

# Enraizamiento *in vitro* del Portainjerto Colt<sup>1</sup>

C. Arjona\*, E. Welkerling de Tacchini\*, G.A. Rosell\*\*

## ABSTRACT

The rooting effects of: a) different auxins, concentrations and exposure periods; b) supporting systems; c) dark treatment; and d) duration of rooting stage were evaluated. Shoots of the sixth and seventh subculture *in vitro* were used. Indolebutyric acid (IBA), indoleacetic acid (IAA) and naphthaleneacetic acid (NAA) allowed to achieve 90-100% of rooted shoots. Even when seven days of exposure to NAA, followed by the culture on a free auxin medium, resulted in the best radical system, it was also possible to obtain good rooting by means of permanent exposure to 0.5 mg l<sup>-1</sup> of NAA, since neither root nor shoot growth was inhibited. Agar at four or seven g l<sup>-1</sup> proved to be better than liquid media or those with vermiculite. Darkness induced less root growth with abundant proliferation of callus. Extending the rooting stage from 26 to 34 and 42 days augmented root length, without showing visible increase in the amount of callus. One thousand plants, produced according to the outcome of this work, could be successfully acclimatized. They had a survival higher than 95% under polyethylene tunnel without mist.

## COMPENDIO

A partir de brotes provenientes del sexto y séptimo subcultivo *in vitro* del portainjerto Colt, se analizaron los efectos sobre el enraizamiento de los siguientes factores: a) diferentes auxinas, concentraciones y tiempos de exposición; b) sistemas de soporte; c) exposición a la oscuridad y d) duración de la etapa de enraizamiento. IBA, IAA y ANA permitieron obtener 90-100% de brotes enraizados. Si bien en siete días de exposición al ANA, seguido del cultivo en medio libre de auxina, se produjo el mejor sistema radical, fue posible obtener un muy buen enraizamiento por la presencia permanente de 0.5 mg l<sup>-1</sup> de ANA, ya que esta última no inhibió el crecimiento de las raíces ni de los brotes. El agar a cuatro o siete g l<sup>-1</sup> resultó superior a los medios líquido o con vermiculita. La oscuridad indujo menor crecimiento de las raíces, con abundante formación de callo. Al extender la duración del enraizamiento de 26 a 34 y 42 días se incrementó la longitud de las raíces sin un aumento aparente en la cantidad de callo. Fue posible la aclimatación de 1 000 plantas producidas según las condiciones resultantes de este trabajo, con una sobrevivencia superior al 95% bajo un túnel de polietileno y sin necesidad de nebulización.

## INTRODUCCION

**C**olt es un portainjerto semiestándar para cerezo y guindo, con resistencia al cancro bacteriano algo mayor que el F 12/1

Por su origen híbrido (*Prunus avium* x *Prunus pseudocerasus*), se hace necesaria la propagación agámica. La micropropagación ha sido estudiada por Wilkins y Dodds (10) y por Ochatt y Caso (6). Los dos primeros autores observaron un escaso crecimiento de los vástagos cuando el enraizamiento *in vitro* se producía en presencia de medios ricos en auxinas, mientras que en medios ricos en citocininas se obtenía un vigoroso enraizamiento luego de seis a diez semanas. Ochatt y Caso (6) consideraron conflictivos estos resultados, señalando que los brotes continúan su crecimiento aún en el medio de enraizamiento con auxina. No obstante ellos tuvieron que usar la laborio-

sa técnica del enraizamiento en medio líquido sobre puente de papel para superar el 70% de enraizamiento.

El objetivo del presente trabajo es evaluar algunas de las condiciones que regulan las características del enraizamiento *in vitro* de Colt, con el fin de obtener una forma de producción masiva de plantas micropropagadas con un sistema radical que facilite la aclimatación post-trasplante.

## MATERIALES Y METODOS

Como material se emplearon brotes elongados de tres o cuatro nudos del portainjerto Colt, provenientes del sexto y séptimo subcultivo *in vitro*, siguiendo las condiciones descritas por Ochatt y Caso (6), excepto en el último subcultivo donde la densidad de flujo de fotones fotosintéticos fue de 45  $\mu$  moles m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>.

Todos los ensayos se llevaron a cabo en el medio de Murashige y Skoog (5), pero con las sales mine-

1 Recibido para publicación el 21 de octubre de 1988.

\* Cátedra Fruticultura-Facultad de Ciencias Agrarias-Universidad Nacional de Cuyo.

