

Establecimiento *in vitro* del portainjertos híbrido 'Garfi x Nemared' para durazno

Limberg Guevara Salguero¹, Giorjan Arnulfo Arancibia Padilla¹, Samuel Sala Limachi¹, Andy Aguilar Flores¹, Faride Tirado Banuz², Rafael Gómez-Kosky³

¹Laboratorio de Biotecnología Agroforestal, Asociación Bolivian Cactus. Cantón Pulquina Abajo, Carretera Vieja a Cochabamba km 256. Comarapa. Departamento Santa Cruz. Bolivia.

²ONG Green Cross Bolivia. Calle 3 este, lado de la Capilla El Carmen Zona Norte. El Remanso, Santa Cruz de la Sierra. Departamento Santa Cruz. Bolivia.

³Instituto de Biotecnología de las Plantas, Universidad Central Marta Abreu de Las Villas. Carretera a Camajuaní km 5,5. Santa Clara. Villa Clara. Cuba. CP 54830.
e-mail: kosky2015@gmail.com

RESUMEN

El híbrido interespecífico 'Garfi x Nemared' (*Prunus dulcis* (Mill) D.A. Webb x *Prunus persica* (L.) Batsch.) ha alcanzado gran importancia como portainjertos para durazno en Bolivia, pero la propagación por métodos tradicionales ha sido difícil. El presente estudio tuvo como objetivo establecer *in vitro* este híbrido. Se emplearon como explantes iniciales segmentos nodales de plantas madre que crecieron en condiciones controladas de cultivo y a las cuales se aplicó pretratamiento con fungicida y fertilizante. Para la desinfección fueron ensayadas dos concentraciones de hipoclorito de sodio (0.5 y 0.75%) y dos tiempos (10 y 12 min). El mayor porcentaje de establecimiento (79.5%) fue logrado con 0.75% de NaClO durante 12 min, en un medio de cultivo MS libre de reguladores del crecimiento. Se alcanzó un 100% de control de la oxidación de los fenoles con la combinación de plantas madre crecidas bajo 50% de sombra, yemas jóvenes, el uso de 150 mg l⁻¹ ácido cítrico al final de la desinfección y en el medio de cultivo y posteriormente colocar los tubos de ensayo con los segmentos nodales una semana en condiciones de oscuridad.

Palabras clave: cultivo de tejidos, híbrido interespecífico, *Prunus*

In vitro establishment of the hybrid rootstock 'Garfi x Nemared' (Garnem) for peach

ABSTRACT

The interspecific hybrid between almond and peach, 'Garfield x Nemared' (*Prunus dulcis* (Mill) D.A. Webb x *Prunus persica* (L.) Batsch.) has become very important as rootstocks for peach in Bolivia, but propagation by traditional methods of this hybrid has been very difficult. In the present study the aim was to *in vitro* establishment of this hybrid. As initial explants, nodal segments from mother plants, growing under controlled culture conditions, were used. For disinfection two concentrations of sodium hypochlorite (0.5 and 0.75%) and time (10 and 12 min) were tested. The greatest percentage of establishment was achieved using 0.75% NaClO for 12 min in an MS culture medium free of growth regulators. A 100% control of the phenols oxidation was achieved with the combination of mother plants growing under 50% shade, young buds, use of 150 mg l⁻¹ citric acid at the end of the disinfection process and into the culture medium and then place the test tubes with the nodal segments one week in the dark.

Key words: interspecific hybrid, *Prunus*, tissue culture

INTRODUCCIÓN

La producción y consumo de frutas a nivel internacional tiende a crecer a un ritmo acelerado de acuerdo con la demanda de los mercados. La producción se centra en países como China e India. A nivel latinoamericano, se

destacan Brasil, Argentina y Chile; de los cuales los dos últimos países son proveedores de frutas frescas a Bolivia (Kempff *et al.*, 2015).

En Bolivia, la producción frutícola se encuentra localizada principalmente en los valles interandinos de los departamentos de La Paz,

Tarija, Chuquisaca, Potosí, Santa Cruz y Cochabamba. Estos valles conforman microrregiones con características de clima y suelo, aptas para la producción de frutales, en particular, el durazno (*Prunus persica*(L.) Batsch.) (Coca, 2011). En el departamento de Santa Cruz, la provincia de Vallegrande es considerada la principal productora de frutales caducifolios y en específico el durazno (Kempff *et al.*, 2015).

