

## Propagación *in vitro* de manzano a partir de embriones cigóticos maduros

Juan Pablo Cabral-Miramontes<sup>1</sup>  
Jorge Armando Chávez-Simental<sup>2§</sup>  
Cecilia Pulido-Díaz<sup>2</sup>  
Manuel González-Portillo<sup>3</sup>  
José Rodolfo Goche-Télles<sup>4</sup>  
Víctor Manuel Barragán-Hernández<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Maestría Institucional en Ciencias Agropecuarias y Forestales-Universidad Juárez del Estado de Durango. Durango, México. (juan.cabralmiramontes@gmail.com). <sup>2</sup>Instituto de Silvicultura e Industria de la Madera-Universidad Juárez del Estado de Durango. Durango, México. (ceccy.ndd@hotmail.com; vmbh70@yahoo.com.mx). <sup>3</sup>Facultad de Ciencias Químicas-Universidad Juárez del Estado de Durango. Durango, México. (mgportillo2000@yahoo.com). <sup>4</sup>Facultad de Ciencias Forestales-Universidad Juárez del Estado de Durango. Durango, México. (jgoche@ujed.mx).

§Autor para correspondencia: jorge.chavez@ujed.mx.

### Resumen

El municipio de Nuevo Ideal es una de las regiones más importantes para la producción de manzana en el estado de Durango, México. Existen árboles dispersos de *Malus domestica* de huertos extintos que fueron parte de un sistema de producción y que hoy están abandonados sin manejo agronómico, pero que han mostrado una adaptabilidad eficiente a las condiciones y continúan produciendo fruto de buena calidad. El objetivo del presente estudio fue desarrollar un protocolo de propagación *in vitro* de *M. domestica* utilizando semillas de árboles asilvestrados de esta región. Se evaluó la germinación y producción de brotes adventicios usando medios de cultivo murashige & skoog (MS) y woody plant medium (WPM) complementados con fitohormonas 6-Bencilaminopurina (BAP) y ácido indol butírico (IBA) en diferentes dosis. Para el enraizamiento se utilizó también ácido indol acético (AIA), ácido naftalenacético (ANA) y kinetina (KIN) en combinación con las anteriores. La germinación y formación de brotes obtuvo mejor resultado con la concentración de 0.5 mg L<sup>-1</sup> de BAP en el medio MS a los 60 días. En el desarrollo foliar destacó el tratamiento con 1.5 mg L<sup>-1</sup> BAP en medio MS con 21.07 hojas en promedio. Las plantas de todos los tratamientos presentaron raíz, sin embargo, el mejor desarrollo lo presentó el tratamiento con 1.5 mg L<sup>-1</sup> de ANA y 0.15 mg L<sup>-1</sup> de BAP en medio WPM. Mediante el protocolo generado en esta investigación, es posible propagar masivamente la especie *M. domestica* con propósitos de conservación de germoplasma y posterior explotación del cultivo.

**Palabras clave:** cultivo de tejidos vegetales, micropropagación de frutales, vitroplantas.

Recibido: marzo de 2022

Aceptado: mayo de 2022

## Introducción

En el estado de Durango existen 48 486 ha destinadas a cultivos perennes, de las cuales 13.33% son dedicadas a la producción de manzana, lo que coloca a este cultivo perenne en el tercer lugar de importancia después de la alfalfa verde y la nuez. En 2019, la superficie cosechada de manzana obtuvo una producción total de 21 020 t de diferentes cultivares como: Delicious, Starking, Doble red, Top red, Winter banana y Winter pearmain, concentradas principalmente en los municipios de Canatlán, Nuevo Ideal y Santiago Papasquiari (FAO, 2014; SIAP, 2019).

La micropropagación de cultivos perennes y transitorios ha contribuido al desarrollo de la producción agronómica de las últimas décadas. Gracias a esta técnica se pueden generar clones de variedades destacadas en grandes cantidades y beneficios adicionales (Hoyos *et al.*, 2008). La técnica organogénesis *in vitro* es un proceso donde se producen, órganos, yemas, brotes y raíces a partir de tejidos vegetales cultivados en un medio artificial de composición química definida y se incuban en condiciones ambientales controladas (Zhao *et al.*, 2008; Levitus *et al.*, 2010).

De acuerdo con Dobránszki y Teixeira Da Silva (2010) citado por Teixeira da Silva *et al.* (2019), la propagación *in vitro* de manzano, como en otras especies, incluye cuatro etapas; la primera etapa consiste en el establecimiento *in vitro* de cultivos a partir de tejido vivo de plantas donantes. En esta etapa es importante considerar las condiciones fitosanitarias de la planta donante, ya que puede contener agentes causantes de contaminación, aunado a que la selección del tejido vegetal a utilizar debe tener un óptimo estado fisiológico debido a la capacidad de totipotencia y diferenciación de tejidos. La etapa dos se refiere a la regeneración o multiplicación de brotes adventicios. En especies leñosas como el género *Malus* es común la oxidación de tejidos, presentando ennegrecimiento de células, tejido y órganos vegetales.

Cuando se efectúan cortes en el explante, se produce un estrés oxidativo ocasionado por el metabolismo del oxígeno que produce radicales libres conocidos como especies de oxígeno reactivo (ROS) por sus siglas en inglés y estos a su vez se pueden generar en otras organelas celulares, como los peroxisomas y los lisosomas, a consecuencia de los cortes realizados en los explantes que ocasionan la oxidación en el área del corte (Azofeifa, 2009). En esta etapa es donde se genera gran cantidad de clones libres de enfermedades en un periodo corto de tiempo, por lo tanto, superar esta etapa *in vitro* es de vital importancia (Pancaningtyas, 2015).

