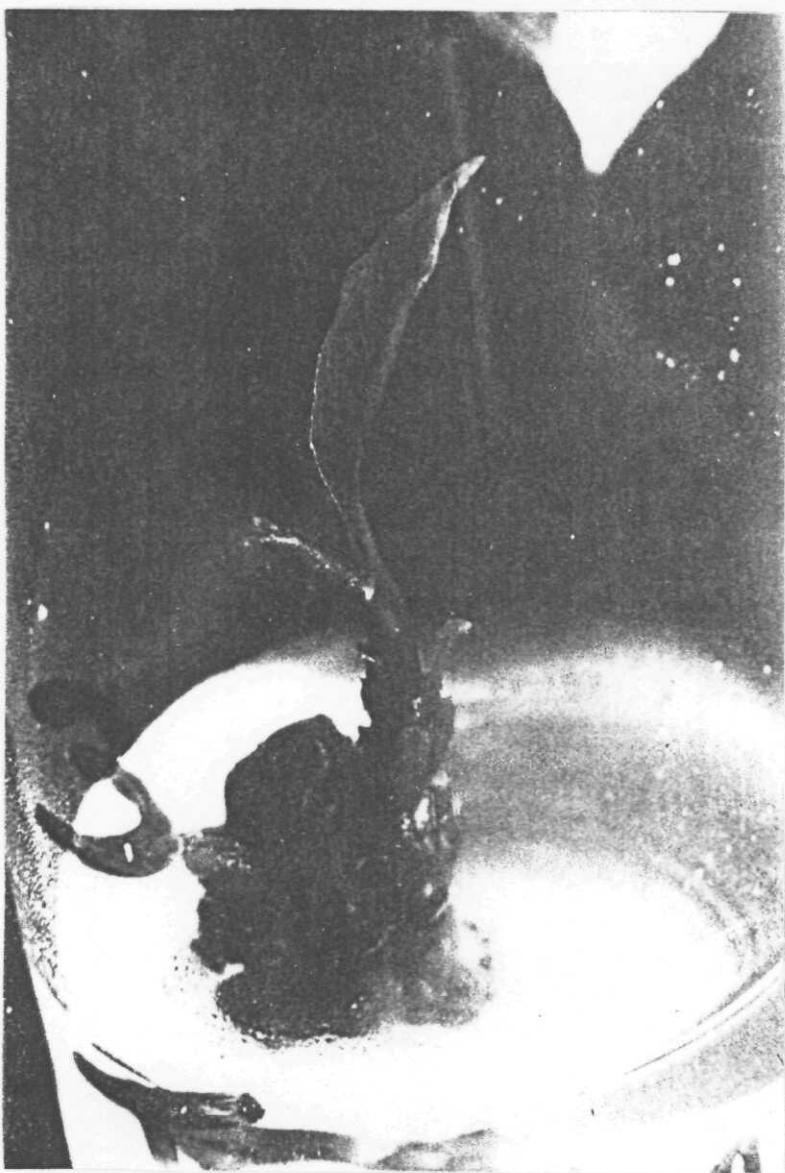


FIGURA 6. Elongación de yema axilar en microestaca de cv. 'Lula'

FIGURA 7. proveniente de material de campo, de cv. "Lula".

CUADRO 9. Brotación, expansión foliar, formación de tallo y longitud del brote en secciones nodales de material de campo e invernadero del cv. "Lula" a los 65 días de cultivo *in vitro*.

| Tipo de material | Brotación (%) | Expansión foliar (%) | Formación de tallo (%) | Longitud del brote (mm) |
|------------------|---------------|----------------------|------------------------|-------------------------|
| Campo | 100 | 100 | 100 | 15 |
| Invernadero | 100 | 100 | 100 | 15 |
| T. controladas | 100 | 100 | 100 | 15 |
| T0 (testigo) | 100 | 100 | 100 | 15 |
| T1 >1 mg/l | 100 | 100 | 100 | 15 |
| T2 >2 mg/l | 100 | 100 | 100 | 15 |
| T3 >7 mg/l | 100 | 100 | 100 | 15 |
| T4 >5 mg/l | 100 | 100 | 100 | 15 |

* Representa el promedio de los explantos que presentaron respuesta.

† Indicación de los ensayos realizados.

** Número de explantes que respondieron.

*** Número de explantes que presentaron desarrollo de plantitas.

La respuesta organogénica utilizando secciones nodales como explante no nodal de cv. "Lula".

FIGURA 7. Expansión foliar de sección nodal de cv. "Lula".

CUADRO 8. Brotación, expansión foliar, formación de tallo y longitud del brote en secciones nodales de material de campo e invernadero del cv. 'Lula' a los 65 días de cultivo in vitro.

| Tipo de material | T | brotación | expansión | formación | longitud |
|------------------|----|-----------|-----------|-----------|----------|
| | | Nº * | foliar | de tallo | brote |
| | | Nº ** | Nº *** | (mm) | **** |
| Campo | T0 | 1(12) | --- | --- | 0.6 |
| | T1 | 6(25) | 4 | 4 | 14.4 |
| | T2 | 6(19) | 3 | 3 | 10.5 |
| | T3 | 0(20) | --- | --- | --- |
| | T4 | 0(15) | --- | --- | --- |
| Inver- nadero | T0 | 2(22) | 2 | 2 | 3.5 |
| | T1 | 9(25) | 5 | 5 | 12.8 |
| | T2 | 3(26) | 2 | 2 | 8.4 |
| | T3 | 2(23) | 1 | --- | 5.2 |
| | T4 | 8(21) | 5 | 5 | 13.6 |

T : tratamientos.

T0 : testigo

T1 : 1 mg/l AIB

T2 : 2 mg/l AIB

T3 : 7 mg/l AIB

T4 : 5 mg/l AIB + CA (500 mg/l)

* Representa el número de microestacas que manifestaron elongación de yema axilar.

() Indica el número de secciones nodales al término del ensayo.

** Número de explantes que manifestaron expansión foliar.

*** Número de explantes que desarrollaron tallo.

****Promedio de longitud del brote entre los explantes que presentaron elongación de yema axilar.

La respuesta organogénica utilizando secciones nodales como explante no fue altamente satisfactoria, sin

embargo, se considera importante, teniendo en cuenta que el cultivo de yemas aisladas no generó los resultados positivos reportados por OYANEDEL (1995).

Cabe destacar, que superándose los problemas de contaminación de este tipo de explante, sería interesante evaluar la influencia de diferentes combinaciones de reguladores de crecimiento sobre la respuesta de secciones nodales a la brotación y posterior enraizamiento de los tallos desarrollados, considerando que microestacas obtenidas de brotes del ensayo 3 manifestaron elongación de sus yemas axilares (Figura 8).

4.4. - Ensayo 4. Efecto del hipoclorito de sodio en el medio de cultivo sobre los brotes y la contaminación y oxidación de secciones nodales de material de campo del cv. 'Bule'.

4.4.1. Oxidación.

4.4.1.1. Efecto de la concentración de hipoclorito de sodio y el medio de cultivo en el grado de oxidación de secciones nodales.



los resultados del ensayo 3. Tal respuesta muestra la existencia

FIGURA 8. Brotación de yemas axilares de microestaca obtenidas de brotes desarrollados en el cultivo de secciones nodales a concentraciones de 500 mg/l de hipoclorito de sodio, (Ensayo 3).

que varían en forma cualitativa y cuantitativa según si

4.4. Ensayo 4. Efecto del hipoclorito de sodio y el medio de cultivo sobre los niveles de contaminación y oxidación de secciones nodales de material de campo del cv. 'Lula'.

4.4.1. Oxidación.

4.4.1.1. Efecto de la concentración de hipoclorito de sodio y el medio de cultivo en el grado de oxidación de secciones nodales.

El análisis efectuado para determinar el efecto del hipoclorito de sodio y el medio de cultivo en cada categoría de la variable oxidación, no estableció diferencias significativas en ninguna fecha de evaluación durante el desarrollo del cultivo *in vitro* (Cuadro 9, Anexos 7, 8, 9 y 10). Por lo tanto, se puede afirmar que los aumentos de concentración hasta un 1% no afecta el nivel de oxidación, por lo cual esta concentración no fue nociva para el explante. Sin embargo, la respuesta oxidativa de las secciones nodales aumentó comparada con los resultados del ensayo 3. Tal respuesta indica la existencia de un componente estacional que afecta la capacidad de padeamiento relacionado con las concentraciones de sustancias fenólicas en los tejidos, que varían en forma cualitativa y cuantitativa según el

estado fenológico del vegetal (WISSEMANN y LEE, 1980; LIMA DE OLIVEIRA, et al., 1994).