El material vegetal que se ha propagado asexualmente para uso de portainjertos de durazno, es el conocido como cultivar 'Criollo'. Sin embargo, en los últimos años es el cv. híbrido 'Garfi x Nemared' (*Prunus dulcis* (Mill) D.A.Webb x *Prunus persica* L. Batsch.), conocido como GxN 15 que gradualmente se está convirtiendo en el principal portainjertos para el durazno en Bolivia debido a las características que presenta de buena adaptación a las condiciones de suelos de los valles, vigor elevado, rápida entrada en producción y tolerancia a la sequía (Centella *et al.*, 2011).

El portainjertos 'GXN 15', llamado también 'Gamem' fue obtenido en España por el Servicio de Investigación Agraria de la Diputación General de Aragón, Zaragoza. Es un híbrido entre almendro (*Prunus dulcis* (Mill) D.A.Webb) y durazno seleccionado entre las plantas originadas por el cruzamiento del 'Garfi x Nemared' (Serie G x N). El árbol es de vigor grande, porte erguido, poco ramificado, con ramas que emiten pocos anticipados. Las hojas son grandes, de aspecto intermedio entre las de almendro y durazno. En primavera tiene un color rojo que durante el verano vira a verde bronceado. Las flores son grandes, de color rosa pálido y los frutos son pequeños, redondeados, de color verde oscuro con tonalidades rojizas, indehiscentes y con hueso libre. Este portainjerto es muy empleado para durazno (*P. persica* (L.) Batsch.), nectarín (*Prunus persica* var. nectarina) y sobre todo para almendro. Es inmune a los nemátodos agalladores (*Meloidogyne* spp.), tolerante a nemátodos lesionadores (*Pratylenchus* spp.) y resistente a asfixia radical (COTEVISA, 2015).

La propagación de este híbrido usando semillas es casi imposible y la propagación vegetativa por métodos convencionales tales como estacas o brotes de ramas a menudo

se asocia con varias dificultades, debido a algunos desórdenes fisiológicos tales como la baja capacidad de enraizamiento (Dejampour *et al.*, 2007). Por tal motivo, el desarrollo de protocolos para la propagación *in vitro* de este híbrido ha sido presentado como un método alternativo para la obtención de este material vegetal.

La micropropagación de patrones *Prunus* y sus varios híbridos interespecíficos como el durazno x almendro, albaricoque (*Prunus armeniaca* L.) x almendro, ciruelo (*Prunus domestica* L.) x almendro y albaricoque x ciruelo se han informado anteriormente (Fotopoulos y Sotiropoulos, 2005; Martinelli, 2005; Espinosa *et al.*, 2006; Dejampour *et al.*, 2007; Kalinina y Brown, 2007).

Estas especies del género *Prunus* presentan en su mayoría una difícil propagación *in vitro*. Por esta característica se les conoce como plantas recalcitrantes (Arab *et al.*, 2014). Battistini y De Paoli (2002) y Cabrera (2003) señalaron que los portainjertos para durazno y el durazno son consideradas especies difíciles de propagar por cultivo de tejidos debido a diversos factores que afectan la adaptación del explante en las condiciones *in vitro*. Entre ellos se mencionan las frecuentes dificultades de oxidación, presencia de inhibidores de crecimiento y sobre todo a la dificultad del enraizamiento.

Battistini y De Paoli (2002) señalaron, además, que a pesar de que en su vivero producen todos los patrones de *Prunus* por micropropagación, cada clon necesita experimentación específica para equilibrar los componentes en el medio de cultivo para optimizar la proliferación de brotes y las raíces y para mejorar el proceso de aclimatización. Aunque la propagación *in vitro* puede ser un método fiable para la propagación clonal masiva de materiales vegetales sanos de nuevos portainjertos, no ha sido intentado en el portainjertos híbrido interespecíficos 'GxN15', hasta el momento en Bolivia según la literatura nacional e internacional consultada.