La etapa tres consiste en el enraizamiento de los brotes lo cual determina el éxito y supervivencia de las plantas por la absorción de nutrientes y la estabilidad que proporciona a los especímenes, y finalmente la etapa cuatro que consiste en aclimatar las plantas generadas *in vitro* y su establecimiento en un ambiente abierto para ser plantadas en campo, que consiste en someter la planta de un ambiente aséptico a simulación de un ambiente endémico (Tandon *et al.*, 2021).

El establecimiento de protocolos de multiplicación masiva para diferentes especies de frutales mediante embriogénesis de cigotos maduros a partir de semilla es una alternativa donde es frecuente utilizar reguladores de crecimiento (auxinas/citoquininas) para promover el desarrollo vegetativo (Dobránszki y Teixeira Da Silva, 2010). Sin embargo, las técnicas *in vitro* son de alto costo al precisar mano de obra calificada, al igual que el equipo específico y el alto costo del material vegetal, por lo que la eficacia de cualquier protocolo de propagación *in vitro* debe optimizarse y mejorarse siempre que sea posible (Teixeira *et al.*, 2019).

En Nuevo Ideal, Durango, existen ejemplares de esta especie considerados como ‘asilvestrados’ debido a que proceden de material vegetal selecto de huertas que fueron productivas durante varios años y ahora están abandonados. Los árboles que aún existen de manera muy dispersa muestran adaptación a las condiciones donde se ubican sin ningún tipo de manejo agronómico como fertilización, riego, poda entre otros, y aun presentan una producción aceptable de manzana de buena calidad que incluso, en ocasiones supera la calidad de los huertos actualmente en producción.

Por lo anterior, en aras de conservar la calidad genética de esta especie, el presente estudio se desarrolló con el objetivo de generar un protocolo eficiente como estrategia para la conservación y propagación *in vitro* de *Malus domestica* utilizando como material inicial semillas provenientes de estos árboles de la región de Nuevo Ideal, Durango.

## Materiales y métodos

Este trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio de Genética y Producción de Planta del Instituto de Silvicultura e Industria de la Madera de la Universidad Juárez del Estado de Durango.

### Material vegetal

El manzano es comúnmente propagado a través de técnicas como enraizamiento de estacas o esquejes, injertos entre otras; sin embargo, se decidió implementar la técnica de cultivo de tejidos vegetales debido a la lejanía de los árboles donantes y la dificultad de dar seguimiento a cualquiera de las técnicas mencionadas. Con esta técnica se pueden emplear diferentes fuentes de material vegetal como yemas, explantes entre otras, no obstante, en la presente investigación se optó por el uso de embriones cigóticos maduros a partir de la semilla.

La obtención de material vegetal se realizó a partir de la selección de frutas de manzano (*Malus domestica*) con características fenotípicas deseadas, visiblemente sanas y sin plagas, recolectadas de árboles asilvestrados del municipio de Nuevo Ideal, Durango durante la época de cosecha del año 2015. Se extrajeron las semillas en laboratorio y se mantuvieron en refrigeración a una temperatura de 4 °C en frascos estériles cerrados herméticamente. Para su establecimiento en medio de cultivo, previamente la semilla fue desinfectada con etanol al 70%, hipoclorito de sodio al 20% y agua destilada estéril. El experimento se desarrolló en dos fases: a) germinación y producción de brotes; y b) enraizamiento.

### Germinación y producción de brotes

Se efectuó un corte sobre la parte longitudinal de la testa de la semilla, para en seguida retirar el tegmen y dejar el embrión y cotiledones expuestos en contacto directo con el medio de cultivo. Se propusieron 14 tratamientos compuestos por 25 repeticiones cada uno, para evaluar la germinación y la producción de brotes adventicios, para lo cual se utilizaron los medios de cultivo Murashige y Skoog, (1962) (MS) y el woody plant medium (WPM) (Mc Cown y Lloyd, 1981), complementados con reguladores de crecimiento como 6-Bencilaminopurina (BAP) como citocinina y ácido indol butírico (IBA) como auxina en diferentes dosis. Se consideraron dos tratamientos testigo, uno de cada medio de cultivo sin la adición de reguladores de crecimiento (T1 y T8) (Cuadro 1). Se añadió al medio de cultivo 25 g L<sup>-1</sup> de sacarosa y 5.5 g L<sup>-1</sup> de agente gelificante (agar) ajustando el pH a 5.7 antes de ser esterilizados en autoclave durante 20 min a 115 °C y 1.5 kg cm<sup>-2</sup>.

**Cuadro 1. Tratamientos evaluados en la germinación y producción de brotes *in vitro* de *Malus doméstica*.**

Tratamiento	Medio de Cultivo	BAP (mg L <sup>-1</sup> )	IBA (mg L <sup>-1</sup> )
T1	MS	-	-
T2	MS	0.5	-
T3	MS	1.5	-
T4	MS	-	0.5
T5	MS	-	1.5
T6	MS	0.5	0.5
T7	MS	1.5	1.5
T8	WPM	-	-
T9	WPM	0.5	-
T10	WPM	1.5	-
T11	WPM	-	0.5
T12	WPM	-	1.5
T13	WPM	0.5	0.5
T14	WPM	1.5	1.5

El establecimiento se realizó bajo condiciones asépticas utilizando una cámara de flujo laminar e instrumentos estériles. Los embriones se colocaron en frascos de vidrio con 25 ml de medio de cultivo correspondiente a los tratamientos. Posteriormente se trasladaron a la cámara de cultivo en condiciones de oscuridad durante los primeros siete días, a partir del día ocho, se sometieron a un fotoperiodo de 16 h luz y ocho h de oscuridad a una temperatura constante de  $25 \pm 2$  °C. Las variables evaluadas en esta etapa fueron: porcentaje de germinación, número de brotes, altura de la plántula (mm), desarrollo foliar (número de hojas) y diámetro del tallo (mm) mediante análisis morfológico aplicando la técnica de análisis de imagen descrita por González *et al.* (2005).