CUADRO 9. Frecuencia y distribución de la variable oxidación en secciones nodales del cv. 'Lula' a los 3, 7, 14 y 21 días de cultivo in vitro.

| Día | T | Oxidación | | | | |
|-----|----|----------------------------|--------|-------|----------------------|-------|
| | | Frecuencias por Categorías | | | | |
| | | Ausencia | Apical | Basal | Apical + Basal | Total |
| 3 | T0 | 0 | 2 | 0 | 9 | 9 |
| | T1 | 0 | 7 | 1 | 8 | 4 |
| | T2 | 0 | 5 | 0 | 10 | 5 |
| | T3 | 0 | 5 | 0 | 10 | 5 |
| 7 | T0 | 0 | 0 | 0 | 9 | 11 |
| | T1 | 0 | 5 | 0 | 10 | 5 |
| | T2 | 0 | 3 | 0 | 10 | 7 |
| | T3 | 0 | 3 | 1 | 9 | 7 |
| 14 | T0 | 0 | 0 | 0 | 6 | 14 |
| | T1 | 0 | 3 | 0 | 7 | 10 |
| | T2 | 0 | 3 | 0 | 8 | 9 |
| | T3 | 0 | 3 | 1 | 9 | 7 |
| 21 | T0 | 0 | 0 | 0 | 5 | 15 |
| | T1 | 0 | 3 | 0 | 6 | 11 |
| | T2 | 0 | 2 | 0 | 8 | 10 |
| | T3 | 0 | 3 | 1 | 8 | 8 |

T : tratamientos

- T0 : WPM sin modificar + 0.5% hipoclorito de sodio
- T1 : WPM sin modificar + 1% hipoclorito de sodio
- T2 : WPM modificado + 0.5% hipoclorito de sodio
- T3 : WPM modificado + 1% hipoclorito de sodio

En relación con el contenido de sustancias fenólicas totales de las secciones natales, cuantificadas en el momento de iniciar el cultivo por el método de SWAIN y HILLIS (1959) especificado en el ensayo 1 (Anexo 11 y 12), manifestaron valores entre 0.17-0.33% de su peso fresco. Estos resultados concuerdan con trabajos efectuados en secciones natales apicales de estacas herbáceas de Annona cherimola Mill. var. "Concha Lisa", donde se determinaron niveles de fenoles de 0.11% del peso fresco (KANAMORI, 1995).

Los contenidos de sustancias fenólicas son menores en las secciones natales (0.27 %) que en yemas axilares (1.14%) recolectadas en la misma época (Ensayo 5, Anexo 13). Esto indica una concentración de compuestos fenólicos en las yemas axilares de la microestaca, los cuales se liberan al producirse ruptura celular, considerando que la zona de corte en relación al tejido intacto es más desfavorable en este tipo de explante, generando la respuesta oxidativa observada.

El medio de cultivo, al igual que la concentración de hipoclorito de sodio, no tuvo efecto sobre la oxidación. Tal respuesta se explica por la presencia de

antioxidantes en el medio WPM modificado, los cuales no sufrieron variación con respecto al medio WPM sin modificar.

4.4.2. Contaminación.

4.4.2.1. Efecto del medio de cultivo.

Los resultados indican que el medio de cultivo durante el desarrollo del ensayo no tuvo efecto en los niveles de contaminación. El reducir componentes del medio WPM no contribuyó a disminuir la incidencia de agentes contaminantes, caracterizada solamente por la presencia de bacterias (Cuadro 10, Anexo 15).

La colonización de bacterias se manifiesta a los siete días de cultivo con bajos niveles de contaminación. Esta se hace importante a los 14 días de iniciado el cultivo.

CUADRO 10. Frecuencia y distribución en el tiempo de la variable contaminación en secciones nodales del cv. 'Lula', a los 3, 7, 14 y 21 días de cultivo.

| Día | T | Contaminación | | Efecto | |
|-----|----|---------------|----|--------|-------|
| | | (frecuencia) | % | Medio | Dosis |
| 3 | T0 | 0 | 0 | NS | NS |
| | T1 | 0 | 0 | | |
| | T2 | 0 | 0 | | |
| | T3 | 0 | 0 | | |
| 7 | T0 | 6 | 30 | NS | NS |
| | T1 | 2 | 10 | | |
| | T2 | 8 | 40 | | |
| | T3 | 5 | 25 | | |
| 14 | T0 | 11 | 55 | NS | NS |
| | T1 | 8 | 40 | | |
| | T2 | 13 | 65 | | |
| | T3 | 9 | 45 | | |
| 21 | T0 | 15 | 75 | NS | S |
| | T1 | 11 | 55 | | |
| | T2 | 16 | 80 | | |
| | T3 | 9 | 45 | | |

NS : El valor cero está contenido en el Intervalo de Confianza (IC), por lo tanto, la diferencia estimada de proporciones no es significativa, con un 95% de confianza.

S : La diferencia estimada de proporciones es significativa con un 95% de confianza.

4.4.2.2. Efecto de la concentración de hipoclorito de sodio.

Durante los días 3, 7 y 14 de desarrollo del cultivo in vitro no se manifestó efecto de la concentración de

hipoclorito de sodio sobre la contaminación. Sin embargo, existe efecto del factor dosis de hipoclorito de sodio a los 21 días del cultivo (Cuadro 10) sobre la contaminación de las secciones nodales. Se logra una menor colonización del agente contaminante con la aplicación de concentraciones de hipoclorito de sodio al 1%. Los porcentajes de contaminación (45-55%) obtenidos con la mejor concentración no son satisfactorios, por lo cual, no se ha superado los problemas de establecimiento del explante.

La ausencia de contaminaciones fungosas, en ningún caso se relaciona con la dosis de hipoclorito de sodio, debido a que el tratamiento T0 corresponde al mismo protocolo de desinfección (OYANEDEL, 1995) aplicado en el ensayo 3, en el cual la incidencia de hongos fue del 33%, por lo tanto, la época de cultivo estaría influyendo en el tipo de agente contaminante, probablemente relacionado con las condiciones ambientales (DALSASO y GUEVARA, 1989).

Se deberían probar dosis mayores de hipoclorito de sodio sin dejar de considerar el efecto oxidante de este desinfectante químico (McCLELLAND y SMITH, 1993) y diferentes épocas de cultivo, como también el uso de

antibióticos aplicados como pretratamiento en el momento de recolección del material (JORDAN y OYANEDEL, 1992).

Cabe destacar, que una posibilidad es la utilización de material proveniente de invernadero por los menores niveles de contaminación obtenidos en el ensayo 3 (PIERIK, 1990; DE FOSSARD, 1992). Esto no fue posible debido al limitado material vegetal disponible bajo estas condiciones (9 plantas).

4.5. Ensayo 5. Efecto de la etiolación sobre la oxidación y organogénesis de yemas axilares del cv. 'Lula' proveniente de material de campo.

4.5.1. Oxidación

Al analizar la frecuencia y distribución de las yemas axilares del cultivar 'Lula' de acuerdo a la variable oxidación, se observa en el Cuadro 11 y Figura 9 que a los 14 días de iniciado el cultivo in vitro, momento en el cual los explantes se sometieron a luz indirecta después de permanecer durante 14 días en oscuridad, se observó una alta oxidación basal, no existiendo diferencias significativas entre material etiolado y

CUADRO 11. Frecuencia y distribución de la variable oxidación en yemas axilares del cv. 'Lula' asociado con el pretratamiento de etiolación, a los 14, 21 y 28 días de cultivo *in vitro*.

| | | Oxidación Frecuencia por Categoría | | | | |
|-----|----|---------------------------------------|--------|---------|----------------------|---------|
| Día | T | Ausencia | Apical | Basal | basal + apical | Total |
| 14 | NE | 0(0)a | 0* | 24(62)a | 8(21)a** | 7(18)b |
| | E | 3(8)a | 0 | 26(67)a | 10(28)a | 0(0)a |
| 21 | NE | 0(0)a | 0* | 11(28)a | 8(21)a | 20(51)b |
| | E | 2(5)a | 0 | 26(67)b | 10(28)a | 1(3)a |
| 34 | NE | 0* | 0* | 2(5)a | 7(18)a | 30(77)b |
| | E | 0 | 0 | 12(31)b | 21(54)b | 6(15)a |

NE : tratamiento sin etiolación

E : etiolación

() : valores entre paréntesis representan el porcentaje de oxidación en cada categoría en base a 39 unidades experimentales.