En la actualidad muchos estudios del cultivo *in vitro* han sido realizados para el propagación *in vitro* del durazno y algunos de sus híbridos interespecíficos como portainjertos, pero existen muy pocos trabajos y algunos de ellos

muy preliminares sobre la serie GxN (Barrios y Percy, 2008; Centellas *et al.*, 2011; Arab *et al.*, 2014; Kelek *et al.*, 2015). A partir de lo anterior el presente trabajo tuvo como objetivo establecer una metodología para el establecimiento *in vitro* de segmentos nodales del portainjerto híbrido 'Garfi x Nemared' a partir de plantas madre cultivadas en un banco de germoplasma *ex situ* en una casa túnel.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Se utilizaron plantas madre en pleno crecimiento del portainjerto híbrido 'Garfi x Nemared Garfi' (*Prunus dulcis* (Mill) D.A.Webb) x durazno Nemared (*Prunus persica* L.) con 4 a 5 meses de cultivo en el Banco de Germoplasma *ex situ* (Figura 1). De estas fueron seleccionadas ramas jóvenes para tomar segmentos nodales que se emplearon como explantes.

Pretratamientos a las plantas madre

Las plantas madre utilizadas para la toma de los segmentos nodales se encontraban en condiciones controladas de cultivo, bajo túnel cerrado con cubierta Agrofilm y malla sombra o Sarán 50%, encima. Estas recibieron aplicaciones previas con el fungicida sistémico Carbendazim (SINOCARB, Sinochem Ningbo

LTD, China) a 0.65 ml l⁻¹ dos semanas antes de la toma de los segmentos nodales.

Además, tres semanas previas antes de la toma de los explantes se aplicó fertilizante foliar AjiFOL® Plus (Compañía Ajinomoto, Perú) a 1.25 ml l⁻¹ y una mezcla de reguladores del crecimiento (500 mg l⁻¹ de 6 bencilaminopurina y 1000 mg l⁻¹ de ácido giberélico) con una frecuencia de una vez por semana.

Toma de los explantes

La toma de los explantes (segmentos nodales) fue realizada en horas tempranas de la mañana. Para el corte se tuvo en cuenta que los segmentos nodales utilizados fueran los comprendidos entre el primer y quinto par de hojas a partir de la yema apical, con un grosor no superior a 0.2 cm. Se les eliminaron las hojas y se dejó solo un pequeño fragmento del peciolo de 3 a 5 mm. Para todo esto se empleó una tijera de podar. Los explantes una vez cortados fueron colocados en frascos de cultivo cerrados con agua destilada para el traslado al laboratorio.

Desinfección

En el laboratorio se realizaron los diferentes pasos del procedimiento de desinfección. Primero se realizó un lavado con agua bajo la llave durante una hora. Luego, se lavaron



Figura 1. Plantas madres del portainjerto Garfi x Nemared de cuatro meses de edad con brotes jóvenes en el Banco de Germoplasma *ex situ* utilizadas para la toma de los segmentos nodales.

con detergente doméstico líquido 'Ola'® (Astrix S.A, Bolivia) del cual se adicionaron de 3 a 5 ml por cada 250 ml de agua. El lavado se realizó durante 30 minutos en agitación, con un agitador magnético y enjuague posteriormente con agua para eliminar el detergente. Posteriormente, los segmentos nodales fueron individualizados con ayuda de una tijera de podar o bisturí. Después se realizó una primera desinfección de los segmentos nodales individuales en recipientes estériles con etanol al 70% durante 30 segundos con agitación manual. A continuación se eliminó el etanol dentro de la cabina de flujo laminar.

Para la etapa final del proceso de desinfección los segmentos nodales fueron colocados en una solución de hipoclorito de sodio (NaClO). Se estudiaron dos tratamientos: 0.5 y 0.75% (v/v) de NaClO, durante un tiempo de exposición de 10 min en agitación (Figura 2).

Después de la desinfección con hipoclorito de sodio, se realizaron tres enjuagues en la cabina de flujo laminar con agua destilada estéril. Los segmentos nodales después de desinfectados fueron colocados en una solución estéril de ácido cítrico a 150 mg l⁻¹.

Una vez realizada la desinfección de los segmentos nodales se siguieron los siguientes pasos para el establecimiento de los explantes, en la cabina de flujo laminar. Se redujo el tamaño del explante de 1 a 2 cm. Para este procedimiento, se eliminaron ambos extremos del segmento porque en esa zona hay un mayor

daño ocasionado por el desinfectante. A continuación se colocaron los segmentos nodales de forma vertical sobre el medio de cultivo en tubos de ensayo de vidrio de 16 x 2 cm, con 10 ml de cultivo semisólido para el establecimiento *in vitro*. Los tubos se taparon con lámina de aluminio de 0.2 μM y después se sellaron con filme plástico de policloruro de vinilo (PVC) (ALPFILM®, ALPES LTDA, San Pablo, Brasil).

