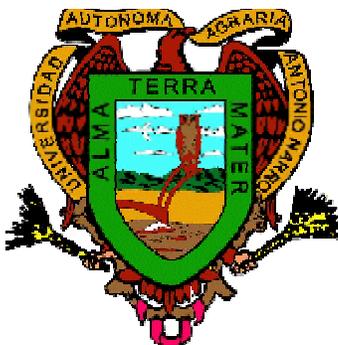


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA

“ANTONIO NARRO”

DIVISIÓN DE AGRONOMÍA



GERMINACIÓN *IN VITRO* DE EMBRIONES INMADUROS DE DURAZNO CULTIVAR “DIAMANTE”.

POR:

SALVADOR RIVERA CARRETES

TESIS

Presentada como Requisito Parcial para Obtener el Título de:

INGENIERO AGRÓNOMO EN PRODUCCIÓN

Buenavista, Saltillo, Coahuila, México.

Marzo del 2006.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA “ANTONIO NARRO”

DIVISIÓN DE AGRONOMÍA

**GERMINACION IN VITRO DE EMBRIONES INMADUROS DE
DURAZNO CULTIVAR ‘DIAMANTE’.**

POR:

SALVADOR RIVERA CARRETES.

TESIS.

**Que somete a la consideración de H. Jurado examinador
como requisito para obtener el título de**

Ingeniero Agrónomo en Producción

Aprobada por:

**Asesor principal: _____
Dr. ANDRES MARTINEZ CANO**

**Sinodal: _____
Dr. MARCO ANTONIO BUSTAMANTE GARCIA**

**Sinodal: _____
Dr. MARIO ERNESTO VAZQUEZ BADILLO**

**Sinodal: _____
Ing. ARNOLDO ISIDRO RUMAYOR FUENTES**

**M.C. ARNOLDO OYERVIDES GARCÍA
Coordinador de la División de Agronomía**

Buenvista, Saltillo, Coahuila, México. Marzo 2006

AGRADECIMIENTOS

A LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA "ANTONIO NARRO" POR PERMITIRME PREPARARME PROFESIONALMENTE EN SU SENO DURANTE MI ESTANCIA EN UNA DE LAS CARRERAS PROFESIONALES MÁS NOBLES, LA AGRICULTURA.

AL CONSEJO ESTATAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA (COECYT) POR HABERME BRINDADO LA AYUDA ECONÓMICA PARA HACER POSIBLE LA ELABORACIÓN Y CONCLUSIÓN DE ESTE TRABAJO.

AL DR. ANDRÉS MARTÍNEZ CANO, POR LOS CONOCIMIENTOS, APOYO Y DEDICACIÓN BRINDADA EN EL DESARROLLO DE LA PRESENTE INVESTIGACIÓN, PERO SOBRE TODO LA CONFIANZA POR HABERME PERMITIDO REALIZAR ESTE TRABAJO PARA MI TITULACIÓN.

AL DR. MARCO ANTONIO BUSTAMANTE GARCÍA, POR EL APOYO BRINDADO Y PERMITIRME REALIZAR LA INVESTIGACIÓN EN EL DEPARTAMENTO DE HORTICULTURA EN EL LABORATORIO DE CULTIVO DE TEJIDOS Y ANALIS MINERALES

AL DR. MARIO E. VÁSQUEZ BADILLO, POR LOS CONOCIMIENTOS, APOYO BRINDADO EN MI FORMACIÓN PROFESIONAL.

AL MÍ ESTIMADO AMIGO DR. SALVADOR PÉREZ GONZÁLEZ, POR BRINDARME PARTE DE SUS CONOCIMIENTOS, Y POR SE UNA DE LAS PERSONAS QUE CONTRIBULLEN EN EL MEJORAMIENTO DE ESPECIES FRUTALES.