* : Los asteriscos indican que en las categorías respectivas, se observaron sólo 0's, por lo que no existe efecto del tratamiento.

** : frecuencias con letras iguales indican que la diferencia de proporciones estimadas no es significativa, con un 95% de confianza, el valor cero está contenido en el intervalo de confianza

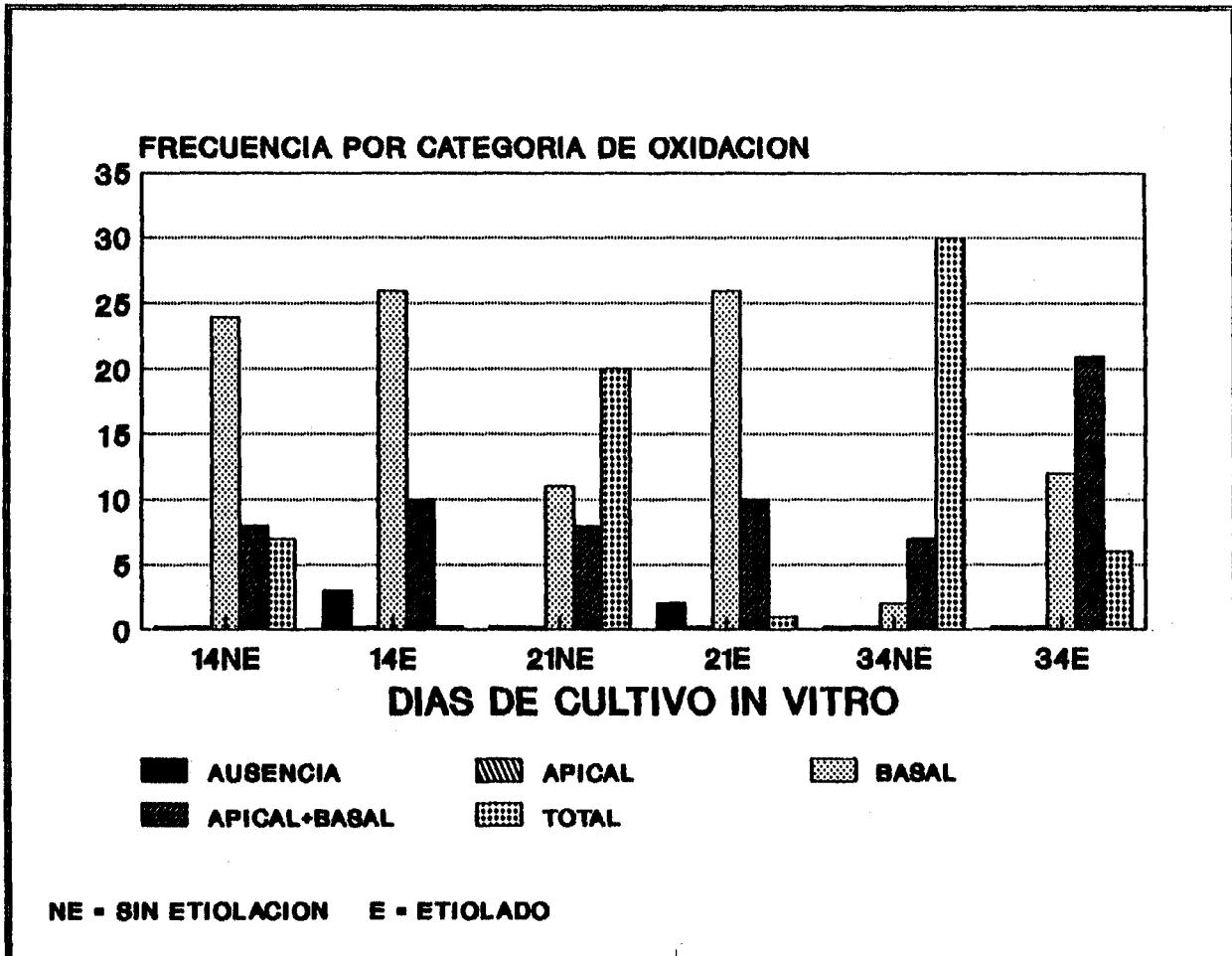


FIGURA 9. Efecto del pretratamiento de etiolación sobre la oxidación de yemas axilares del cv. 'Lula'.

sin etiolar (62 y 67% respectivamente). Sin embargo, existe efecto del factor tratamiento sobre la oxidación total de yemas axilares. El material vegetal sometido a un pretratamiento de etiolación no manifiesta oxidación total del explante, en cambio, ya se produce muerte en un 18 % de yemas axilares del tratamiento sin etiolación (NE) por pardeamiento generalizado.

La oxidación total observada tempranamente en el cultivo in vitro del material vegetal no etiolado se relaciona con el contenido inicial de sustancias fenólicas totales, el cual es significativamente superior en yemas axilares aisladas de brotes en activo crecimiento sin pretratamiento de etiolación (MARKS y SIMPSON, 1990).

A los 21 días de cultivo, periodo en el cual los explantes se trasladaron a luz directa, se produce una variación en la distribución frecuencial por categoría en el tratamiento sin etiolar, disminuyendo la Oxidación Basal que se explica por el aumento de Oxidación Total del explante, en contraste con el tratamiento etiolado. Se observa en el Cuadro 11, para esta misma fecha de evaluación, que no existe efecto del tratamiento etiolación sobre las categorías de Oxidación Ausencia,

Apical y Basal+Apical. En el caso de la Oxidación Basal y Total se manifiesta diferencias significativas entre tratamientos, produciéndose una menor Oxidación Total de yemas procedentes de material etiolado.

A los 34 días de cultivo (Cuadro 11 y Figura 9) la distribución frecuencial por categorías de oxidación se modifica nuevamente en el tratamiento sin etiolar, la oxidación basal y apical+basal disminuyeron manifestando diferencias significativas respecto al Tratamiento etiolado. Los valores de Oxidación Total establecen el efecto positivo del pretratamiento de etiolación sobre el control del pardeamiento de yemas axilares, determinando una mayor sobrevivencia del explante.

El efecto de la etiolación también fue posible detectarlo por la coloración de las yemas axilares. Las correspondientes al tratamiento NE (no clasificadas en la categoría oxidación total) presentaron un color verde amarillento en contraste a la coloración verde de las yemas axilares del tratamiento E (Figuras 10 y 11).

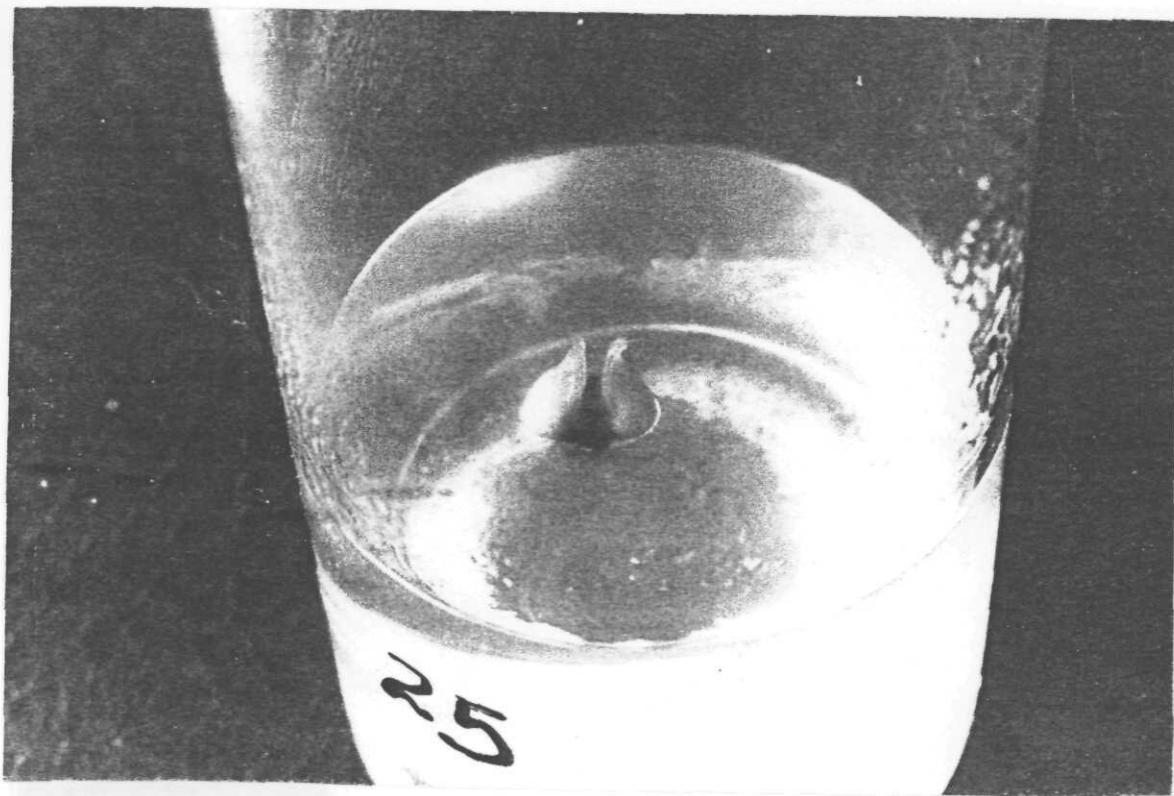


FIGURA 10. Yema axilar del cv. 'Lula' proveniente de material sin etiolar. Se observa una coloración verde amarillenta y ausencia de brotación.