\*\* Gerente Técnico-GARBI Biotecnología

rales a la mitad de su concentración. Se adicionaron 20 g l<sup>-1</sup> de sacarosa y varias auxinas en concentraciones variables desde 0.1 hasta 10 mg l<sup>-1</sup>. El pH se ajustó a 5.7 antes de la esterilización.

Se utilizaron recipientes de vidrio de 150 ml de capacidad con 50 ml de medio, excepto para los medios líquidos en que se agregaron 6 ml de medio por tubo de ensayo de 90 mm x 20 mm, esterilizándose en autoclave a una presión de 0.101 MPa durante 20 minutos.

Excepto mención específica de lo contrario, se usaron medios solidificados con 4 g l<sup>-1</sup> de agar y con una concentración de ácido naftalenacético (ANA) de 0.5 mg l<sup>-1</sup>. Las condiciones de cultivo fueron: 16 h luz/8 h oscuridad, con una densidad de flujo de fotones fotosintéticos de 140 μ moles m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> y a una temperatura de 25°C. Los ensayos tuvieron una duración de 26 días.

#### Ensayo 1. Selección de la auxina

Se probó el efecto del ácido indolacético (AIA), ácido naftalenacético (ANA) y ácido indolbutírico (AIB), a las concentraciones de 0.1, 0.5 y 1.0 mg l<sup>-1</sup>, con el fin de seleccionar la auxina a utilizar en los ensayos 2 a 5.

#### Ensayo 2. Sistema de soporte

Se ensayaron cuatro alternativas:

- 4 g l<sup>-1</sup> de agar Sigma
- 7 g l<sup>-1</sup> de agar Sigma
- Vermiculita
- Medio líquido sin puente de papel

Sólo para el tratamiento d) cada brote se colocó en un tubo de ensayo, quedando su porción basal inmersa en el medio.

#### Ensayo 3. Efecto de la oscuridad

Al inicio de la fase de enraizamiento se sometieron los cultivos a cero, tres y siete días de oscuridad. Luego se mantuvieron en las condiciones de cultivo antes señaladas hasta completar 26 días.

#### Ensayo 4. Duración de la etapa de enraizamiento

Los brotes fueron comparativamente cultivados durante 26, 34 y 42 días.

#### Ensayo 5. Concentraciones y tiempos de exposición al ANA

Se utilizaron las combinaciones que se detallan en el Cuadro 1.

En el ensayo 1 se tuvo en cuenta el porcentaje de brotes enraizados y en los ensayos 2 a 5 se determinaron las siguientes variables:

- Porcentaje de brotes enraizados
- Número de raíces por brote enraizado
- Sumatoria de las longitudes de las raíces por brote enraizado
- Pesos secos del vástago y de la raíz. (Se calculó la relación vástago/raíz)
- Número de días para alcanzar el 50% de brotes enraizados
- Presencia de callo y de raíces secundarias

La unidad experimental consistió en cuatro brotes por frasco, utilizándose seis repeticiones por tratamiento. Los resultados fueron sometidos al análisis de la variancia y el test de Duncan.

## RESULTADOS

**Ensayo 1.** El efecto de las auxinas sobre el porcentaje de brotes enraizados (90-100%) fue el mismo en las tres concentraciones probadas.

Sobre la base de estos resultados y de los obtenidos por Ochatt y Caso (6) se seleccionó para los restantes ensayos el ANA.

Cuadro 1. Tiempos de exposición y concentraciones de ANA seleccionadas.

Concentración (mg l <sup>-1</sup> )	Tiempos de exposición a la auxina			
	1 hora	3 días	7 días	26 días
0.1				X
0.5	X	X	X	X
1.0				X
10.0	X			

Los tratamientos de 1 hora, 3 días y 7 días se transfirieron posteriormente a medios sin auxina hasta completar los 26 días.

Cuadro 2. Efecto del sistema de soporte sobre el enraizamiento del portainjerto Colt.