A LOS ING. OMAN JOSUE VELAQUEZ MORALES, ARTEMIO, ALBERTO ZENON A FERNANDO INES, POR SUS CONSEJOS Y APOYO

A TODOS LOS MAESTRO QUE FORMARON PARTE DE MI FORMACION PROFECIONAN EN UNA DE LAS BELLAS INTITUCIONES DE AGRONOMIA, UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA ANTONIO NARRÓ A AQUELLAS PERSONAS QUE INTERVINIERON Y PARTICIPARON EN EL DESARROLLO DE LA PRESENTE INVESTIGACION. A TODOS AQUELLOS AMIGOS QUE ME BRINDARON SU AMISTAD, CONSEJOS EN MI ESTANCIA EN ESTA INTITUCION.

DEDICATORIAS

A DIOS:

POR QUE ME HA PERMITIDO TENER LA FE Y CONFIANZA EN EL PARA SEGUIR ADELANTE EN ESTE DURO CAMINO DE LA VIDA. POR DARME LA DICHA DE TENER A MI FAMILIA UNIDA A PESAR DE LOS RETOS QUE EN LA VIDA SE NOS HAN PRESENTADO.

A MIS PADRES:

SALVADOR RIVERA LOPEZ Y NATALIA CARRETES SANCHES.

GRACIAS AUSTEDES HE SALIDO A DELANTE, POR SER EL EJEMPLO LA GUIA DE MI CAMINO, POR SEMBRAR EN MI LA DICHA DE SER UNA PERSONA DE ÉXITO, GRACIAS POR EL AMOR, APOYO Y CONFIANZA QUE DEPOSITARON EN MÍ, LOS QUIERO MUCHO, LOS ADMIRO Y LOS RESPETO MIL GRACIAS PADRES.

A MIS HERMANOS: **ROBERTO, EFRAIN, AMADOR, AMBROCIO, BEATRIZ ADRIANA, POMPEYO Y EDUARDO** CON QUIENES SIEMPRE HE CONTADO DE TENER LA DICHA DE SU CONSEJOS, CARIÑO Y SU SABIDURIA.

A MI CUÑADA ORARALIA, POR LOS SABIOS CONSEJOS, LA AMISTAD Y LA CONFIANZA QUE NOS BRINDA EN NUESTRA FAMILIA.

A MIS SOBRINOS: **DIANA LIZBETH, EFRAIN, XITLALI JASMIN, JESUS AMADOR Y LOS HIJOS DE MI HERMANO ROBERTO.**

A MIS MUY ESTIMADOS AMIGOS, BIOL.. ANGEL, ARQ. ADRIAN CARLO Y AL ING. JUAN MANUEL, POR SUS CONSEJOS, POR LA AMISTAD.

A MI AMIGA LIZETH PIENADA DE LOS SANTOS, POR SU CARÑO, SU CONFIANSA, CONSEJOS BRINDADOS PARA MI SUPERACION.

A AQUELLA PERSONA LEAL Y SINCERA QUE ME HA BRINDADO SU CARIÑO, CONFIANZA Y AMOR CON LA CUAL HE DE COMPARTIR UN CAMINO LARGO POR RECORRER GRACIAS AMOR.

A MIS COMPAÑEROS DE LA GENERACION CENTERARIO DE INGENIEROS AGRONOMOS EN PRODUCCION.

A MI PUEBLO TETELA DEL VOLCAN, MORELOS POR SEMBRAR EN MÍ LA SEMILLA DE SUPERACION EN UNA DE LAS AREAS MÁS HERMOSAS LA AGRICULTIURA.