Los resultados establecen que la oxidación fenólica causante de la pérdida de explantes fue minimizada cuando el cultivo *in vitro* se inicia utilizando yemas axilares provenientes de material vegetal etiolado. Respecto similar se observó en el cultivo *in vitro* de *Mangifera indica* 'Pallida', *Garrya elliptica* 'James Roof' y *Acer glabrum* 'Crimson King' logrando reducir los porcentajes de oxidación al utilizar material vegetal etiolado.



materiales sin etiolar. La diferencia es de 100% respectivamente. La proveniente de material etiolado. Se observa inicio reportado como un brote de elongación de yema.

Los resultados establecen que la oxidación fenólica causante de la pérdida de explantes fue minimizada cuando el cultivo *in vitro* se inicia utilizando yemas axilares provenientes de material vegetal etiolado. Respuesta similar se observó en el cultivo *in vitro* de Hamamelis mollis 'Pallida', Garrya elliptica 'James Roof' y Acer platanoides 'Crimson King' logrando reducir los porcentajes de oxidación al utilizar material vegetal originado de un stock de plantas sometidas a condiciones de crecimiento en oscuridad o expuestas a 1% de irradiación lumínica (MARKS y SIMPSON, 1990).

El parchamiento y necrosis es atribuido a la oxidación de compuestos fenólicos en los explantes, existiendo una alta correlación negativa entre sobrevivencia *in vitro* y contenido de fenoles (YU y MEREDITH, 1986), y una elevada correlación positiva entre oxidación y concentración de fenoles (LIMA DE OLIVIERA *et al.*, 1994) lo que explica los niveles de sustancias fenólicas en yemas axilares sometidas a un pre-tratamiento de etiolación (Cuadro 12), los cuales fueron significativamente inferiores al material sin etiolar (0.85496 % y 1,14285% respectivamente). La baja intensidad lumínica ha sido reportado como un tratamiento que favorece la respuesta

en el cultivo de tejidos (YU y MEREDITH, 1986).

CUADRO 12. Niveles de sustancias fenólicas totales en yemas axilares del cv. 'Lula' asociados al pretratamiento de etiolación, evaluados al inicio del cultivo *in vitro*.

| Tratamiento | Sustancias fenólicas totales (%) (1) |
|-------------|---|
| E | 0,85496 a * |
| NE | 1,14285 b |

NE : Sin etiolación.

E : Etiolación.

(1) : Porcentajes de sustancias fenólicas totales en base al peso fresco determinado mediante el método descrito por SWAIN y HILLIS (1959). Los valores corresponden al promedio de 10 yemas axilares (Anexos 10 y 11).

* : porcentajes con letras diferentes presentaron diferencias al 5% de significancia, según test de Fisher.

4.5.2. Brotación

El efecto positivo del pretratamiento de etiolación fue evidenciado en los resultados de brotación (Figura 10). Las yemas axilares del tratamiento E brotaron en un 82% (frecuencia 32) en contraste con la respuesta de yemas del tratamiento NE con un 0 por ciento. ZIZARI y LIONAKIS

(1994) cultivando in vitro yemas de material adulto de Persea americana cv. 'Duke', reportan un efecto similar de la etiolación, favoreciendo la brotación y proliferación de brotes axilares.

4.6. Ensayo 6. Evaluación de dos sistemas de aclimatización sobre la sobrevivencia y desarrollo radical de plantas in vitro de cv. 'Lula' y cv. 'Velvick' transferidos a condiciones in vitro.

El establecimiento de los sistemas de aclimatización propuesto para lograr la adaptación de plantas in vitro a una condición ambiental diferente no ha sido posible debido a las dificultades que ha manifestado esta especie recalcitrante (PLIEGO-ALFARO *et al.*, 1990).

Las dificultades se orientan específicamente a contaminación en la utilización de microestacas, que no han permitido la obtención de plantas in vitro con desarrollo aéreo y radical requeridos para someter a los diferentes sistemas de aclimatización.

En relación al cultivo in vitro de yemas aisladas, con el cual OYANEDEL (1995) logró resultados satisfactorios en

el primer año de desarrollo del presente proyecto, no fue posible lograr organogénesis del explante, producto de su oxidación. Sin embargo, la etiolación generó una respuesta más favorable de yemas axilares en el cv. 'Lula'.

5. CONCLUSIONES

No se logró establecer las condiciones óptimas para el enraizamiento *in vitro* y aclimatización de los portainjertos de palto cvs. 'Lula' y 'Velvick'.

Las principales limitantes en la propagación *in vitro* de los portainjertos de palto se manifestaron en la etapa de establecimiento, debido a problemas de oxidación en yemas axilares y elevados niveles de contaminación en secciones nodales.

El trasvasaje sucesivo a un medio fresco no fue efectivo como tratamiento para superar los efectos nocivos del pardamiento en yemas axilares de los cvs. 'Lula' y 'Velvick'

Los niveles de sustancias fenólicas totales en yemas axilares de los cvs. 'Lula' y 'Velvick' fueron disminuyendo durante el cultivo *in vitro*, en contraste con el aumento del pardamiento.

No existe efecto de la dosis de hipoclorito de sodio, ni del medio de cultivo sobre la oxidación de las secciones nodales del cv. 'Lula' durante 21 días de cultivo.

El hipoclorito de sodio al 1% disminuye la contaminación bacteriana de las secciones nodales, sin embargo, la incidencia de este patógeno sigue siendo importante, afectando el establecimiento del explante.

Existe efecto del manejo de etiolación sobre el pardeamiento y respuesta organogénica del cv. 'Lula', expresado en un alto porcentaje de brotación y sobrevivencia, asociado a menores niveles de sustancias fenólicas totales.

6. RESUMEN

Esta investigación forma parte de la segunda etapa de un proyecto para determinar la factibilidad de la propagación *in vitro* de dos portainjertos de palto (*Persea americana* Mill.) cvs. 'Lula' y 'Velvick', resistentes a salinidad. El objetivo de esta segunda etapa es establecer las condiciones óptimas para llevar a cabo las etapas de enraizamiento y aclimatización.

Los ensayos se desarrollaron en el Laboratorio de Micropropagación de la Facultad de Agronomía de la Universidad Católica de Valparaíso.

El material vegetal proviene de árboles del cv. 'Lula' (8 años de edad) y del cv. 'Velvick' (5 años) injertados sobre patrón franco del cv. 'Mexicola', pertenecientes a la Empresa Agrícola Huerto California Ltda., y de plantas de vivero de 1 año, mantenidas en invernadero en la Estación Experimental de la Escuela de Agronomía de la Universidad Católica de Valparaíso.

Se evaluó el efecto de la trasferencia sucesiva del explante a un medio fresco, sobre el pardeamiento y brotación de yemas axilares de ambos cultivares. El trasvasaje del explante no ejerció efecto en el control de la oxidación.

Secciones nodales del cv. 'Lula' originadas de material de campo e invernadero, fueron sometidas a distintas dosis de AIB para evaluar su efecto en el enraizamiento directo. La respuesta rizogénica no fue evaluada debido a la pérdida de unidades experimentales por contaminación. En base a estos resultados se evaluó el efecto del medio de cultivo y el hipoclorito de sodio sobre la oxidación y contaminación.

Se determinó el efecto positivo del pretratamiento de etiolación sobre el control del pardeamiento y organogénesis de yemas axilares del cv. 'Lula', asociado a menores contenidos de fenoles totales del explante.

No fue posible determinar las condiciones óptimas de enraizamiento y aclimatización.