### Enraizamiento

A los 60 días, los brotes producidos en la etapa anterior fueron llevados a la fase de enraizamiento. Se establecieron en medio de cultivo MS y WPM reducido al 50% de sus nutrientes como describe Guadie (2011), adicionados con diferentes dosis de reguladores de crecimiento a base de auxinas y citoquininas como: ácido naftalenalacético (ANA), ácido indol acético (AIA) y ácido indol butírico (IBA), con o sin combinación con citoquininas: 6- bencil aminopurina (BAP) y kinetina (KIN). Se consideraron dos tratamientos testigo, uno de cada medio de cultivo sin la adición de reguladores de crecimiento (T1 y T8) (Cuadro 2). Las variables evaluadas fueron: porcentaje enraizamiento y longitud de raíz (mm) mediante análisis morfológico a los 30 días de iniciada esta fase.

**Cuadro 2. Tratamientos evaluados para el enraizamiento *in vitro* de *Malus domestica*.**

Tratamiento	Medio de cultivo	ANA (mg L <sup>-1</sup> )	BAP (mg L <sup>-1</sup> )	AIA (mg L <sup>-1</sup> )	IBA (mg L <sup>-1</sup> )	KIN (mg L <sup>-1</sup> )
T1	MS	-	-	-	-	-
T2	MS	0.5	0.05	-	-	-
T3	MS	1.5	0.15	-	-	-
T4	MS	-	-	-	0.5	0.05
T5	MS	-	-	-	1.5	0.15
T6	MS	-	-	0.5	-	0.05
T7	MS	-	0.15	1.5	-	-
T8	WPM	-	-	-	-	-
T9	WPM	0.5	0.05	-	-	-
T10	WPM	1.5	0.15	-	-	-
T11	WPM	-	-	-	0.5	0.05
T12	WPM	-	-	-	1.5	0.15
T13	WPM	-	-	0.5	-	0.05
T14	WPM	-	0.15	1.5	-	-

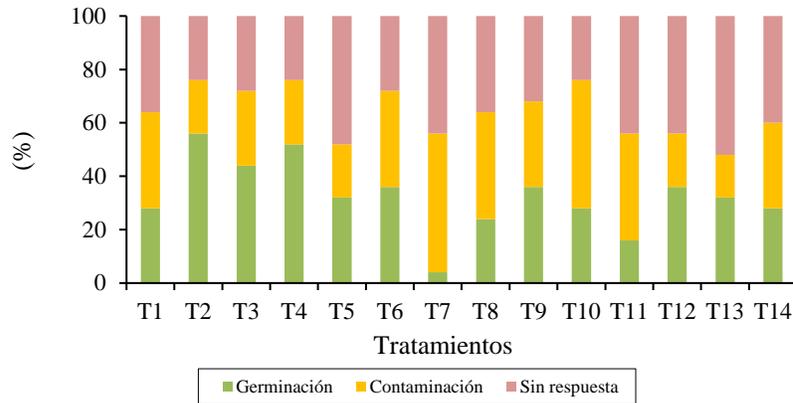
### Análisis estadístico

Se utilizó un diseño experimental completamente al azar con 14 tratamientos y 25 réplicas cada uno, los resultados se evaluaron mediante el análisis estadístico de Kruskal Wallis. Los datos obtenidos se sometieron al análisis de varianza con la prueba de Wilcoxon, con el paquete estadístico R versión 3.2.2.

## Resultados y discusión

### Germinación y formación de brotes

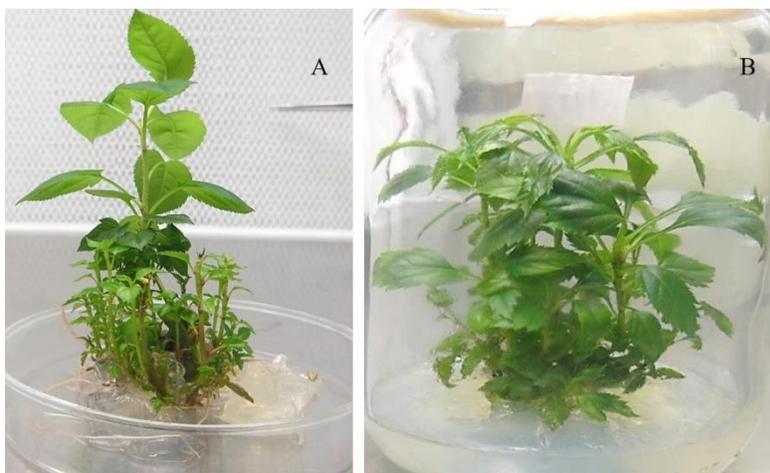
La germinación promedio obtenida en los tratamientos, fue de 32.3% a los 60 días del establecimiento de la semilla *in vitro*. No obstante, con el tratamiento compuesto por medio de cultivo MS suplementado con 0.5 mg L<sup>-1</sup> de BAP (T2) se obtuvo el mayor porcentaje de semillas germinadas (56%), lo cual concuerda con la investigación desarrollada por Rustaei *et al.* (2009), quienes trabajaron con *Malus domestica*. Debido a que en esta investigación se utilizaron plantas donantes silvestres las cuales carecían de condiciones rigurosas de sanidad, el protocolo de desinfección no resultó tan efectivo en algunos tratamientos debido a que se presentó un promedio de 31.7% de contaminación por hongo y bacteria sin identificar. Lo anterior coincide con lo establecido por Da Câmara *et al.* (1991); Keresa *et al.* (2012), quienes argumentan que el establecimiento del material vegetal depende en gran medida al cuidado fitosanitario de las plantas donante de semillas (Figura 1).