INDICE DE CONTENIDO

	Pág.
INDICE DE CUADROS.....	vii
INDICE DE FIGURAS.....	Viii
INTRODUCCIÓN.....	1
Objetivos.....	2
Hipótesis.....	3
REVISION DE LITERATURA.....	4
Semilla.....	4
Germinación.....	4
Latencia.....	5
Conceptos.....	5
Características de la cubierta o testa de la semilla.....	6
Concentración de sustancias inhibidoras.....	7
Inmadures de la semilla.....	8
Tratamientos para romper latencia de las semillas.....	8
Escarificación mecánica.....	8
Estratificación.....	9
Propagación in vitro.....	9
Proceso del cultivo in vitro.....	10
Ventajas del cultivo in vitro.....	11
Medio de cultivo.....	12
Sales inorganicas.....	13
Componentes inorganicos.....	13
Carbohidratos.....	13
Vitaminas.....	13
Hormonas y reguladores de crecimiento.....	14
Giberelinas.....	14
Funciones de las giberelinas.....	15
Citoquininas.....	15
Funciones de citoquininas.....	15
Sostenes inertes.....	16
pH.....	16
Germinación in vitro del durazno.....	17
Cultivo de embriones como una técnica practica para la genotecnia de frutales, con énfasis en prunus.....	21
MATERIALES Y METODOS.....	23
Material vegetativo.....	23
Descripción de los tratamientos.....	23
Establecimiento del experimento.....	24
Preparación del medio de cultivo.....	24
Colecta del material a utilizar.....	25
Despulpe de frutos.....	26

Desinfección del material.....	26
Escarificación de la semilla de durazno.....	26
Siembra de embriones inmaduros.....	26
Estratificación de de semilla de durazno.....	26
Crecimiento de plántulas.....	27
Parámetros evaluados.....	27
Germinación.....	27
Longitud de plántula.....	27
Longitud de radícala.....	27
Análisis estadístico.....	27
RESULTADOS Y DISCUSION.....	30
Experimento I Semilla cosechada a los 75 días después de floración.....	39
Experimento II Semilla cosechada a los 75 días después de floración.....	37
CONCLUSIONES.....	44
LITERATURA CITADA.....	45
APENDICES.....	49

INDICE DE CUADROS

Cuadro	Pagina
Cuadro 3.1. Composición del medio nutritivo de Marashige y Skoog.	25
Cuadro 1A Concentración de datos para la variable por ciento de germinación de embriones inmaduros de durazno cultivar Diamante, por sesenta días de estratificación. A los 75 después de floración.....	49
Cuadro 2A Concentración de datos para la variable de respuesta longitud de raíz de embriones inmaduros de durazno cultivar Diamante. Datos transformados con $\sqrt{X + 0.05}$	49
Cuadro 3A Concentración de datos para la variable de respuesta longitud de tallo de embriones inmaduros de durazno cultivar Diamante. Datos transformados con $\sqrt{X + 0.05}$	50
Cuadro 4A. Concentración de datos para la variable de respuesta germinación en la especie de durazno (<i>Prunus persica</i> L.) cultivar Diamante.....	51
Cuadro 5A. Cuadro A. Concentración de datos para la variable de respuesta longitud de radícula en la especie durazno (<i>Prunus persica</i> L.) cultivar Diamante. Datos transformados $\sqrt{x + 0.05}$	53
Cuadro 6A. Concentración de datos para la variable de respuesta longitud de plántula en la especie durazno (<i>Prunus persica</i> L.) cultivar Diamante.....	54