7. LITERATURA CITADA

- BHAT, S.R. and CHANDEL, K.P.S. 1991. A novel technique to overcome browning in tissue culture. *Plant Cell Reports* 10:358-361.
- BLAKESLEY, D., WESTON, G.D. and ELLIOTT, M.C. 1992. Increased rooting and of Cotinus coggygria cuttings from etiolated stock plants. *Journal of Horticultural Science* 67(1):33-37.
- BRAINERD, K. and FUCHIGAMI, L. 1981. Acclimatization of aseptically cultured Apple plants to low relative humidity. *J. Amer. Soc.Hort.Sci.* 106(4):515-518.
- BROOME, O.C. and ZIMMERMAN, R.H. 1978. In vitro propagation of Blackberry. *HortScience* 13(2): 151-153.
- CUTTING, J.G.M. and VUUREN, V. 1988. Rooting Leafy Non-Etiolated avocado cuttings from Gibberelin-injected trees. *Scientia Horticulturae* 37:171-176.
- CIREN-CORFO (CHILE) 1993. Catastro frutícola de la V Región. Santiago, CORFO. 247 p.
- CURIR, P., SULIS, S., MARIANI, F., VAN SUMERE, C., MARCHESINI, A. and DOLCI, M. 1993. Influence of endogenous phenols on rootability of Chamaelaucium uncinatum Schauer. stem cuttings. *Scientia Horticulturae* 55:303-314.
- CURRY, E.A. and WILLIAMS, M.W. 1983. Promalin or GA3 increase pedicel and fruit length and leaf size of 'Delicious' apples treated with paclobutrazol. *HortScience* 18(2):214-215.

DALSASO, L. y GUEVARA, E. 1989. Multiplicación clonal *in vitro* del aguacate (*Persea americana*) cv. 'Fuerte'. *Agronomia Costarricense* 13(1):61 - 71.

DE FOSSARD, R.A. 1992. Treatments of plants whith hypochlorite solutions. In: The International Plant Propagators' Society Combined Proceedings 42:65-66.

FARI, M. and NEMETH, J. 1987. Thin PVC foil covering (TPFC). An efficient method for culture and preacclimatization of *in vitro* plants cultures. *Acta Hort.* 212:371-374.

GEORGE, E. and SHERRINGTON, P. 1984. Plant propagation by tissue culture. Eversley-London, England Exergetic. 709 p.

GARCIA-GOMEZ, M.L., SANCHEZ-ROMERO, C., BARCELO-MUMOZ, A. HEREDIA, A. and PLIEGO-ALFARO, F. 1994. Levels of endogenous indole-3-acetic acid and indole-3-acetyl-aspartic acid during adventicius rooting in avocado microcuttings. *Journal of Experimental Botany* 45(275):865-870.

GONZALEZ-ROSAS, H. and SALAZAR-GARCIA, S. 1984. Root induction and vegetative development from avocado plantules (*Persea americana* Mill.). *Calif. Avocado Society Yearbook* 68:167 - 171.

_____, _____. and VAZQUEZ, V. 1985. Propagación *in vitro* of chinini (*Persea schiedeana* Ness). *Calif. Avocado Soc. Yrbk.* 69:125-131.

_____, LLANO-AGUDELO, B. and SALAZAR-GARCIA, S. 1990. Effects of IBA, kinetin, and benzil amino purine on the germination, shoot development, and root formation in avocado embryos cultivated *in vitro*. *Calif. Avocado Soc. Yrbk.* 75:201-205.

HARTMANN, H.T., KESTER, D.E. and DAVIES, F.T. 1990. Plant Propagation. Principles and Practices. 5th. Ed. Englewood Cliffs, Prentice Hall. 647 p.

HERDENSON, K., TAJI, A. and WILLIAMS, R. 1993. Effects of reduced humidity and Paclobutrazol on acclimatisation of Tissue-Cultured plants. In: The International Plant Propagator's Society Combined 43:97-102.

JORDAN, M., ITURRIAGA, L. and ROVERANO, C. 1991. Promotion of Annona cherimola in vitro shoot morphogenesis as influenced by antioxidants. Gartenbauwissenschaft 56(5):221-227.

_____ and OYANEDEL, E. 1992. Regeneration of Pouteria lucuma (Sapotaceae) plants in vitro. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 31:249-252.

KANAMORI, P. 1995. Evaluación de protocolos de cultivo in vitro para chirimoyo. Puesta a punto de la técnica para la cuantificación de sustancias fenólicas en estacas herbáceas de chirimoyo según Swain y Hillis (1959). Taller de Licenciatura Ing. Agr. Quillota, Universidad Católica de Valparaíso. Facultad de Agronomía. 146 p.

KOZAI, T. 1990. High technology in protected cultivation. In: Collected papers studies on the effects of physical environment on the growth of plantlets in vitro. Chiba (Japan), Chiba University.

LIMA DE OLIVIERA, S., BARBOSA, N., SUCUPIRA, M. and SOUZA, A. 1994. Polyphenoloxidase activity, polyphenols concentration and browning intensity during soursop (Annona muricata L.) maturation. Journal of Food Science 59(5):1050-1052.

- KURTZ, M. and TOLLEY, T. 1990. Generation and selection of Phytophthora cinammomi resistant avocado rootstocks through somaclonal variation. Calif. Avocado Society Yearbook 67:65-70.
- MARIN, J.A. and GELLA, R. 1988. Is desiccation the cause of the poor survival rate in the acclimatization of micropropagated Prunus cerasus L. Acta Horticulturae 230:105 -112.
- MARKS, T.R. and SIMPSON, S. 1990. Reduced phenolic oxidation at culture initiation in vitro following the exposure of field-grown stockplants to darkness or low levels of irradiance. The Journal of Horticultural Science 65(2):103-111.
- MAYNARD, B. and BASSUK, N. 1985. Etiolation as a tool for rooting cuttings of difficult-to-root woody plants. In: The International Plant Propagators' Society Combined Proceedings 35:488-494.
- McCLELLAND, M.T. 1993. Alternative methods for sterilization and cutting. In: The International Plant Propagators' Society Combined Proceedings 43:526-530.
- MOHAMED-YASSEEN, Y., SCHENLL, R., KNIGHT, R. and DAVENPORT, T. 1992. In vitro plant regeneration from avocado (Persea americana Mill.). HortScience 27:696.
- _____. 1993. In vitro propagation of avocado (Persea americana Mill.). Calif. Avocado Society Yearbook 28:101-103.
- NEL, D. and KOTZÉ, J.M. 1982. Tissue culture of avocado. South African Avocado Grower's Association Yearbook 5:68 - 70.

- OYANEDEL, E. 1995. Desarrollo de sistemas de micropagación para dos portainjertos de palto (Persea americana Mill.) resistentes a salinidad. Taller de Licenciatura Ing. Agr. Quillota, Universidad Católica de Valparaíso. Facultad de Agronomía. 85 p.
- PIERIK, R.L. 1990. Cultivo in vitro de las plantas superiores. Madrid, Mundi-Prensa. 326 p
- PLIEGO-ALFARO, F. 1988. Development of an in vitro rooting bioassay using juvenile-fase steam cutting of Persea americana Mill. Journal of Horticultural Science 63(2):295-301.
- _____. and MURASHIGE, T. 1987. Possible rejuvenation of adult avocado by grafting onto juvenile rootstocks in vitro. HortScience 22:1321-1324.
- _____. , BARCELÓ-MUÑOZ, A., HERRERO CASTAÑO, A. y LOPEZ-ENCINA, C. 1990. Micropagación de especies subtropicales. Hortofruticultura 8:47-50.
- RAVIV, M. and REUVENI, O. 1984. Mode of leaf shedding from avocado cuttings and the effect of delay on rooting. HortScience 19(4):529-531.
- ROY, B.N., ROYCHOUDHURY, N., BOSE, T.K. and BASU, R.N. 1972. Endogenous phenolic compounds as regulators of rooting cuttings. Phyton 30(1/2): 147-151.
- SAHAR, N. and SPIEGEL-ROY, P. 1984. In vitro germination of avocado. HortScience 19:886-888.
- SCIANCALEPORI, V. and LONGONE, V. 1984. Polyphenol oxidase activity and browning in green olives. J. Agric. Chem. 32:320-321.