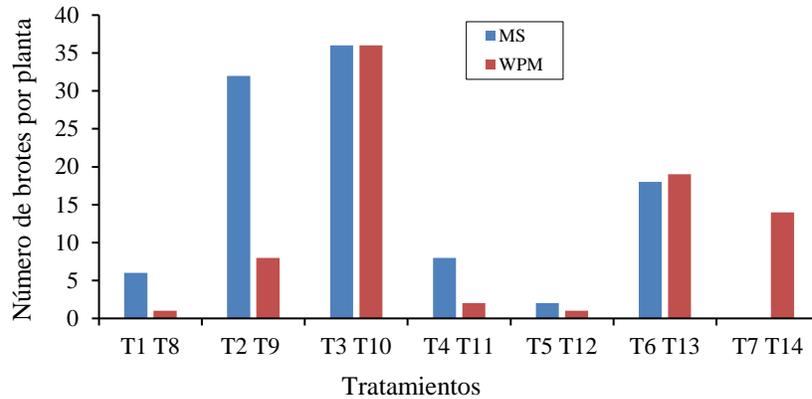
**Figura 1. Porcentaje de germinación, contaminación y semilla sin respuesta de *M. domestica* a los 60 días del establecimiento en medio de cultivo.**

La situación observada en este experimento coincide con lo argumentado por Soni *et al.* (2011), quienes señalan que es menos probable encontrar explantes contaminados recolectados en verano, mientras que los explantes recolectados en primavera, otoño e invierno muestran mayor porcentaje de contaminación, que va desde un 12 a 54%. Por lo anterior, es importante implementar tratamientos preventivos de desinfección de la planta donante, pues a pesar de la existencia abundante de protocolos de asepsia, hay microorganismos de difícil control que pueden llegar a albergarse en las partes internas del fruto y haces vasculares por la presencia de contaminantes endógenos adquiridos por la planta en su ambiente natural, lo que explica la incidencia de contaminantes en este experimento.

Los resultados indicaron buena inducción de brotes; sin embargo, se detectó variación en la cantidad de éstos según el tipo y dosis del regulador de crecimiento aplicado. La dosis de 1.5 mg L<sup>-1</sup> de BAP (T3 y T10), presentaron la mayor cantidad de brotes por explante (36 brotes cada uno respectivamente) (Figura 2 y 3) independientemente del medio de cultivo en el que se estableció.



**Figura 2. Producción *in vitro* de brotes adventicios de *M. domestica* en dos medios de cultivo a los 60 días después al establecimiento: A) T3 (MS con 1.5 mg L<sup>-1</sup> de BAP); B) T10 (WPM con 1.5 mg L<sup>-1</sup> de BAP).**



**Figura 3. Número de brotes por planta de *M. domestica* producida *in vitro* en dos medios de cultivo y diferentes dosis de reguladores de crecimiento.**

Aunque la respuesta fue la misma en ambos medios con la dosis señalada, se observó que el medio de cultivo influyó de forma importante en el desarrollo vegetativo, ya que, en las variables de altura de planta, diámetro del tallo y número de hojas, el medio de cultivo MS presentó los mejores resultados (Figuras 4, 5 y 6). Algunos autores han propuesto diferentes dosis de reguladores de crecimiento en los medios de cultivo aquí evaluados (Vilchez *et al.*, 2014; Montes-Salazar *et al.*, 2016), donde se argumenta que el medio de cultivo WPM se utiliza para especies leñosas (Mc Cown y Lloyd, 1981). Sin embargo, el medio de cultivo MS se considera un medio basal de amplio espectro que se puede utilizar en diferentes tipos de plantas con resultados favorables. A diferencia de otras investigaciones sobre propagación *in vitro* en especies, en este trabajo el medio de cultivo WPM se vio superado por el medio de cultivo MS en la mayoría de las variables evaluadas.

Hoyos *et al.* (2008), reportaron que esta hormona estimula el desarrollo de los brotes laterales, la multiplicación celular en los meristemos apicales y expansión de las hojas. Asimismo, argumentan que, al no presentar raíces, el explante no tiene la capacidad de sintetizar BAP, por lo cual, es fundamental su adición en la etapa de multiplicación.

Por su parte Dalal *et al.* (2006), argumentan resultados similares en la multiplicación de portainjertos de manzana (M9), donde observaron un notable incremento de la formación de brotes múltiples por ramificación axilar en medio MS suplementado con BAP 2.22  $\mu\text{M}$ , IBA 0.49  $\mu\text{M}$  y Kn de 2.32  $\mu\text{M}$ , logrando una tasa de multiplicación 4:1. Este comportamiento se debe a la presencia de citocinina BAP, la cual tiene un efecto directo sobre la generación de brotes.

Así mismo, Murashige (1974); Chaturvedi *et al.* (2004), enfatizan que la hormona BAP establece una superioridad en la inducción de brotes axilares en especies leñosas. Por su parte, Kepenek y Karoğlu (2011), aumentaron la tasa de multiplicación en el portainjerto M9 y las variedades ‘Starking Delicious’ y ‘Amasya’ cuando aplicaron retardadores de crecimiento (paclobutrazol y daminozida), pero estos se atrofiaron provocando un efecto nulo en el desarrollo de raíz.

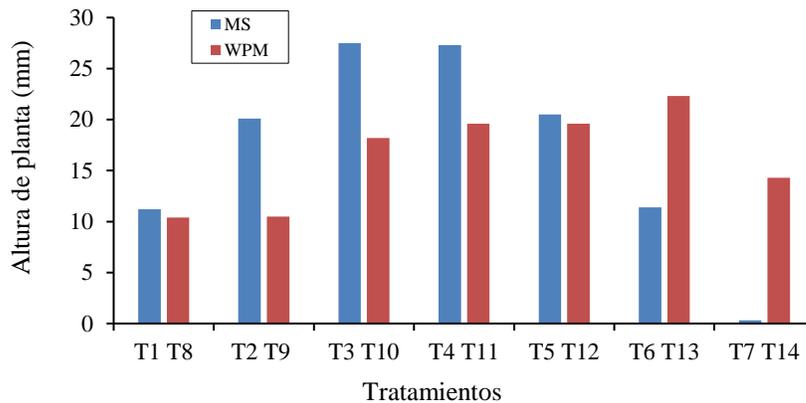
### Altura de planta

Los resultados del análisis de varianza indican que los valores de altura de planta y número de hojas obtenido a 60 días no mostraron diferencia significativa ( $p \geq 0.05$ ) entre los medios de cultivo MS y WPM. La única variable que presentó significancia fue el diámetro de tallo (Cuadro 3).