INDICE DE FIGURAS

Figura	Pagina
4.1. Figura. 4.1 Germinación de embriones de 75 días de durazno en $\frac{1}{2}x$ del medio MS más AG ₃ , bajo condiciones de estratificación...	30
4.2. Germinación de embriones de 75 días de durazno en $\frac{1}{4}x$ del medio MS más AG ₃ , bajo condiciones de estratificación.....	31
4.3. Efecto del AG ₃ y la estratificación por 60 días, en dos niveles de concentración del medio de cultivo MS, sobre la germinación de embriones de 75 días de durazno.....	31
4.4. Germinación de embriones de 75 días de durazno en $\frac{1}{2}x$ del medio MS más kinetinas, bajo condiciones de estratificación.....	32
4.5. Germinación de embriones de 75 días de durazno en $\frac{1}{4}x$ del medio MS más kinetina, bajo condiciones de estratificación.....	33
4.6. Efecto de la Kinetina y la estratificación por 60 días, en dos niveles de concentración del medio de cultivo MS, sobre la germinación de embriones de 75 días de durazno.....	33
4.7. Efecto del AG ₃ , en dos niveles de concentración del medio de cultivo MS, sobre la longitud de raíz en embriones de 75 días de durazno.....	34
4.8. Efecto de la Kinetina, en dos niveles de concentración del medio de cultivo MS, sobre la longitud de raíz en embriones de 75 días de durazno.....	35
4.9. Efecto del AG ₃ , en dos niveles de concentración del medio de cultivo MS, sobre la longitud de tallo en embriones de 75 días de durazno.....	36
4.10. Efecto de kinetina, en dos niveles de concentración del medio de cultivo MS, sobre la longitud de tallo, en embriones de 75 días de durazno.....	36
4.11. Germinación de embriones de 95 días de durazno en un $\frac{1}{2}x$ del medio MS más AG ₃ , bajo condiciones de estratificación.....	37
4.12. Germinación de embriones de 95 días durazno en $\frac{1}{4}x$ del medio MS más AG ₃ , bajo condiciones de estratificación.....	38
4.13. Efecto del AG ₃ y la estratificación por 60 días, en dos niveles de concentración del medio de cultivo MS, sobre la germinación de embriones de 95 días de maduración.....	39
4.14. Germinación de embriones inmaduros de 95 días de durazno en $\frac{1}{2}x$ del medio MS más kinetina, bajo condiciones de estratificación.....	39
4.15. Germinación de embriones de 95 días de durazno en $\frac{1}{4}x$ del medio MS más kinetina, bajo condiciones de estratificación.....	40
4.16. Efecto de la Kinetina y la estratificación por 60 días, en dos niveles de concentración del medio de cultivo MS, sobre la germinación de embriones de 95 días de durazno.....	40
4.17. Efecto del AG ₃ , en dos niveles de concentración del medio de cultivo MS, sobre la longitud de raíz en embriones de 95 días de durazno.....	41

4.18. Efecto de la Kinetina, en dos niveles de concentración del medio de cultivo MS, sobre la longitud de raíz en embriones de 95 días de durazno.....	42
4.19. Efecto de AG3, en dos niveles de concentración del medio de cultivo MS, sobre la longitud de tallo en embriones de 95 días de durazno.....	43
4.20. Efecto de kinetina, en dos niveles de concentración del medio de cultivo MS, sobre la longitud de tallo, en embriones de 95 días de durazno.....	43
1A Estratificación de embriones (4-6 °C).....	56
2A Cámara de crecimiento, plántulas en crecimiento.....	56
3A Desarrollo de plántulas de durazno.....	57
4A Plántula de durazno lista para trasplante.....	57
5A Plántula transplantada en sustrato.....	57

RESUMEN

El presente trabajo de investigación se realizó durante el período comprendido de julio de 2005 a febrero de 2006, en el laboratorio de Cultivo de Tejidos y Análisis Minerales del Departamento de Horticultura de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Saltillo, Coahuila. El objetivo principal de esta investigación fue determinar la capacidad de germinación *in vitro* de leembriones inmaduros de 75 y 95 días de desarrollo del cultivar de durazno 'Diamante', la respuesta del nivel de concentración del medio de cultivo y el uso del ácido giberélico y de la hormona kinetina. Para ello se establecieron 16 tratamientos, conformados del 1 al 8 con $\frac{1}{2}$ de solución normal del medio de cultivo MS, adicionando del 1 al 4 las concentraciones de AG₃ de 0, 1, 10, 100 ppm, y del 5 al 8 las concentraciones de 0, 2, 4, 8 ppm de la hormona kinetina. Del tratamiento 9 al 16 en $\frac{1}{4}$ x de la solución normal del medio de cultivo MS, adicionando del 9 al 12 las concentraciones de AG₃ de 0, 1, 10, 100 ppm, y del 13 al 16 las concentraciones de 0, 2, 4, 8 ppm de la hormona kinetina. Se realizaron dos cosechas a los 75 y 95 días después de plena floración, los frutos fueron lavados, despulpados para extraer el endocarpio, los cuales se desinfectaron con cloro a 10% de producto comercial cloralex, se realizó la escarificación para extraer la semillas, se les dio una última desinfectada con una solución de hipoclorito de sodio al 10% por un tiempo de 5 minutos, a las semillas se le eliminó la capa membranosa que cubre los cotiledones, los embriones fueron extraídos y sembrados en los frascos gerber que contenían ya el medio preparado. Todas estas operaciones se realizaron en la campana de flujo laminar en condiciones asépticas. Sembrados los embriones, los frascos se cubrieron con cajas de cartón y fueron introducidos a un refrigerador para someterlos a un proceso de estratificación *in Vitro* de (4-6 °C) y oscuridad por un período de (60 días). Los datos obtenidos se analizaron bajo un diseño con un arreglo factorial completamente al azar, utilizando el programa estadístico SAS versión 6.13 (SAS, Institute, 1997).