- SCHALL, S. 1987. La multiplication de l'avocatier (*Persea americana* Mill. cv. 'Fuerte') par microbouturage in vitro. *Fruits* 42(3):171 - 176.
- SKENE, K.G.M. and BARLASS, M. 1983. In vitro culture of abscissed immature avocado embryos. *Annals of Botany* 52:667 - 672.
- SOLORZANO, D. 1989. Propagation in vitro of rootstocks of avocado. *Calif. Avocado Society Yearbook* 73:149-151.
- SUTTER, E.G. and LANGHANS, R. 1979. Epicuticular wax formation on Carnation plantlets regenerated from shoot-tip culture. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 104: 493 - 496.
- _____, and _____. 1982. Formation of epicuticular wax and its effect on water loss in cabbage plants regenerated from shoot-tip culture. *Can. J. Bot.* 60:2896 -2902.
- _____. 1988. Stomatal and cuticular water loss from Apple, Cherry and Sweetgun plants after removal from in vitro culture. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 113(2): 234 - 238.
- _____, NOVELLO, V. and SHACKEL, K. 1988. Physiological and anatomical aspects of water stress of cultured plants. *Acta horticulturae* 230:113 - 117.
- SWAIN, T. and HILLIS, E. 1959. The phenolic constituents of *Prunus domestica*: The quantitative analysis of phenolic constituents. *J. Sci. Food Agric.* 10:63-68.
- TORRES, A., MAU-LASTOVICKA, T. and REZAAIYAN, R. 1987. Total phenolics and high-performance liquid chromatography of phenolic acids of Avocado. *J. Agric. Food Chem* 35(6): 921 - 925.

- VAUGHN, K.C. and DUKE, S.O. 1984. Function of polyphenol oxidase in higher plants. *Physiol. Plant.* 60:106-112.
- VIDAL, M.T., AZCON-AGUILAR, C., BAREA, J.M. y PLIEGO-ALFARO, F. 1992. Mycorrhizal inoculation enhances growth and development of micropropagated plants of avocado. *HortScience* 27(7):785-787.
- VIEITEZ, F. and BALLESTER, A. 1988. Effect of etiolation and shading on the formation of rooting inhibitors in chestnut trees. *Phyton* 48(1/2):13-19.
- VOTIATZIS, D. and GRANAHAN, G. 1994. An improved method for acclimatizing tissue-cultured Walnut plantlets using an antitranspirant. *Hortscience* 29(1):42.
- WHILEY, A.W. and SCHAFFER, B. 1993. ¹⁴C-Photosynthate partitioning in avocado trees as influenced by shoot development. *HortScience* 28(8):850 - 852.
- WHISH, J.P.M., WILLIAMS, R.R. and TAJI, A.M. 1992. Acclimatization: Effects of reduced humidity in vitro. *Acta Hortic.* 319:231-236.
- WISSEMAN, W. and LEE, C. 1980. Polyphenoloxidase activity during grape maturation and wine production. *Am. J. Enol. Vitic.* 31(3):206-211.
- YADAV, U., LAL, M. and JAISWAL, V. S. 1990. Micropropagation of *Morus nigra* L. from shoot tip and nodal explants of mature trees. *Scientia Horticulturae* 44:61-67.
- YU, D. and MEREDITH C.P. 1986. The influence of explant origin on tissue browning and shoot production in shoot tip cultures of grapevine. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 111(6):972-975.

- ZIMMERMAN, R. 1985. Simplified method for rooting Apple cultivars in vitro. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 110(10):34-38.
- _____. 1988. Micropropagation of woody plants: Post-tissue culture aspects. Acta Horticulturae 227:480 - 490.
- ZIRARI, A. and LIONAKIS, S.M. 1994. Effect of cultivar, explant type, etiolation pretreatment and the age of plant material on the in vitro regeneration ability of avocado (Persea americana). Acta Horticulturae 365:69-76.
- ZIV, M. and HALEVY, A.H. 1983. Control of oxidative browning and in vitro propagation of Strelizia reginae. HortScience 18(4):434 - 436.

ANEXOS

ANEXO 1

CURVA PATRON PARA LA DETERMINACION DE SUSTANCIAS FENOLICAS DEL CV. "VELVICK". TRATAMIENTO T0 Y T6, DIA CERO DEL CULTIVO IN VITRO

| (ug/l) | % TRANMITANCIA | ABSORBANCIA |
|--------|----------------|-------------|
| 0 | 100.0 | 0.0000 |
| 5 | 89.0 | 0.0506 |
| 10 | 79.0 | 0.1024 |
| 15 | 69.5 | 0.1580 |
| 20 | 64.0 | 0.1938 |
| 25 | 55.0 | 0.2596 |
| 30 | 51.0 | 0.2924 |
| 35 | 46.0 | 0.3372 |
| 50 | 33.5 | 0.4750 |
| 80 | 18.0 | 0.7447 |
| 100 | 13.0 | 0.8861 |

| |
|---------------------------------------|
| ECUACION : Y = 111.8377 * X - 1.94663 |
|---------------------------------------|

ANEXO 2

PORCENTAJE DE SUSTANCIAS FENOLICAS EN BASE AL PESO FRESCO DE LAS YEMAS AXILARES DEL CV. 'VELVICK'. TRATAMIENTO TO Y DIA CERO DEL CULTIVO IN VITRO.

| MUESTRA | % T | % A | $\mu\text{g/l}$ | PESO FRESCO (g) | % SUSTANCIAS FENOLICAS |
|---------|------|--------|-----------------|--------------------|---------------------------|
| 1 | 51.0 | 0.2924 | 30.0000 | 0.0040 | 0.7500 |
| 2 | 47.0 | 0.3279 | 34.7273 | 0.0055 | 0.6314 |
| 3 | 28.0 | 0.5528 | 59.8776 | 0.0080 | 0.7484 |
| 4 | 61.0 | 0.2147 | 22.0652 | 0.0030 | 0.7355 |
| 5 | 33.5 | 0.4750 | 51.1766 | 0.0050 | 1.0235 |
| 6 | 18.0 | 0.7447 | 81.3392 | 0.0115 | 0.7072 |
| 7 | 21.0 | 0.6778 | 73.8573 | 0.0085 | 0.8689 |
| 8 | 30.0 | 0.5229 | 56.5336 | 0.0060 | 0.9422 |
| 9 | 56.0 | 0.2518 | 26.2144 | 0.0025 | 1.0485 |
| 10 | 51.0 | 0.2924 | 30.0000 | 0.0028 | 1.0714 |

T : TRAMITANCIA

A : ABSORBANCIA

$\mu\text{g/l}$: CONCENTRACION DE FENOLES

PROMEDIO : 0.8527 % SUSTANCIAS FENOLICAS.

ANEXO 3

PORCENTAJE DE SUSTANCIAS FENOLICAS EN BASE AL PESO FRESCO DE LAS YEMAS AXILARES DEL CV. 'VELVICK'. TRATAMIENTO T6 Y DIA CERO DEL CULTIVO IN VITRO.

| MUESTRA | % T | % A | ug/l | PESO FRESCO (g) | % SUSTANCIAS FENOLICAS |
|---------|------|---------|----------|--------------------|---------------------------|
| 1 | 30.5 | 0.5157 | 59.6210 | 0.0078 | 0.7643 |
| 2 | 32.5 | 0.4881 | 56.5342 | 0.008 | 0.6651 |
| 3 | 66.5 | 0.1771* | 108.7630 | 0.0080 | 0.7484 |
| 4 | 75.0 | 0.1249 | 15.9148 | 0.0010 | 1.5914 |
| 5 | 64.0 | 0.1938* | 118.102 | 0.0110 | 1.0736 |
| 6 | 20.0 | 0.6989 | 80.109 | 0.0210 | 0.3800 |
| 7 | 21.0 | 0.6777 | 77.738 | 0.0069 | 1.1266 |
| 8 | 22.0 | 0.6575 | 75.479 | 0.0080 | 0.9434 |
| 9 | 58.0 | 0.2365 | 28.395 | 0.0018 | 1.5775 |
| 10 | 21.5 | 0.6777 | 77.738 | 0.0080 | 0.9717 |

T : TRAMITANCIA

A : ABSORBANCIA

ug/l : CONCENTRACION DE FENOLES

PROMEDIO : 0.9876 % SUSTANCIAS FENOLICAS.

* : DILUCION 5 ml MUESTRA EN 25 ml.