**Cuadro 3. Análisis de varianza con la prueba de Wilcoxon en altura, diámetro del tallo y número de hojas de *M. domestica*.**

Variable	MS		WPM		Valor de <i>p</i>
	Mediana	Rango	Mediana	Rango	
Altura de plántulas (mm)	16.954	107.785	16.436	103.214	0.563
Diámetro del tallo (mm)	1.771	116.066	1.097	94.933	0.0076*
Número de hojas	8.561	105.342	9.009	105.657	0.967

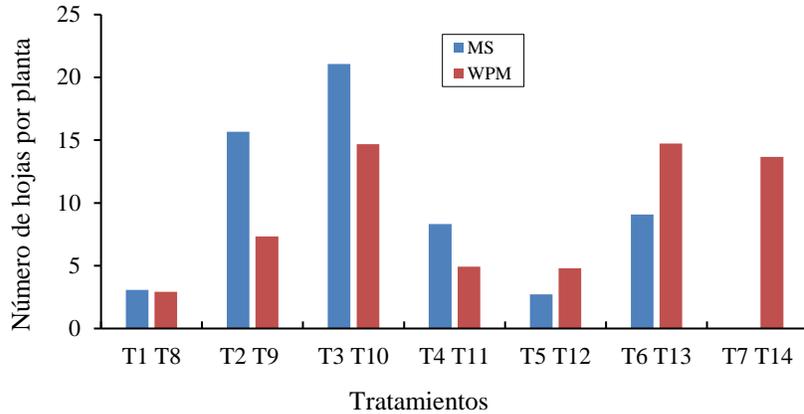
Aunque el análisis no presentó diferencias significativas entre medios de cultivo, se observó que se produjeron plantas de diferentes tamaños, presentando mayor altura las plantas con el medio MS destacando el T3 (1.5 mg L<sup>-1</sup> de BAP), el cual obtuvo un promedio de 27.59 mm y el T4 (0.5 mg L<sup>-1</sup> de IBA) con 27.36 mm (Figura 4).



**Figura 4. Altura de planta de a los 60 días del establecimiento *in vitro* de *M. domestica* en dos medios de cultivo adicionados con diferentes dosis de reguladores de crecimiento.**

### Desarrollo foliar

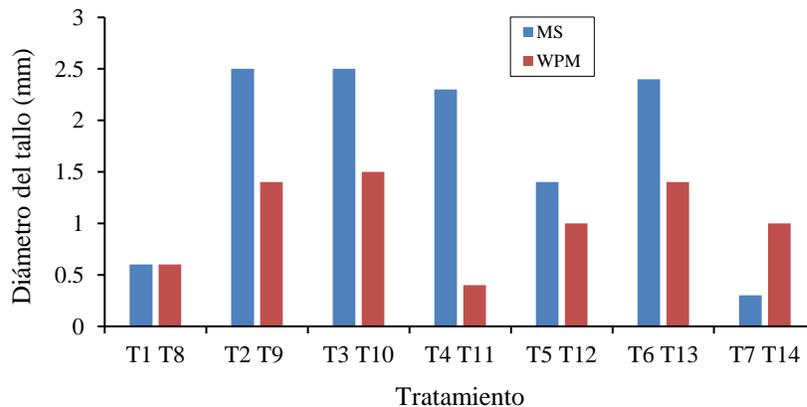
El análisis estadístico no reportó diferencia significativa ( $p \geq 0.05$ ) entre tratamientos respecto a esta variable según la prueba de Kruskal Wallis para datos no paramétricos. Sin embargo, se observó que el T3 (MS con 1.5 mg L<sup>-1</sup> BAP) destacó con la mejor respuesta de generación foliar al producir 21.07 hojas en promedio (Figura 5). Un buen desarrollo foliar incrementa la posibilidad de captar de mejor manera la luz solar, lo que hace más eficiente el proceso fisiológico de la elaboración de carbohidratos a través de la fotosíntesis, lo que permitirá su adaptación al medio abierto en su etapa de aclimatación en menor tiempo que las plantas que producen una cantidad escasa de hojas (Valladares y Niinemets, 2008).



**Figura 5. Número de hojas por planta de *M. domestica* en dos medios de cultivo adicionados con diferentes dosis de reguladores de crecimiento.**

### Diámetro del tallo

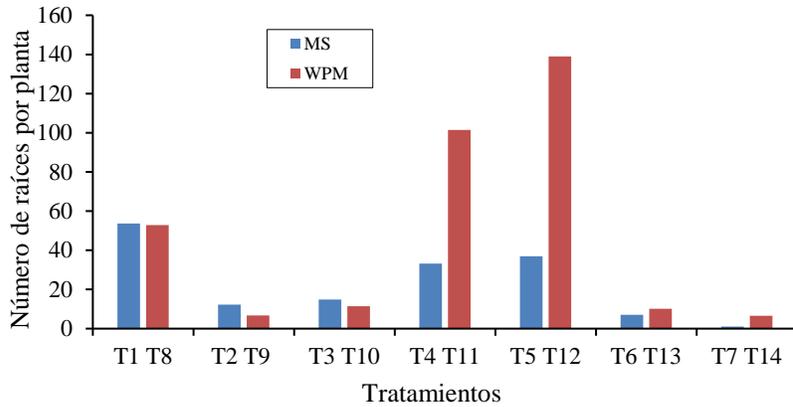
Los valores de diámetro de tallo de las plantas obtenidos a los 60 días se comportaron de manera significativa estadísticamente ( $p \geq 0.05$ ) entre los medios de cultivo MS y WPM (Cuadro 4). El T2 (MS con  $0.5 \text{ mg L}^{-1}$  de BAP), superó a los demás tratamientos en esta variable, con una media de 2.5 mm, mostrando heterogeneidad en diámetro de tallos (Figura 6).