Es factible la germinación in Vitro de embriones inmaduros de duraznos 'Diamante' a partir de 75 días después de plena floración. La germinación in vitro de embriones inmaduros de 75 días después de la floración, requiere de 60 días de estratificación para alcanzar un 100%, mientras que la semilla cosechada a los 95 días requiere de 57 días de estratificación para lograr un 100% de germinación. No es necesario suplementar ni con AG₃ ni kinetinas al medio cultivo para obtener un 100% de germinación, pero que es necesario utilizar ¼x del medio Murashige y Skoog (1962).

INTRODUCCIÓN.

El durazno (*Prunus persica L*) es uno de los principales frutales de clima templado a nivel mundial, con una producción total de 13.76 millones de toneladas, de los cuales china obtiene (42%) de la producción mundial con 5,832,000 ton; seguido de Italia con 1,672,609 ton. (12%); EUA con 1,672,609 ton. (10%), México ocupa el décimo lugar con el (1.6%) de producción correspondiendo a 223,883 toneladas (FAO-Stat: 2004).

Típicamente las zonas productoras de durazno se han localizado en lugares con climas templados e inviernos de moderados a fríos, pero en la actualidad se ha incrementado la superficie dedicada a este cultivo, con duraznos de bajos requerimientos de horas frío.

En la república Mexicana la superficie plantada de durazno es de 44,539ha, con una superficie cosechada de 34,194ha en el año 2005 y una producción de 194,713 toneladas, tanto de temporal y como de riego, destacando como principales estados productores Michoacán, Estado de México, Morelos, Zacatecas, Chihuahua, Puebla otros estados. El durazno en nuestro país presenta un consumo per cápita de 2.2kg, por persona al año (SIAP-SAGARPA, 2005).

Sin embargo, la producción de durazno resulta insuficiente para cubrir las necesidades del consumo, como se demuestra con las importaciones (en el 2002 fue de 22,012ton, para el 2006 se estima que sea de 31,000ton), la producción estimada para el 2006 es de 153,000 toneladas lo cual no es suficiente para cubrir las necesidades de consumo en México lo cual no deja de establecer una competencia con nuestra producción.

El progreso genético, en la obtención de cultivares precoces de duraznos, es muy importante, ya que los materiales que producen frutos más tempranos en su maduración se cultivan en condiciones intensivas;

involucrando un sistema de podas después de la cosecha para mantener el árbol pequeño y con ello la posibilidad de aumentar los rendimientos por unidad de superficie, obteniendo la cosecha más temprano, lo cual nos da la ventaja en la comercialización en etapas en las cuales el mercado no está saturado como es el caso de muchos de los cultivos en nuestro país.

La obtención de materiales genéticos con las características antes mencionadas se presenta difícil por la viabilidad de los embriones resultantes de cruces precoz X precoz, debido principalmente a la inmadurez de los embriones, por lo que se requiere del rescate *in vitro* de éstos para poder obtener la progenie (Ramming, 1990; Gray *et al*, 1987); en los programas de mejoramiento genético se busca lograr, de ser posible, el 100% de germinación de las semillas sembradas para obtener toda la progenie, y de esta manera tener mayor rango de selección.