ANEXO 4

CURVA PATRON PARA LA DETERMINACION DE SUSTANCIAS FENOLICAS DEL CV. 'VELVICK'. TRATAMIENTO T0 Y T6, DIA 14 DEL CULTIVO IN VITRO

| (ug/l) | % TRANMITANCIA | ABSORBANCIA |
|--------|----------------|-------------|
| 0 | 100.0 | 0.0000 |
| 10 | 75.0 | 0.1249 |
| 20 | 63.0 | 0.2006 |
| 30 | 50.0 | 0.3013 |
| 35 | 46.0 | 0.3372 |
| 40 | 42.0 | 0.3767 |
| 50 | 34.0 | 0.4685 |
| 60 | 27.0 | 0.5686 |
| 70 | 23.0 | 0.6382 |
| 80 | 21.0 | 0.6778 |
| 100 | 14.0 | 0.8538 |

$$\text{ECUACION : } Y = 118.59 * X - 4.0273$$

ANEXO 6

PORCENTAJE DE SUSTANCIAS FENOLICAS EN BASE AL PESO FRESCO DE LAS YEMAS AXILARES DEL CV. 'VELVICK'. TRATAMIENTO T6 Y DIA 14 DEL CULTIVO IN VITRO.

| MUESTRA | % T | % A | ug/l | PESO FRESCO (g) | % SUSTANCIAS FENOLICAS |
|---------|------|--------|---------|--------------------|---------------------------|
| 1 | 64.0 | 0.1938 | 18.9564 | 0.0135 | 0.1404 |
| 2 | 52.0 | 0.2839 | 29.6403 | 0.0230 | 0.1288 |
| 3 | 25.0 | 0.6020 | 67.3639 | 0.0410 | 0.1643 |
| 4 | 55.0 | 0.2596 | 26.7586 | 0.0320 | 0.0836 |
| 5 | 23.0 | 0.6382 | 71.6569 | 0.0390 | 0.1837 |
| 6 | 46.0 | 0.3372 | 35.9612 | 0.0360 | 0.0998 |
| 7 | 52.0 | 0.2839 | 29.6403 | 0.0175 | 0.1693 |
| 8 | 56.0 | 0.2518 | 25.8336 | 0.0300 | 0.0861 |
| 9 | 67.0 | 0.1739 | 35.5954 | 0.0485 | 0.0342 |
| 10 | 21.0 | 0.6777 | 76.3412 | 0.0155 | 0.4925 |

T : TRAMITANCIA

A : ABSORBANCIA

ug/l : CONCENTRACION DE FENOLES

PROMEDIO : 0.1214 % SUSTANCIAS FENOLICAS.

ANEXO 6

PORCENTAJE DE SUSTANCIAS FENOLICAS EN BASE AL PESO FRESCO DE LAS YEMAS AXILARES DEL CV. 'VELVICK'. TRATAMIENTO T6 Y DIA 14 DEL CULTIVO IN VITRO.

| MUESTRA | % T | % A | ug/l | PESO FRESCO (g) | % SUSTANCIAS FENOLICAS |
|---------|------|--------|---------|--------------------|---------------------------|
| 1 | 64.0 | 0.1938 | 18.9564 | 0.0135 | 0.1404 |
| 2 | 52.0 | 0.2839 | 29.6403 | 0.0230 | 0.1288 |
| 3 | 25.0 | 0.6020 | 67.3639 | 0.0410 | 0.1643 |
| 4 | 55.0 | 0.2596 | 26.7586 | 0.0320 | 0.0836 |
| 5 | 23.0 | 0.6382 | 71.6569 | 0.0390 | 0.1837 |
| 6 | 46.0 | 0.3372 | 35.9612 | 0.0360 | 0.0998 |
| 7 | 52.0 | 0.2839 | 29.6403 | 0.0175 | 0.1693 |
| 8 | 56.0 | 0.2518 | 25.8336 | 0.0300 | 0.0861 |
| 9 | 67.0 | 0.1739 | 35.5954 | 0.0485 | 0.0342 |
| 10 | 21.0 | 0.6777 | 76.3412 | 0.0155 | 0.4925 |

: TRAMITANCIA

: ABSORBANCIA

ug/l : CONCENTRACION DE FENOLES

PROMEDIO : 0.1214 % SUSTANCIAS FENOLICAS.

ANEXO 7

FRECUENCIA Y DISTRIBUCION DE LA VARIABLE OXIDACION EN SECCIONES NODALES DEL CV. 'LULA' A LOS 3 DIAS DE CULTIVO in vitro.

| Oxidación | | | | | | |
|----------------------------|----|------|--------|-------|----------------|-------|
| Frecuencias por categorías | | | | | | |
| Dia | T | Nada | Apical | Basal | Apical + Basal | Total |
| 3 | T0 | 0 | 2 | 0 | 9 | 9 |
| | T1 | 0 | 7 | 1 | 8 | 4 |
| | T2 | 0 | 5 | 0 | 10 | 5 |
| | T3 | 0 | 5 | 0 | 10 | 5 |

| Categorías | IC(MEDIO) | IC(DOSIS) |
|------------|--------------------|-------------------|
| Nada | *** | *** |
| Apical | (-1.169 ; 0.8926)* | (-1.763 ; 0.3561) |
| Basal | (-171.9 ; 192.17) | (-171.9 ; 192.17) |
| A + B | (-1.184 ; 0.5793) | (-0.779 ; 0.9798) |
| Total | (-0.607 ; 1.3422) | (-0.369 ; 1.6039) |

T : tratamientos

T0 : WPM sin modificar + 0.5% hipoclorito de sodio

T1 : WPM sin modificar + 1% hipoclorito de sodio

T2 : WPM modificado + 0.5% hipoclorito de sodio

T3 : WPM modificado + 1% hipoclorito de sodio

A+B : apical + basal

*** : se observaron sólo valores 0's, por lo que no existe efecto del tratamiento.

* : si el valor cero está contenido en el Intervalo de Confianza (IC) la diferencia estimada de proporciones no es significativa, con un 95% de confianza.

ANEXO 8

FRECUENCIA Y DISTRIBUCION DE LA VARIABLE OXIDACION EN SECCIONES NODALES DEL CV. 'LULA' A LOS 7 DIAS DE CULTIVO in vitro.

| Oxidación | | | | | | |
|----------------------------|----|------|--------|-------|----------------|-------|
| Frecuencias por categorías | | | | | | |
| Día | T | Nada | Apical | Basal | Apical + Basal | Total |
| 7 | T0 | 0 | 0 | 0 | 9 | 11 |
| | T1 | 0 | 5 | 0 | 10 | 5 |
| | T2 | 0 | 3 | 0 | 10 | 7 |
| | T3 | 0 | 3 | 1 | 9 | 7 |

| Categorías | IC(MEDIO) | IC(DOSIS) |
|------------|--------------------|-------------------|
| Nada | *** | *** |
| Apical | (-1.488 ; 1.0656)* | (-2.534 ; 0.2825) |
| Basal | (-311.4 ; 289.18) | (-311.4 ; 289.18) |
| A + B | (-0.878 ; 0.8777) | (-0.878 ; 0.8777) |
| Total | (-0.693 ; 1.1202) | (-0.273 ; 1.5660) |

T :tratamientos

T0 :WPM sin modificar + 0.5% hipoclorito de sodio
 T1 :WPM sin modificar + 1% hipoclorito de sodio
 T2 :WPM modificado + 0.5% hipoclorito de sodio
 T3 :WPM modificado + 1% hipoclorito de sodio

A+B :apical + basal

*** :se observaron sólo valores 0's, por lo que no existe efecto del tratamiento.

* :si el valor cero está contenido en el Intervalo de Confianza (IC) la diferencia estimada de proporciones no es significativa, con un 95% de confianza.

ANEXO 9

FRECUENCIA Y DISTRIBUCION DE LA VARIABLE OXIDACION EN SECCIONES NODALES DEL CV. 'LULA' A LOS 14 DIAS DE CULTIVO in vitro.

| Oxidación | | | | | | |
|----------------------------|----|------|--------|-------|----------------|-------|
| Frecuencias por categorías | | | | | | |
| Día | T | Nada | Apical | Basal | Apical + Basal | Total |
| 14 | T0 | 0 | 0 | 0 | 6 | 14 |
| | T1 | 0 | 3 | 0 | 7 | 10 |
| | T2 | 0 | 3 | 0 | 8 | 9 |
| | T3 | 0 | 3 | 1 | 9 | 7 |

| Categorías | IC(MEDIO) | IC(DOSIS) |
|------------|--------------------|-------------------|
| Nada | *** | *** |
| Apical | (-2.239 ; 0.6841)* | (-2239 ; 0.6841) |
| Basal | (-311.4 ; 289.18) | (-311.4 ; 289.18) |
| A + B | (-1.340 ; 0.4828) | (-1.121 ; 0.6931) |
| Total | (-0.084 ; 1.7054) | (-0.282 ; 1.4911) |

T :tratamientos

T0 :WPM sin modificar + 0.5% hipoclorito de sodio

T1 :WPM sin modificar + 1% hipoclorito de sodio

T2 :WPM modificado + 0.5% hipoclorito de sodio

T3 :WPM modificado + 1% hipoclorito de sodio

A+B :apical + basal

*** :se observaron sólo valores 0's, por lo que no existe efecto del tratamiento.

* :si el valor cero está contenido en el Intervalo de Confianza (IC) la diferencia estimada de proporciones no es significativa, con un 95% de confianza.