El medio de cultivo basal estuvo compuesto por las sales y vitaminas propuestas por Murashige y Skoog (1962) MS al 100% de su concentración (PhytoTechnology Laboratories Co. Kansas, EUA), sacarosa 30 g l⁻¹, ácido cítrico 150 mg l⁻¹, 7 g l⁻¹ de agar (Bacto® Agar, Becton, Dickinson y Co., EUA) y pH 5.7 antes de la esterilización por autoclave. Para la mitad de los explantes de cada tratamiento con NaClO se adicionaron 0.1 mg l⁻¹ de ácido giberélico al medio de cultivo y para el resto se empleó el medio de cultivo basal. Se utilizaron 20 tubos de ensayo como repeticiones por tratamiento con un segmento nodal en cada uno.

Los tubos de ensayo con los segmentos nodales fueron colocados bajo condiciones de oscuridad total a 24 ± 2.0°C durante una semana. Posteriormente se ubicaron en cámara de crecimiento con luz solar con un fotoperiodo de 12 horas luz; a 21 ± 2.0°C, con una densidad de flujo de fotones fotosintéticos (DFFF) entre 25.9 a 69.0 μmol m⁻² s⁻¹.

Las evaluaciones se realizaron a los 15 días de cultivo para las variables número de



Figura 2. Segmentos nodales individualizados en proceso de desinfección con hipoclorito de sodio en un agitador magnético.

segmentos nodales contaminados por microorganismos y con oxidación fenólica. A los 45 días de cultivo se evaluaron las variables número de segmentos nodales vivos, muertos y de los vivos los que brotados. Los datos fueron convertidos a porcentaje.

Se seleccionó la concentración de NaClO que redujo significativamente la contaminación microbiana y que no ocasionó fitotoxicidad a los explantes. El experimento se repitió dos veces en el tiempo.

A partir de los resultados se realizó un nuevo ensayo con mayor tiempo de exposición de los segmentos nodales en la mejor concentración de hipoclorito de sodio (NaClO) en dos tiempos de exposición (10 y 12 minutos). El número de explantes, las condiciones de cultivo y las evaluaciones fueron similares a las descritas anteriormente. El experimento se repitió dos veces en el tiempo.

Análisis estadístico

Para el procesamiento estadístico se utilizó el paquete estadístico STATISTICA versión 12.0 para las variables expresadas en porcentajes, la diferencia entre los valores se determinó mediante la prueba de comparación de proporciones para dos muestras $p < 0.05$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En los tratamientos estudiados no se observó contaminación por hongos. Los resultados alcanzados con la mayor concentración de hipoclorito (0.75%) durante un tiempo de exposición

de 10 minutos permitió reducir la contaminación por bacterias (Tabla 1). Esto demostró la efectividad del pretratamiento a las plantas madre con el fungicida sistémico Carbendazim, dos semanas previas a la toma de los segmentos nodales. Sin embargo, los valores de contaminación por bacterias fueron altos.

El incremento del tiempo de exposición de los explantes en el NaClO en 2 minutos más (12 minutos en total) permitió lograr un 100% de brotes *in vitro* libres de contaminantes microbianos visibles (Tabla 2). Esto demostró la influencia de la especie y sus características botánicas, que pueden permitir o no mayor acumulación de microorganismos, si se compara con resultados similares en otras especies como manzano (*Malus domestica* L.) y ciruelo (*Prunus domestica* L.) (datos no mostrados) en un mayor o menor éxito en el establecimiento *in vitro*.

El establecimiento de plantas leñosas para su cultivo *in vitro* es un paso difícil. Sin embargo, en el presente trabajo fue posible alcanzar resultados positivos. La desinfección de los explantes es esencial para el éxito del cultivo *in vitro*. La contaminación microbiana puede originarse por contaminantes que vienen adheridos a la superficie del explante o por fallas en los procedimientos de laboratorio. El mantenimiento de plantas donadoras bajo condiciones de invernadero o vivero y con pretratamiento con sustancias antimicrobianas disminuyen las pérdidas. Ello permite lograr el establecimiento de cultivos axénicos y fisiológicamente vigorosos con los cuales iniciar el proceso de multiplicación (Cassells, 2011).