La justificación del presente trabajo radica en la necesidad de germinar *in Vitro* semillas de durazno con la finalidad de completar el ciclo de madurez fisiológica de los embriones y obtener plántulas por medio de embriones inmaduros de durazno.

Objetivos

- ✓ Determinar la capacidad de germinación *in vitro* de los embriones inmaduros de 75 y 95 días de desarrollo.
- ✓ Determinar la respuesta a diferentes concentraciones de sales, del ácido giberélico y la kinetina en el medio de cultivo.

Hipótesis

- ❖ El durazno variedad Diamante de 110 días de flor a cosecha, puede ser propagado mediante la germinación *in vitro* de embriones inmaduros.
- ❖ La respuesta a la germinación *in vitro* depende de la concentraciones de sales en el medio de cultivo, así como del uso del ácido giberélico y la kinetina.

REVISIÓN DE LITERATURA

La Semilla.

Camacho (1994) y Hartman y Kester (1999) mencionaron en un sentido botánico más estricto, que la semilla es un óvulo fecundado, independiente de la planta madre, que ha madurado hasta adquirir la diferenciación y capacidad fisiológica para originar un nuevo ser.

Besnier (1989) afirma que las semillas son unidades de diseminación y reproducción sexual de las plantas superiores, procedentes del desarrollo de los óvulos de sus flores, están compuestas de uno o varios embriones, reservas nutritivas y una o varias capas protectoras originadas a partir de los tegumentos del óvulo, del ovario, de los tejidos de otras partes de la flor e incluso, de la inflorescencia.

La semilla es el óvulo maduro encerrado dentro del ovario maduro o fruto. La semilla es lo que completa el proceso de reproducción que se inicia en la flor de las plantas. En las angiospermas las semillas se originan del tejido meristemático presente en la pared del ovario donde se forma el óvulo que después de ser fecundado continúa su desarrollo y madurez (Reyes, 1993).

Germinación.

Germinación es el proceso de reactivación de la maquinaria metabólica de la semilla y la emergencia de la radícula (raíz) y de la plúmula (tallo), conducentes a la producción de una planta. Fisiológicamente, la germinación comienza con las etapas iniciales de reactivación bioquímica y termina con la emergencia de la radícula. Morfológicamente y para el ensayo de semilla y propagación de plantas, la definición debe de incluir la producción de una plántula normal.

Por parte de la ISTA (1996), define la germinación de semillas como la emergencia y desarrollo de la plántula a un estado donde el aspecto de sus estructuras son esenciales indican si son o no capaces de desarrollarse en una planta satisfactoria y productiva bajo condiciones favorables de suelo y clima.

Hartman y Kester (1999) mencionaron que para que se inicie la germinación se necesita que:

- a) La semilla sea viable; es decir, que tenga un embrión vivo capaz de germinar.
- b) No deben existir barreras fisiológicas, físicas y químicas que induzcan al letargo e inhiban la germinación.
- c) Debe de estar expuesto a condiciones ambientales adecuadas que favorezcan la germinación.

Latencia

El término de latencia en semillas ha sido un fenómeno difícil de definir, así mismo se he utilizado para nombrar cierta clase de fenómenos, lo cual ha resultado en confusiones.

Conceptos

Salisbury (1994) define latencia como la condición de una semilla que no puede germinar aún cuando disponga de una amplia humedad externa, esté expuesta a condiciones atmosféricas típicas propias de suelos bien aireados o en la superficie de la tierra, y que la temperatura esté dentro del rango comúnmente asociado con la actividad fisiológica.

Besnier (1989) lo menciona a manera de “letargo” y lo define como fenómeno por el cual una semilla viable no germina cuando se coloca en un sustrato húmedo, aireado y a temperatura suficiente para sostener los procesos metabólicos que conducen a la germinación; salvo casos extremos, esta temperatura oscila entre los 20 °C y los 25 °C.