ANEXO 10

FRECUENCIA Y DISTRIBUCION DE LA VARIABLE OXIDACION EN SECCIONES NODALES DEL CV. 'LULA' A LOS 21 DIAS DE CULTIVO in vitro.

| Oxidación | | | | | | |
|----------------------------|----|------|--------|-------|----------------|-------|
| Frecuencias por categorías | | | | | | |
| Día | T | Nada | Apical | Basal | Apical + Basal | Total |
| 21 | T0 | 0 | 0 | 0 | 5 | 15 |
| | T1 | 0 | 3 | 0 | 6 | 11 |
| | T2 | 0 | 2 | 0 | 8 | 10 |
| | T3 | 0 | 3 | 1 | 8 | 8 |

| Categorías | IC(MEDIO) | IC(DOSIS) |
|------------|--------------------|-------------------|
| Nada | *** | *** |
| Apical | (-2.070 ; 0.9375)* | (-2.876 ; 0.4556) |
| Basal | (-311.4 ; 289.18) | (-311.4 ; 289.18) |
| A + B | (-1.503 ; 0.3751) | (-1.039 ; 0.8155) |
| Total | (-0.084 ; 1.7054) | (-0.281 ; 1.5023) |

T :tratamientos

T0 :WPM sin modificar + 0.5% hipoclorito de sodio

T1 :WPM sin modificar + 1% hipoclorito de sodio

T2 :WPM modificado + 0.5% hipoclorito de sodio

T3 :WPM modificado + 1% hipoclorito de sodio

A+B :apical + basal

*** :se observaron sólo valores 0's, por lo que no existe efecto del tratamiento.

* :si el valor cero está contenido en el Intervalo de Confianza (IC) la diferencia estimada de proporciones no es significativa, con un 95% de confianza.

ANEXO 11

CURVA PATRON PARA LA DETERMINACION DE SUSTANCIAS FENOLICAS DE SECCIONES NODALES (ENSAYO 4) Y YEMAS AXILARES (ENSAYO 5) DEL CV. 'LULA'.

| (ug/1) | % TRAMITANCIA | ABSORBANCIA |
|--------|---------------|-------------|
| 0 | 100,0 | 0.0000 |
| 10 | 79,0 | 0.1023 |
| 20 | 63,0 | 0.2006 |
| 30 | 51,0 | 0.2924 |
| 35 | 50,0 | 0.3010 |
| 40 | 44,0 | 0.3565 |
| 50 | 35,0 | 0.4559 |
| 60 | 29,0 | 0.5376 |
| 70 | 22,0 | 0.6575 |
| 80 | 18,0 | 0.7447 |
| 100 | 17,0 | 0.7695 |

$$\text{ECUACION : } Y = 127.235 * X - 4.2890$$

ANEXO 12

PORCENTAJE DE SUSTANCIAS FENOLICAS EN BASE AL PESO FRESCO DE SECCIONES NODALES DEL CV. 'LULA'.

| MUESTRA | % T | % A | ug/l (1) | ug/l (2) | PESO FRESCO (g) | % SUSTANCIAS FENOLICAS |
|---------|------|--------|----------|----------|-----------------|------------------------|
| 1 | 25.0 | 0.6021 | 72.3141 | 602.6175 | 0.3360 | 0.3360 |
| 2 | 27.0 | 0.5686 | 68.0614 | 567.1786 | 0.2370 | 0.2393 |
| 3 | 23.0 | 0.6382 | 76.9215 | 641.0130 | 0.2730 | 0.2348 |
| 4 | 27.0 | 0.5686 | 68.0614 | 567.1786 | 0.2130 | 0.2662 |
| 5 | 27.0 | 0.5686 | 68.0614 | 567.1786 | 0.1810 | 0.3133 |
| 6 | 26.0 | 0.5850 | 70.1468 | 584.5573 | 0.3310 | 0.1766 |
| 7 | 23.0 | 0.6382 | 76.9215 | 641.0130 | 0.2130 | 0.3009 |
| 8 | 31.0 | 0.5086 | 60.4276 | 503.5633 | 0.1710 | 0.2944 |
| 9 | 28.0 | 0.5528 | 66.0518 | 550.4321 | 0.1860 | 0.2959 |
| 10 | 27.0 | 0.5686 | 68.0614 | 567.1786 | 0.2040 | 0.2708 |

T : TRAMITANCIA.

A : ABSORBANCIA

ug/l (1) : CONCENTRACION DE MUESTRA DILUIDA (3/25 ml).

ug/l (2) : CONCENTRACION TOTAL DE FENOLES MUESTRA.

PROMEDIO : 0.27358 % SUSTANCIAS FENOLICAS.

ANEXO 13

PORCENTAJE DE SUSTANCIAS FENOLICAS EN BASE AL PESO FRESCO DE LAS YEMAS AXILARES PROVENIENTES DE MATERIAL VEGETAL SIN ETIOLAR DEL CV. 'LULA'.

| MUESTRA | % T | % A | ug/l | PESO FRESCO (g) | % SUSTANCIAS FENOLICAS |
|---------|------|--------|---------|--------------------|---------------------------|
| 1 | 71.0 | 0.1487 | 73.1796 | 0.0060 | 1.2196 |
| 2 | 76.0 | 0.1191 | 54.3806 | 0.0050 | 1.0876 |
| 3 | 68.0 | 0.1674 | 85.1079 | 0.0050 | 1.7021 |
| 4 | 27.0 | 0.5686 | 68.0619 | 0.0045 | 1.5134 |
| 5 | 36.0 | 0.4437 | 52.1651 | 0.0055 | 0.9484 |
| 6 | 34.0 | 0.4685 | 55.3231 | 0.0055 | 1.0058 |
| 7 | 71.0 | 0.1487 | 73.1796 | 0.0080 | 0.9147 |
| 8 | 36.0 | 0.4437 | 52.1651 | 0.0080 | 0.6520 |
| 9 | 38.0 | 0.4202 | 49.1777 | 0.0050 | 0.9835 |
| 10 | 30.0 | 0.5228 | 62.2294 | 0.0045 | 1.3828 |

T : TRAMITANCIA

A : ABSORBANCIA

ug/l : CONCENTRACION DE FENOLES

PROMEDIO : 1.14285% SUSTANCIAS FENOLICAS.

ANEXO 14

PORCENTAJE DE SUSTANCIAS FENOLICAS EN BASE AL PESO FRESCO DE LAS YEMAS AXILARES PROVENIENTES DE MATERIAL VEGETAL ETIOLADO DEL CV. 'LULA'.

| MUESTRA | % T | % A | ug/l | PESO FRESCO (g) | % SUSTANCIAS FENOLICAS |
|---------|------|---------|---------|--------------------|---------------------------|
| 1 | 24.0 | 0.6197 | 74.5699 | 0.0115 | 0.6484 |
| 2 | 29.0 | 0.5376 | 64.1125 | 0.0090 | 0.7123 |
| 3 | 33.0 | 0.4814 | 56.9733 | 0.0080 | 0.7121 |
| 4 | 50.0 | 0.3010 | 34.0125 | 0.0035 | 0.9717 |
| 5 | 61.0 | 0.2146 | 23.0245 | 0.0030 | 0.7674 |
| 6 | 66.0 | 0.1804* | 93.3591 | 0.0150 | 0.6223 |
| 7 | 72.0 | 0.1426* | 69.3180 | 0.0130 | 0.5332 |
| 8 | 64.0 | 0.1938 | 20.3716 | 0.0015 | 1.3581 |
| 9 | 57.0 | 0.2441 | 26.7728 | 0.0020 | 1.3386 |
| 10 | 62.0 | 0.2076 | 22.1262 | 0.0025 | 0.8850 |

T : TRAMITANCIA

A : ABSORBANCIA

ug/l : CONCENTRACION DE FENOLES

PROMEDIO : 0.85496% SUSTANCIAS FENOLICAS.

* : MUESTRA DILUIDA (3/25 ml).

ANEXO 15