Soporte	Enraizamiento (%)	Raíces		Vástago/Raíz (peso seco)	Callo	Raíces secundarias
		Número	Σ longitud (cm)			
P*	5%	5%	1%	1%		
Agar 4 g l <sup>-1</sup>	100 a	12 a	84 a	0.93 a	+	°
Agar 7 g l <sup>-1</sup>	100 a	12 a	78 a	1.02 a	+	°
Vermiculita	75 a	7 a	11 b	2.83 b	++	-
Líquido	79 a	12 a	22 b	3.90 b	++	-

\* Valores de una columna acompañados por las mismas letras no difieren entre si para P = 0.05 y 0.01

Callo: + Escaso; ++ Moderado

Raíces secundarias: ° presencia; - ausencia

**Ensayo 2.** El sistema de soporte no ejerció influencia sobre el porcentaje de enraizamiento y el número de raíces/planta (Cuadro 2). No obstante, los medios solidificados con agar tuvieron mayor crecimiento de las raíces, presencia de raíces secundarias, escasa cantidad de callo y una menor relación vástago/raíz que los medios al estado líquido o con vermiculita. Las plantas obtenidas en medios líquidos presentaron severos síntomas de vitescencia.

**Ensayo 3.** No hubo diferencias en el porcentaje de enraizamiento, número de raíces/planta y relación vástago/raíz, entre los tratamientos de cero, tres y siete días de oscuridad (Cuadro 3). La exposición a la oscuridad por tres y siete días produjo una reducción en la sumatoria de la longitud de las raíces, con una abundante formación de callo. En todos los casos hubo presencia de raíces secundarias.

**Ensayo 4.** No se presentaron diferencias en el porcentaje de enraizamiento, ni en el número de raíces, entre los 26, 34 y 42 días de duración de la etapa de enraizamiento (Cuadro 4).

Al prolongar la fase de enraizamiento a 34 y 42 días se produjo una tendencia a incrementar el tamaño de las raíces y a disminuir la relación vástago/raíz, sin un aumento aparente en la cantidad de callo.

**Ensayo 5.** Todas las combinaciones de tiempos y concentraciones de ANA ensayadas resultaron en un elevado porcentaje de enraizamiento (88-100%), sin diferencias significativas entre ellas.

La exposición por 26 días a concentraciones de 0.1 hasta 1.0 mg l<sup>-1</sup> de ANA no alteró la longitud total de las raíces (Cuadro 5). Si bien 1 mg l<sup>-1</sup> de

Cuadro 3. Efecto de diferentes tiempos de exposición a la oscuridad sobre el enraizamiento del portainjerto Colt.

Días en oscuridad	Enraizamiento (%)	Raíces		Vástago/Raíz (peso seco)	Callo	Raíces secundarias
		Número	Σ longitud (cm)			
P*	5%	5%	1%	5%		
0	100 a	12 a	84 a	0.93 a	+	°
3	96 a	11 a	49 b	1.21 a	+++	°
7	100 a	10 a	46 b	1.68 a	+++	°

\* Valores de una columna acompañados por las mismas letras no difieren entre si para P = 0.05 y 0.01.

Callo: + Escaso; +++ Abundante

Raíces secundarias: ° presencia

ANA incrementó el número de raíces por planta, con una baja relación vástago/raíz, estas resultaron sumamente quebradizas y con mayor cantidad de callo.

Aunque 0.1 y 0.5 mg l<sup>-1</sup> de ANA generalmente no presentaron diferencias significativas entre sí, esta última concentración tendió a manifestar un mayor crecimiento del sistema radical y fue la única en la que se observaron raíces secundarias.

Cuando se expusieron los brotes a 0.5 mg l<sup>-1</sup> de ANA durante diferentes tiempos (Cuadro 6), se observó que el tratamiento por siete días resultó en un mayor número de raíces que los tratamientos de tres y 26 días y con una elevada sumatoria de la longitud de las raíces/planta. Los menores números de raíces y sumatoria de la longitud de las raíces y la mayor relación vástago/raíz, correspondieron al tratamiento de una hora. El incremento de la concentración de ANA a 10 mg l<sup>-1</sup> durante una hora, permitió revertir estos últimos valores (Cuadro 7). En los menores tiempos de exposición a la auxina no se formó callo.

#### DISCUSION

En nuestros ensayos fue posible obtener de un 90 a un 100% de enraizamiento de brotes en una amplia variedad de condiciones. Esto contrasta con lo citado por Ochatt y Caso (6), aún cuando para el establecimiento y la multiplicación del material se emplearon los medios de cultivo descritos por ellos. Dichas diferencias podrían atribuirse a condiciones fisiológicas distintas en los brotes utilizados para las pruebas de enraizamiento, posiblemente asociadas a diferencias en el número de subcultivos y a los niveles de iluminación. El efecto de las condiciones previas al

enraizamiento sobre la tasa de enraizamiento y calidad de las raíces ha sido señalado para *P. avium*, *P. cerasus* y portainjertos enanizantes para el cerezo (2).