**Figura 6. Diámetro de tallo de *M. domestica* a los 60 días después del establecimiento *in vitro* en dos medios de cultivo con diferente dosis de reguladores de crecimiento.**

### Enraizamiento y longitud de raíz

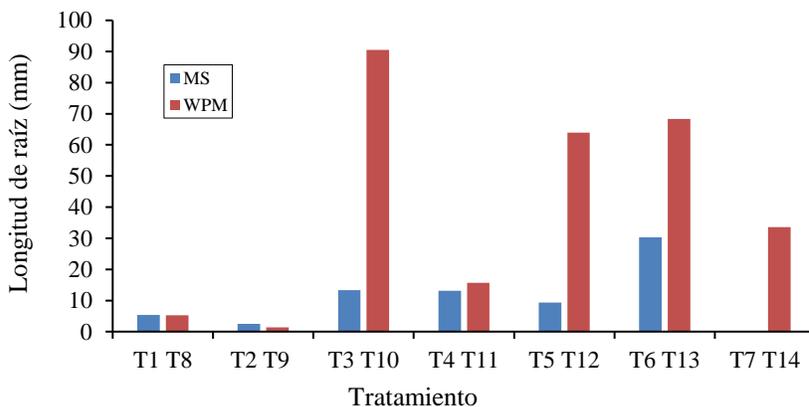
En esta etapa se logró 100% de generación de raíz en todos los tratamientos evaluados. Para evaluar su respuesta, se combinó auxina en mayor proporción respecto a la dosis de las citocininas (10:1) (Cuadro 2). El efecto de los tratamientos con medio de cultivo WPM sobresalieron de los tratamientos con medio de cultivo MS al momento de inducir el enraizamiento, siendo la dosis de  $1.5 \text{ mg L}^{-1}$  de IBA y  $0.15 \text{ mg L}^{-1}$  de KIN (T12) el que más raíces produjo, seguido del T11 cuya dosis fue de  $0.5 \text{ mg L}^{-1}$  y  $0.05 \text{ mg L}^{-1}$  de IBA y KIN respectivamente en el mismo medio de cultivo (Figura 7). Reducir al 50% la concentración de nutrientes de los medios MS y WPM fue fundamental en esta respuesta morfológica para la especie (Hartmann *et al.*, 2004; Dalal *et al.*, 2006; Gaudie, 2011).



**Figura 7. Número de raíces por planta de *M. domestica* producida *in vitro* con dos medios de cultivo y diferentes dosis de reguladores de crecimiento.**

Es bien conocido que la presencia de auxinas es necesaria para la formación de raíz; no obstante, su presencia en el medio de cultivo por tiempo prolongado puede inhibir el desarrollo de raíces adventicias (Dobrąnszki y Teixeira Da Silva, 2010), situación que se asume pudo haber afectado a los demás tratamientos según el tipo y dosis del regulador de crecimiento.

De acuerdo con la prueba de Wilcoxon, se pueden diferenciar tres resultados relevantes de los 14 tratamientos evaluados, el T10 (WPM con 1.5 mg L<sup>-1</sup> de ANA y 0.15 mg L<sup>-1</sup> de BAP), mostró un alargamiento promedio de la raíz de 90.47 mm (Figura 8). Asimismo, esta prueba mostró que los T13 (WPM con 0.5 mg L<sup>-1</sup> de AIA y 0.05 mg L<sup>-1</sup> de KIN) y T12 (WPM con 1.5 mg L<sup>-1</sup> de IBA y 0.15 mg L<sup>-1</sup> de KIN) mostraron una longitud promedio de 68.35 y 63.93 mm respectivamente.

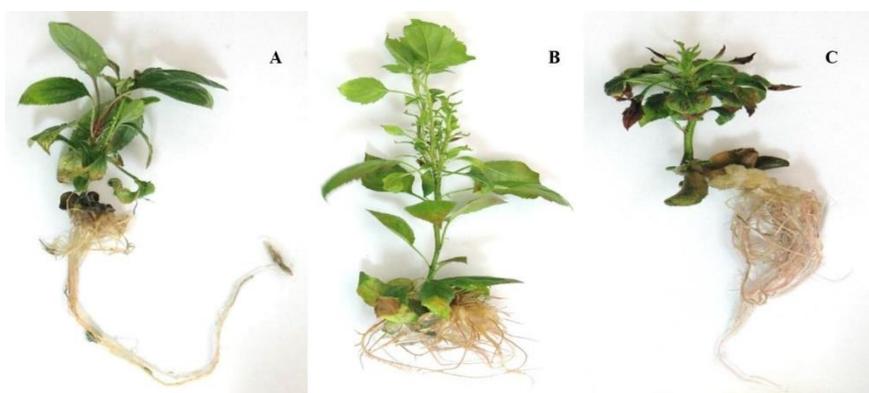


**Cuadro 8. Longitud de raíz de plantas de *M. domestica* producida *in vitro* en dos medios de cultivo y diferentes dosis de reguladores de crecimiento.**

*Malus domestica* respondió de manera heterogénea a las dosis de hormonas (auxinas) dosificadas (ANA, IBA, AIA), el medio de cultivo suplementado con auxinas ANA mostró niveles superiores en la generación de raíz a los que registraron los tratamientos con IBA y AIA. Este resultado confirma lo reportado por Soni *et al.* (2011), quienes argumentan que bajas concentraciones de ANA inducen la formación de raíces en mayor cantidad y mejor desarrollo, que cuando los explantes son expuestos a los reguladores IBA y AIA. Según Druart (1997), la presencia de auxinas es esencial para promover el enraizamiento, pero que en combinación con citocininas puede potenciar el alargamiento de la raíz.