Tabla 1. Efecto del empleo de Hipoclorito de Sodio en la desinfección de segmentos nodales del portainjertos 'Garfi x Nemared'.

Solución NaClO (%) (v/v)	Ácido Giberélico (mg l ⁻¹)	Contaminación Bacterias (%)	Explantes Muertos (%)	Explantes Vivos (%)	Explantes Brotados (%)
0.50	0.1	93.3 a	4.05 b	2.65 c	0 c
0.50	0	88.2 a	5.88 b	5.92 b	100 a
0.75	0.1	49.0 b	18.8 a	32.2 a	0 c
0.75	0	53.3 b	15.8 a	30.9 a	66.2 b

Porcentajes con letras distintas en una misma columna difieren significativamente para $p < 0.05$ según la Prueba de proporciones. (n=20)

Tabla 2. Efecto en el establecimiento *in vitro* del portainjerto 'Garfi x Nemared' del tiempo de exposición de los segmentos nodales al Hipoclorito de Sodio (0.75% v/v).

Tiempo (min)	Contaminación Bacterias (%)	Explantos Muertos (%)	Explantos Vivos (%)	Explantos Brotados (%)
10	30.6	19.2 a	50.2 b	62.8
12	0	20.5 a	79.5 a	80.0

Porcentajes con letras distintas en una misma columna difieren significativamente para $p < 0.05$ según la Prueba de proporciones. ($n=40$)

Varios autores se refieren a la importancia del protocolo de desinfección en el establecimiento *in vitro* de especies frutales, lo que hace que varíen los porcentajes de contaminación microbiana. Sin embargo, tratamientos con 0.5-0.75% de NaClO dependiendo del tipo de la especie frutal han sido encontrados efectivos en el control de microorganismos contaminantes (Battistini y De Paoli, 2007). Similares resultados han sido obtenidos en el presente trabajo con 0% de contaminación, muerte del 20.5% y una supervivencia del 79.5%.

Para el establecimiento *in vitro* de especies de *Prunus*, se han utilizado ápices (Theiler-Hedtrich y Feucht, 1985; Deogratias *et al.*, 1986) y secciones nodales de tallo (Couto *et al.*, 2003; Couto *et al.*, 2004) como explantes. Los resultados de estos ensayos están en correspondencia con los informados por otros autores ya que los porcentajes de establecimiento y brotación obtenidos en *Prunus* han sido variables. En este sentido, Couto *et al.* (2003) informaron 15% mientras que Da Silva *et al.* (2003) lograron 63%; Ahmand *et al.* (2003) señalan 55% y Feleket *et al.* (2015) refieren a 87.7%.

El empleo del hipoclorito de sodio como parte final del proceso de desinfección en *Prunus*, ha sido utilizado por diferentes autores. Las concentraciones varían desde 0.25 hasta 5.0% con tiempos entre los 5 a 15 min (Cabrera, 2003; Ahmand *et al.*, 2003; Parada y Villegas, 2009; Vaghiar-Azar *et al.*, 2012; Felek *et al.*, 2015). Las concentraciones y tiempos empleadas en este trabajo se encontraron entre esos valores.

En correspondencia con lo anterior Parada y Villegas (2009) refieren en otro híbrido interespecífico de almendro x durazno (H1) portainjertos potencial obtenido del cruzamiento

de las variedades 'Dulce Marrakech' x 'Flordaguard', que al analizar la efectividad de los tres tiempos de exposición de secciones nodales al hipoclorito de sodio (Cloralex®) al 1.0%, encontraron que este factor únicamente influyó en la incidencia de hongos, y que los tiempos más efectivos fueron 10 y 15 min, con 10 y 9.4% de contaminación respectivamente. Al comparar el desempeño de dos tipos de explantes (ápices y segmentos nodales) al ser expuestos por 5 min al hipoclorito de sodio, se observó que los ápices se contaminaron menos que las secciones nodales, tanto por hongos como por bacterias; esto sugiere que a menor tamaño de explante, menor contaminación. En cuanto a supervivencia y brotación, las secciones nodales del tallo presentaron porcentajes mayores que los ápices. Los ápices murieron en mayor proporción (74.4%) que las secciones nodales. Sin embargo, en este trabajo donde se utilizaron segmentos nodales fue posible controlar la contaminación fúngica y bacteriana.