Varios trabajos señalan que la exposición a la oscuridad al inicio de la etapa de enraizamiento mejora el porcentaje de enraizamiento y/o el número de raíces por planta, en numerosas especies frutales de difícil enraizamiento *in vitro* (1, 2, 3, 4, 7, 8, 11). Sin embargo en nuestros ensayos se alcanzó el 100% de enraizamiento sin la exposición a la oscuridad, mientras que los tratamientos de tres o siete días en oscuridad resultaron detrimentales ya que no se aumentó el número de raíces/planta, se redujo el crecimiento de las raíces y hubo formación de abundante callo en la base de las estacas. De forma similar, Druart (2) para cerezos y guindos, señaló que en presencia de riboflavina y por acción de la luz, las raíces se alargan y el callo friable de la base de las estacas es fuertemente limitado.

De los sistemas de soporte ensayados, el agar resultó ser el más efectivo y el de más fácil manipulación. Los medios líquidos y con vermiculita presentaron un muy reducido crecimiento de las raíces. Esto, sumado al aspecto vítreo de las plantas provenientes de medio líquido, dificultó mucho la aclimatación.

ANA, AIB y AIA resultaron igualmente efectivas para la promoción del enraizamiento.

En todas las experiencias con ANA se obtuvo similar porcentaje de enraizamiento pero con importantes diferencias en la calidad del sistema radical. Alrededor de los nueve días, todos los tratamientos alcanzaron

Cuadro 4. Efecto de la duración de la etapa de enraizamiento sobre el enraizamiento del portainjerto Colt.

Tiempo (días)	Enraizamiento (%)	Raíces		Vástago/Raíz (peso seco)		Callo	Raíces secundarias
		Número	Σ longitud (cm)	5%	1%		
P*	5%	5%	1%	5%	1%		
26	100 a	12 a	84 a	0.93 a	a	+	°
34	100 a	13 a	177 b	0.77 ab	a	+	°
42	96 a	14 a	222 b	0.68 b	a	+	°

\* Valores de una columna acompañados por las mismas letras no difieren entre sí para P = 0.05 y 0.01.

Callo: + Escaso

Raíces secundarias: ° presencia

Cuadro 5. Efecto de la exposición durante 26 días a distintas concentraciones de ANA sobre el enraizamiento del portainjerto Colt.

Concentraciones (mg l <sup>-1</sup> )	Enraizamiento (%)	Raíces		Vástago/Raíz (peso seco)	Callo	Raíces secundarias
		Número	Σ longitud (cm)			
P*	5%	1%	5%	1%		
0.1	88 a	10 a	64 a	1.57 a	-	-
0.5	100 a	12 a	84 a	0.93 b	+	°
1.0	100 a	18 b	71 a	0.64 b	++	-

\* Valores de una columna acompañados por las mismas letras no difieren entre sí para P = 0.05 y 0.01

Callo: - Nulo; + Escaso; ++ Moderado

Raíces secundarias: - ausencia; ° presencia

el 50% de brotes enraizados, notándose la reactivación del crecimiento de los brotes a los 15 días de puestos en cultivo. Este crecimiento en presencia de auxina, coincide con lo publicado por Ochatt y Caso (6) pero difiere de lo observado en Colt por Wilkins y Dodds (10) y por Snir (9) en guindos.

Con 1 mg l<sup>-1</sup> de ANA permanente en el medio se observó una inhibición parcial del crecimiento de las raíces. Además, éstas resultaron muy frágiles para su manejo durante el trasplante. Con 0.5 mg l<sup>-1</sup> no hubo inhibición aparente del crecimiento de las raíces, ya que la longitud media de cada raíz (sumatoria de la longitud de las raíces/número de raíces) fue similar a la obtenida por la exposición permanente a una menor concentración de ANA (Cuadro 7) y a las exposiciones a 0.5 y 10 mg l<sup>-1</sup> de ANA durante una hora a siete días (Cuadros 6 y 7). Es más, cuando se

prolongó la duración de la etapa de enraizamiento, las raíces continuaron su crecimiento (Cuadro 4). Por ello y por la presencia de raíces secundarias se consideró que para las exposiciones permanentes, 0.5 mg l<sup>-1</sup> fue la concentración de ANA más apropiada, coincidiendo con los resultados obtenidos por otros autores (6, 9).