En contraste con lo anterior, informes sobre porta injertos de manzano ‘Topaz’ reportados por Keresa *et al.* (2012), registraron que la hormona IBA estimuló alta densidad de raíz. Por otra parte, Modgil y Thakur (2017) y Modgil *et al.* (2017), afirman que puede obtenerse un enraizamiento superior al 80% cuando se utiliza IBA que cuando se utiliza ANA, donde este porcentaje es menor.

Asimismo, Amiri y Elahinia (2011), señalan que la presencia de IBA en el medio de cultivo es esencial para enraizar portainjertos de algunas especies de *Malus*; sin embargo, esto solo es posible cuando se disminuye el nivel de citoquinina y se aumenta el nivel de auxina. No obstante, en este experimento el T13 mostró menor longitud que los T10 y T12, sin embargo, se observó una raíz más densa (Figura 9), lo que favorece la absorción de nutrientes en la etapa de establecimiento en sustrato para la aclimatación. En contraste con lo anteriormente señalado, Mehta *et al.* (2014), aseguran que se puede obtener entre 92 y 98% de enraizamiento de portainjertos MM106 y B9 en medio de cultivo sin el uso de reguladores de crecimiento.



**Figura 9.** Respuesta de enraizamiento de plantas de *M. domestica* en medio de cultivo WPM. A) T10 ( $1.5 \text{ mg L}^{-1}$  de ANA y  $0.15 \text{ mg L}^{-1}$  de BAP); B) T12 ( $1.5 \text{ mg L}^{-1}$  de IBA y  $0.15 \text{ mg L}^{-1}$  de KIN); C) T13 ( $0.5 \text{ mg L}^{-1}$  de AIA y  $0.05 \text{ mg L}^{-1}$  de KIN).

## Conclusiones

Los reguladores de crecimiento y el tipo de medio de cultivo para la propagación *in vitro* de *Malus domestica* juegan un papel importante en la formación de los órganos vegetales. El regulador BAP en medio de cultivo MS presentó mejores resultados en la germinación, producción de brotes y desarrollo de la parte aérea de la planta. En la etapa de enraizamiento, el uso del medio WPM en combinación con  $1.5 \text{ mg L}^{-1}$  de IBA y  $0.15 \text{ mg L}^{-1}$  de KIN presentó un efecto más favorable para la formación de raíces; sin embargo, la combinación de  $1.5 \text{ mg L}^{-1}$  de ANA y  $0.15 \text{ mg L}^{-1}$  de BAP en este mismo medio de cultivo, estimuló el crecimiento radicular de forma significativa que al resto de los tratamientos. Para asegurar el éxito de la propagación *in vitro* de *M. domestica* es necesario considerar los cambios de medio de cultivo de forma alternada con las dosis de reguladores de crecimiento aquí recomendadas.

En este experimento, se observó que la alternancia de reguladores de crecimiento y medios de cultivo entre las diferentes etapas del proceso de propagación *in vitro* de *M. domestica* puede ser favorable que si se maneja un solo medio de cultivo y las mismas dosis de reguladores en todas las etapas. Este protocolo puede ser tomado como alternativa de conservación y propagación masiva de la especie, produciendo material vegetal que puede ser usado como patrón dada la adaptabilidad que presentan las plantas de donde fue recolectado en material.

## Agradecimientos

Los autores desean expresar su agradecimiento al Sr. Oscar Villarreal Zamora y a la empresa Calato SA de CV por el apoyo económico para la adquisición de material y los reactivos utilizados para desarrollar este trabajo de investigación. Asimismo, se expresa el agradecimiento a la Universidad Juárez del Estado de Durango por otorgar las facilidades, instalaciones y equipo utilizado, así como al CONACYT por haber otorgado la beca de manutención al autor principal del presente trabajo, lo que permitió realizar sus estudios de posgrado en la Maestría Institucional de Ciencias Agropecuarias y Forestales.

## Literatura citada

- Amiri, E. M.; Elahinia, A. 2011. Optimization of medium composition for apple rootstocks. *Afr. J. Biotech.* 10(18):3594-3601. <https://doi.org/10.5897/AJB10.1945>.
- Azofeifa, A. 2009. Problemas de oxidación y oscurecimiento de explantes cultivados *in vitro*. *Agron. Mesoam.* 20(1):153-175.
- Chaturvedi, H. C.; Sharma, P. L. K.; Agha, B. Q. and Sharma, M. 2004. Production of cloned trees of *Populus deltoides* through *in vitro* regeneration from leaf stem and root explants and their field cultivation. *Indian. J. Biotechnol.* 3(2):203-208.
- Da Câmara M, L.; Da Câmara M., A.; Hanzer, V.; Kalthoff, B.; Weiss, H.; Mattanovich, D.; Regner, F. and Katinger, H. 1991. A new, efficient method using 8 - hydroxyl - quinolinol-sulfate for the initiation and establishment of tissue cultures of apple from adult material. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 27(2):155-160.
- Dalal, A.; Das, B.; Sharma, K.; Mir, A. and Sounduri, S. 2006. *In vitro* cloning of apple (*Malus domestica* Borkh) employing forced shoot tip cultures on M9 rootstock. *Indian. J. Biotechnol.* 5(4):543-550.
- Dobrąnszki, J. and Teixeira Da Silva, J. A. 2010. Micropropagation of apple a review. *Biotechnol. Adv.* 28(4):462-488. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2010.02.008>.
- Druart, P. 1997. Optimization of culture media for *in vitro* rooting of *Malus domestica* Borkh. cv. Compact Spartan. *Biologia Plantarum.* 39(1):67-77.
- Gaudie, D. 2011. Micropropagation of two apple (*Malus domestica* Borkh) varieties from shoot tip explant. Addis Ababa University. College of Natural Sciences. School of Graduate Studies. Biotechnology Program. Ethiopia. 50 p.
- González, C. G.; Villanueva, D. J.; Orona, C. I. y Sánchez, C. I. 2005. Efecto de la lámina de riego en el crecimiento radial de nogal pecanero (*Carya illinoensis* Koch) mediante análisis de imágenes. *Agrofaz.* 5(2):863-868.
- Hartmann, H.; Kaster, D.; Davies, F. and Geneve, R. 2004. *Plant propagation: principles and practices.* 6<sup>th</sup> (Ed). Prentice Hall of India Private Limited, New Delhi, India. 770 p.
- Hoyos, J.; Perea, C. and Velasco, R. 2008. Evaluation of the effect of different concentrations of phytohormones in micropropagation of dominico hartón plantain (*Musa* AAB Simmonds). *Facultad de Ciencias Agropecuarias.* 6(2):99-104.
- Kepenek, K. and Karoğlu, Z. 2011. The effects of paclobutrazol and daminozide on *in vitro* micropropagation of some apple (*Malus domestica*) cultivars and M9-rootstock. *Afr. J. Biotechnol.* 10(24):4851-4859. <https://doi.org/10.5897/AJB10.1456>.