Por otra parte, Arab *et al.* (2014) utilizaron para el establecimiento *in vitro* del portainjertos 'Garnem' segmentos nodales de plantas jóvenes que crecían en invernadero y realizaron la desinfección en varios pasos con etanol al 70%, pero no emplearon NaClO, sino Bicloruro de mercurio (0.01%) durante 3.5 min. Después de la desinfección realizaron dos lavados de los explantes en una solución de 700 mg l⁻¹ de ácido cítrico y antes de colocarlos en el medio de cultivo los enjuagaron con agua destilada estéril. Estos resultados apoyan en parte los resultados del presente trabajo, aunque, en este caso solo fue necesario utilizar 150 mg l⁻¹ de este antioxidante, pero combinándolo con oscuridad durante siete días y después colocando a la luz los explantes. Sin embargo, estos autores en el trabajo no se refieren a los porcentajes de contaminación microbiana, supervivencia y brotación alcanzados.

Los segmentos nodales sometidos previamente a oscuridad durante una semana, tuvieron un porcentaje de regeneración adecuado, respecto a otros resultados informados en la literatura científica internacional, probablemente, debido a un mayor tenor de auxina endógena, ya que estas son sensibles a la luz, lo que modifica de esta forma el balance auxina/citoquinina y favorece la morfogénesis. Además, influyó en el control de la oxidación de los fenoles, lo que evitó la muerte de los explantes y con ello una mayor brotación. Este es uno de los problemas principales a resolver en el establecimiento *in vitro* del durazno a nivel internacional.

Es de destacar que en ambos ensayos con la combinación de brotes jóvenes de plantas madre que se cultivaron en casa túnel con malla sombra del 50%, la inmersión de los segmentos nodales al final del proceso de desinfección en una solución con el antioxidante ácido cítrico, la incorporación de este en el medio de cultivo y colocar posteriormente los tubos de ensayo con los segmentos nodales durante siete días en condiciones de oscuridad, permitió eliminar en un 100% la exudación de fenoles y la oxidación de estos en la base de los explantes.

Posiblemente la edad del explante también influyó en la liberación de fenoles, ya que tallos con menos edad en formación son menos propensos a la oxidación. Sobre lo anterior, Muhitch y Fletcher (1985) plantearon que tejidos jóvenes son con frecuencia menos propensos al oscurecimiento después de la escisión que otros más viejos, esto lo demostraron en *Rosa* sp. (L.) cv. 'Paul'. También, Duhem *et al.* (1988) informaron que explantes muy jóvenes de cafeto (*Coffea arabica* L.) fueron más proclives a mostrar oxidación fenólica que aquellos tomados de tejidos más viejos. Igualmente, para el caso del durazno cultivar 'Salcajá' las pruebas demostraron que explantes provenientes de material vegetal joven fueron menos susceptibles a oxidarse en comparación con los de mayor tiempo de formación. Estos últimos se ven afectados por las heridas ocasionadas al tejido con lo cual se favorece la oxidación ya que se estimula la respiración. Además, el material vegetal de

mayor edad se encuentra más lignificado y al momento de realizar los cortes se ocasionan heridas innecesarias al ser más difíciles de trabajar debido a su dureza. También se corre el riesgo de que las yemas ya no se encuentren viables o que estas sean de flor y no vegetativas (Cabrera, 2003). En el presente trabajo se tuvo el cuidado de que el material vegetal seleccionado tuviera el mismo tiempo en haberse formado.

Al respecto, varios trabajos señalan el empleo de sustancias antioxidantes durante el proceso de desinfección y después en el medio de cultivo. Por ejemplo, se ha empleado ácido ascórbico, ácido cítrico, carbón activado y polivinilpirrolidona (PVP). En durazno se han alcanzado los mejores resultados con el uso del PVP a 900 mg l⁻¹ y carbón activado a 5 g l⁻¹ lo (Cabrera 2003; Ahmad *et al.*, 2003). Sin embargo, Cabrera (2003) refirió que el ácido cítrico tuvo el menor efecto en el control de la oxidación a concentraciones que variaron entre 50-150 mg l⁻¹ contrario a los resultados del presente trabajo, donde con el empleo de 150 mg l⁻¹ y combinado con el proceso de cultivo de las plantas madre en condiciones de menor intensidad luminosa y una semana a la oscuridad de los segmentos nodales permitió lograr un 100% de control de la oxidación en los explantes (Figuras 3 y 4).