Si bien la exposición a la auxina durante siete días produjo el mejor sistema radical, cabe destacar que esta práctica es costosa en mano de obra y medios de cultivo. Teniendo en cuenta los resultados precedentes, se considera que es posible obtener a menores costos un muy buen crecimiento *in vitro* del sistema radical, por la presencia permanente de la auxina en el medio de cultivo a concentraciones relativamente bajas

Cuadro 6. Efecto de diferentes tiempos de exposición a una concentración de 0.5 mg l<sup>-1</sup> de ANA sobre el enraizamiento del portainjerto Colt.

Tiempo	Enraizamiento (%)	Raíces				Vástago/Raíz (peso seco)	Callo	Raíces secundarias
		Número		Σ longitud (cm)				
P*	5%	5%	1%	5%	1%	1%		
1 hora	100 a	8 a	a	49 a	a	3.23 a	-	°
3 días	100 a	13 b	a	96 bc	b	1.21 b	-	°
7 días	96 a	19 c	b	111 c	b	1.09 b	+	°
26 días	100 a	12 b	a	84 b	b	0.93 b	+	°

\* Valores de una columna acompañados por las mismas letras no difieren entre sí para P = 0.05 y 0.01.

Callo: - Nulo; + Escaso.

Raíces secundarias: ° presencia.

Fue posible la aclimatación de 1 000 plantas producidas según las condiciones resultantes de este trabajo, con un porcentaje de sobrevivencia superior al

95% , bajo un tunel de polietileno y sin necesidad de nebulización.

Cuadro 7. Efecto de la exposición durante una hora a dos concentraciones de ANA sobre el enraizamiento del portainjerto Colt.

Concentra- ciones (mg l <sup>-1</sup> )	Enraiza- miento (%)	Raíces				Vástago/ Raíz (peso seco)	Callo	Raíces secundarias
		Número		Σ longitud (cm)				
P*	5%	5%	1%	5%	1%	1%		
0.5	100 a	8 a	a	49 a	a	3.23 a	-	°
10.0	95 a	12 b	a	75 b	a	1.69 b	-	°

\* Valores de una columna acompañados por las mismas letras no difieren entre sí para P = 0.05 y 0.01

Callo: - Nulo

Raíces secundarias: ° presencia

#### LITERATURA CITADA

- DRUART, P.; KEVERS, C.; BOXUS, P.; GASPAR, T. 1982. *In vitro* promotion of root formation by apple shoots through darkness effect on endogenous phenols and peroxydases. *Zeitschrift Pflanzenphysiologie* 108:129-436.
- DRUART, P. 1985. Multiplication conforme de sujets portegreffé et de variétés de cérisiers para la culture *in vitro*. *Acta Horti* 169:319-328.
- HAMMERSCHLAG, F. 1982. Factors influencing *in vitro* multiplication and rooting of the plum rootstock Myrobalan (*Prunus cerasifera* Ehrh.) *Journal of the American Society for Horticultural Science* 107(1):44-47.
- JAMES, D. I. 1983. Adventitious root formation *in vitro* in apple rootstocks (*Malus pumila*) I. Factors affecting the length of the auxin-sensitive phase in M 9. *Physiologia Plantarum* 57:149-153.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15:473-497.
- OCHATT, S. J.; CASO, O. H. 1984. Cultivo *in vitro* de ápices caulinares de portainjertos de frutales leñosos (Rosaceae). I. Micropropagación de cerezos cv Colt y el F 12/1. *Revista de Investigaciones Agropecuarias (Arg.)* 19(2):241-250.
- REEVES, D. W.; COUVILLON, G. A.; HORTON, B. D. 1985. Effect of gibberellic acid (GA<sub>3</sub>) on elongation and rooting of "St Julien A" rootstock *in vitro*. *Scientia Horticulturae* 26:253-259.
- RUGINI, E.; VERMA, D. C. 1982/83. Micropropagation of difficult-to-propagate almond (*Prunus amygdalus*, Bastch) cultivar. *Plant Science Letters* 28:273-281.
- SNIR, I. 1983. A micropropagation system for sour cherry. *Scientia Horticulturae* 19:85-90.
- WILKINS, C. P.; DODDS, J. H. 1982/83. Effect of various growth regulators on growth *in vitro* of cherry shoot tips. *Plant Growth Regulation* 1(3): 209-216.
- ZIMMERMAN, R. H. 1984. Rooting apple cultivars *in vitro*: interaction among light, temperature, phloroglucinol and auxin. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 3:301-311.