- Keresá, S.; Mihovilovic, A.; Baric, M.; Habus Jercic, I.; Sarcevic, H. and Bisko, A. 2012. Efficient axillary shoot proliferation and *in vitro* rooting of apple cv. 'Topaz'. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*. 40(1):113-118. <https://doi.org/10.15835/nbha4017211>.
- Levitus, G.; Echenique, V.; Rubinstein, C.; Hopp, E. y Mroginski, L. 2010. *Biología y mejoramiento vegetal II. 2ª Edición*. Editorial INTA. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Consejo argentino para la información y el desarrollo de la biotecnología. 26-33 pp.
- Mc Cown, B. and Lloyd, G. 1981. Woody plant medium (WPM) a revised mineral formulation for micro-culture of woody plant species. *HortScience*. 16:453.
- Mehta, M.; Ram, R. and Bhattacharya, A. 2014. A simple and cost-effective liquid culture system for the micropropagation of two commercially important apple rootstocks. *Indian J. Exp. Biol.* 52(7):748-754.
- Modgil, M.; Parmar, S. and Negi, N. P. 2017. RAPD analysis of long term micropropagated rootstock plants of apple Malling 7. *Indian J. Exp. Biol.* 55(3):178-183.
- Modgil, M. and Thakur, M. 2017. *In vitro* culture of clonal rootstocks of apple for their commercial exploitation. *Acta Hort.* 1155:331-335. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2017.1155.48>.
- Montes-Salazar, A. M.; Sepúlveda-Jiménez, G.; Evangelista-Lozano, S. y Rodríguez-Monroy, M. 2016. Estudio preliminar para la propagación *in vitro* de *Cedrus atlantica* por yemas axilares. *Rev. Mex. Cienc. Agríc.* 7(8):2071-2078.
- Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revised medium for growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15(3):473-497.
- Murashige, T. 1974. Plant propagation through tissue culture, *Ann. Rev. Plant Physiol.* 25(1):135-160.
- FAO. 2014. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Base de datos FAOSTAT. <http://www.fao.org/faostat/es/>.
- Pancaningtyas, S. 2015. Study on the presence and influence of phenolic compounds in callogenesis and somatic embryo development of cocoa (*Theobroma cacao* L.). *Pelita Perkebunan*. 31(1):14-20. <https://doi.org/10.22302/iccri.jur.pelitaperkebunan.v31i1.81>.
- Rustaei, M.; Nazeri, S.; Ghadimzadeh, M. and Hemmaty, S. 2009. Effect of phloroglucinol, medium type and some component on *in vitro* proliferation of dwarf rootstock of apple (*Malus domestica*). *Inter. J. Agric. Biol.* 11(2):193-196.
- SIAP. 2019. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. [http://infosiap.siap.gob.mx:8080/agricola\\_siap\\_gobmx/AvanceNacionalSinPrograma.do](http://infosiap.siap.gob.mx:8080/agricola_siap_gobmx/AvanceNacionalSinPrograma.do).
- Soni, M.; Thakur, M. and Modgil, M. 2011. *In vitro* multiplication of Merton I. 793-an apple rootstock suitable for replantation. *Indian J. Biotechnol.* 10(3):362-368.
- Tandon, B.; Anand, U.; Alex, B. K.; Kaur, P.; Nandy, S.; Shekhawat, M. S.; Sanyal, R.; Pandey, D. K.; Koshy, E. P. and Dey, A. 2021. Statistical optimization of *in vitro* callus induction of wild and cultivated varieties of *Mucuna pruriens* L. (DC.) using response surface methodology and assessment of L-Dopa biosynthesis. *Industrial Crops and Products*. 169(1):113626. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2021.113626>.
- Teixeira da Silva, J. A.; Gulyás, A.; Magyar-Tábori, K.; Min-Rui, W.; Qiao-Chun, W. and Dobránszki, J. 2019. *In vitro* culture of apple and other *Malus* species: recent advances and applications. *Planta*. 249(4):975-1006. <https://doi.org/10.1007/s00425-019-03100-x>.

- Valladares, F. and Niinements, Ü. 2008. Shade tolerance, a key plant feature of complex nature and consequences. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*. 39(1):237-257. <https://doi.org/10.1146/annurev.ecolsys.39.110707.173506>.
- Vilchez, J.; Martínez, L.; Álvarez, C.; Albornoz, A.; Albany, N.; Molina, M. y García-Águila, L. 2014. Medio de cultivo y reguladores de crecimiento en la multiplicación *in vitro* *Psidium guajava* L. *Biotecnología Vegetal*. 14(1):15-20.
- Zhao, X.; Cheng, Z. and Zhang, X. 2008. Cell fate switch during *in vitro* plant organogenesis. *J. Integ. Plant Biol.* 50(7):816-824. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7909.2008.00701.x>.