En el medio de cultivo sin ácido giberélico fue donde se alcanzaron los mayores valores de brotación de las yemas *in vitro*. Todo parece indicar que este híbrido posee suficiente giberelina endógena y la aplicación de forma exógena perjudica la formación de brotes. En este sentido, Ahmad *et al.* (2003) señalaron en el híbrido interespecífico 'GF 677' de durazno x almendro el no uso de reguladores del crecimiento en el medio de cultivo para lograr los mejores resultados en la brotación de las yemas lo cual apoya los resultados del presente estudio. También Vaghia-Azar *et al.* (2012) refirieron en otro híbrido del género *Prunus* entre albaricoque x ciruelo los mejores resultados en la brotación con un medio de cultivo sin reguladores del crecimiento. No obstante, otros autores informaron el empleo en el medio de cultivo de la citoquinina 6-bencilaminopurina en concentraciones entre 0.5 y 1.5 mg l⁻¹ (Barrios y Percy, 2008; Arab *et al.*, 2014; Felek *et al.*, 2015).



Figura 3. Segmentos nodales del portainjertos híbrido 'Garfi x Nemared' establecidos *in vitro* sin oxidación fenólica en el medio de cultivo semisólido a los 25 días de cultivo.



Figura 4. Brotes *in vitro* del portainjertos híbrido 'Garfi x Nemared' en tubos de ensayo con medio de cultivo para el establecimiento *in vitro* a los 45 días de cultivo.

CONCLUSIONES

Se pudo lograr el establecimiento *in vitro* de segmentos nodales del portainjertos 'Garnem' con el uso de ramas jóvenes provenientes de plantas madre cultivadas en condiciones controladas bajo 50% de sombra, con la aplicación de pretratamientos previos a la toma de los segmentos nodales de ramas jóvenes, el proceso de desinfección empleado con

hipoclorito de sodio al 0.75% durante 12 minutos, la inmersión en una solución de ácido cítrico (150 mg l^{-1}) sin reguladores del crecimiento y condiciones de oscuridad total durante los primeros siete días de cultivo.

AGRADECIMIENTOS

Al Instituto Nacional de Innovación Agropecuaria y Forestal (INIAF) de Bolivia y a las Alcaldías

de Vallegrande y Comarapa por el financiamiento para hacer posible esta investigación, a través del subproyecto 'Fortalecimiento del sistema de producción frutícola en los municipios de Comarapa y Vallegrande con aplicación de tecnología *in vitro*'.

REFERENCIAS

- Ahmad T, Ur-Rahman H, Ahmed MCH, Laghari MH (2003) Effect of culture media and growth regulators on micropropagation of peach rootstock GF 677. *Pak Journal Botany* 35 (3): 331-338
- Arab MM, Abba SY, Abdolali Sh, Saber Sh, Shores MG (2014) Effects of nutrient media, different cytokinin types and their concentrations on *in vitro* multiplication of G x N15 (hybrid of almond x peach) vegetative rootstock. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology* 12 (2): 81-87; doi: 10.1016/j.jgeb.2014.10.001
- Barrios B, Percy R (2008) Establecimiento *in vitro* del portainjerto de duraznero Garfi x Nemared (G x N-15). Tesis de Grado, Universidad Autónoma Juan Misael Saracho, Tarija, Bolivia
- Battistini A, De Paoli G (2002) Large scale micropropagation of several peach rootstocks. *Acta Hort* 592: 29-33
- Cabrera AM (2003) Efecto de antioxidantes, desinfectantes, medios de cultivo y reguladores del crecimiento, en la propagación *in vitro* del cultivo de yemas axilares de melocotón *Prunus persica* (L.) Batsch var Salcajá. Tesis de Grado, Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala
- Centellas A, Álvarez V, Acuña E, Rocha E, Maita E (2011) Manual de propagación de plantines de duraznero y manzano bajo invernadero. Fundación PROINPA, Cochabamba; ISBN: 978-99954-743-9-3
- Coca MM (2011) La agalla de corona del duraznero en Cochabamba. *Revista de Agricultura Bolivia* 50: 2-8
- COTEVISA (2015) Características del híbrido Gamem. Disponible en: <http://www.cotevisa.com/tecnologia/gamem-g-x-n>. Consultado 25/08/15
- Couto A, Posser C, de Lucas G, Fachinello JC, da Silva JB (2003) Estabelecimento e multiplicação *in vitro* de *Prunus* sp. em diferentes meios de cultivo. *Rev Bras Frutic* 25 (1): 561-563; doi: 10.1590/S0100-29452003000100037
- Couto M, Ucker R, Pedroso de Oliveira R (2004) Estabelecimento *in vitro* de porta-enxertos de *Prunus* sp. *Rev Bras Frutic* 26(3): 561-563; doi: 10.1590/S0100-29452004000300047
- Da Silva DA, Rogalski M, Antunes LK, Felisbino C, Crestani L, Guerra MP (2003) Estabelecimento e multiplicação *in vitro* de porta-enxertos de *Prunus*. *Rev Bras Frutic* 25 (2): 297-300; doi: 10.1590/S0100-29452003000200029
- Dejampour J, Grigourian V, Majidi E, Asgharzade N (2007) Sterilization, establishment and proliferation of some *Prunus* interspecific hybrids for *in vitro* culture. *Journal of Horticultural Science Technology* 8: 165-174
- Deogratias JM, Lutz A, Dosba F (1986) *In vitro* micropropagation of shoot tips from juvenile and adult *Prunus avium* L and *Prunus persica* (L.) Batsch to produce virus free plants. *Acta Horticulturae* 193: 139-144
- Duhem K, Le Mercier N, Boxus P (1988) Difficulties in the establishment of axenic *in vitro* cultures of field collected coffee and cacao germplasm. *Acta Horticulturae* 225: 67-75
- Espinosa AC, Pijut PM, Michler CH (2006) Adventitious shoot regeneration and rooting of *Prunus serotina* *in vitro* cultures *HortScience* 41(1): 193-201
- Fotopoulos S, Sotiropoulos TE (2005) *In vitro* rooting of PR 204/84 rootstock (*Prunus persica* x *P. amygdalus*) as influenced by mineral concentration of the culture medium and exposure to darkness for a period. *Agronomy Research* 3(1): 3-8
- Kalinina A, Brown D (2007) Micropropagation of ornamental *Prunus* spp. and GF 305 peach, a *Prunus* viral indicator. *Plant Cell Reports* 26 (7): 927-935; doi: 10.1007/s00299-007-0315-x
- Kelek W, Mekibib F, Admassu B (2015) Optimization of explants surface sterilization condition for field grown peach (*Prunus persica* (L.) Batsch cv. Garnem) intended for *in vitro* culture. *African Journal of Biotechnology* 14 (8): 657-660; doi: 10.5897/AJB2014.14266
- Kempff SF, Vargas MR, Rivadeneira CF, Barba AL (2015) Panorama y perspectivas de la fruticultura cruceña Ecoregión Valles. Editorial DUI-UAGRM Universidad Autónoma Gabriel Rene Moreno, Santa Cruz de la Sierra; ISBN: 978-99974-51-01-9
- Martinelli A (2005) Factors affecting *in vitro* propagation of the peach-almond hybrids Hansen 2168 and Hansen 538. *Acta Hort* 173: 237-244
- Muhitch M, J Fletcher (1985) Influence of culture age and spd treatment on the accumulation of phenolic

compounds in suspension cultures. Plant Physiology 78: 25-28

Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol Plant 15: 473-497

Parada DP, Villegas AM (2009) Propagación *in vitro* del híbrido almendro x durazno H1. Rev Fitotec Mex 32 (2): 103 – 109

Theiler-Hedtrich CM, Feucht W (1985) Micropropagation of *Prunus cerasus* rootstocks, Influence of culture

medium constituents on growth in stage I and II. Acta Hort 169: 335-340

Vaghiar-Azar E, Vatanpour-Azghandi A, Majidi-Heravan E, Dejampour J, Habashi AA (2012) Micropropagation of two apricot x plum inter specific hybrid rootstocks (HS405 and HS706). Iranian Journal of Genetics and Plant Breeding 1(2): 9-15

Recibido: 16-01-2016

Aceptado: 22-03-2016