Una definición aplicada mas comúnmente es el que la latencia es un estado en el cual una semilla viable, disminuye su germinación bajo condiciones favorables de humedad, temperatura y oxígeno para el crecimiento (Reyes, 1993).

Ciertas semillas no germinan cuando recién colectadas, existe dos interpretaciones al respecto una es que la semillas necesitan un período de reposo antes de germinar y el otro es que requieren de ciertos cambios que se denominan post-maduración que operan durante su aparente reposo, estas condiciones pueden ser imitadas o aceleradas por tratamientos adecuados (Gouvea, 1983).

Khan (1981), menciona que la latencia en las semillas, puede ser debida a una obstrucción mecánica fisiológica, la cual evita la realización completa del potencial del crecimiento del embrión bajo condiciones moderadas.

Bidwell (1979), define el letargo como un período forzoso de baja actividad metabólica, bajo contenido de agua y nulo crecimiento, durante el cual la semilla es muy resistente a los rigores del frío y de la sequía.

Característica de la cubierta o testa de la semilla

a). La restricción mecánica al crecimiento del embrión y el conducto de ventilación puede evitar la germinación. Una forma de librarse de esta restricción es destruyendo o modificando las propiedades mecánicas de la cubierta de la semilla.

b). La cubierta de las semillas también evitan el intercambio gaseoso con el medio ambiente. El oxígeno es esencial para mantener los procesos de producción de energía y por lo tanto de que las semillas germinen necesitan oxígeno. Y esto puede ser limitado por la permeabilidad de la cubierta de la semilla (Harrinton, 1970).

c). La latencia puede ser impuesta por la cubierta de la semilla, ya que presenta inhibidores del crecimiento. Estas sustancias no son hormonas debido a que estas no han presentado el movimiento típico de una hormona (producción en algún lugar y acción en otro). Estas sustancias intervienen en los procesos químicos normales los cuales son característicos de los estados tempranos de la germinación.

Concentración de sustancias inhibidoras y promotoras del crecimiento

La latencia y la germinación quizá estén controladas por el balance entre promotores e inhibidores del crecimiento. Esta latencia puede ser considerada como resultado de la presencia de inhibidoras del crecimiento, ausencia de promotores del crecimiento, o la combinación de ambos, predominando los primeros. Los niveles de estos compuestos están controlados por ciertos estímulos ambientales, tales como: luz y temperatura (Copeland y McDonald, 1985).

Letargo químico de varias partes de la plantas se han extraído e identificado sustancias químicas que actúan como inhibidoras de la germinación. Estas sustancias se producen y se acumulan en los frutos así como en las cubiertas de las semillas. Algunas de las sustancias asociadas a la inhibición son diversos fenoles, cumarina y ácido abscísico (Hartmann y Kester 1995).

Inmadurez de la semilla

Los híbridos de frutales de hueso de maduración precoz son difíciles de obtener debido a que los embriones comúnmente abortan o no maduran lo suficiente antes de que el fruto sea cosechado. El aborto de los embriones, puede deberse a su desarrollo incompleto en cultivares de maduración precoz o a incompatibilidad genética en híbridos interespecíficos, en estos caso los embriones generalmente son pequeños y no se han desarrollado lo suficiente para germinar normalmente en el suelo.

Tratamiento para romper la latencia de la semilla

Para propósitos de propagación de plantas por semillas, es requisito indispensable la aplicación de métodos o practicas para romper la latencia dependiendo del tipo de que se trate o causa que la provoque. Generalmente no existe una sola causa que propicie la latencia lo que hace su rompimiento mas complicado (Perez, 1990)

Escarificación mecánica

Escarificación es cualquier proceso de romper, alterar mecánicamente o ablandar las cubiertas de las semillas para hacerlas permeables al agua y a los gases. En la escarificación mecánica, consiste en frotar las semillas en superficies abrasivas, tales como papel lija, piedra de carbonato de silicio o un escarificador eléctrico, que sirva para ocasionar pequeñas aberturas en la cubierta (Moreno, 1984).

Este método se ha utilizado cuando la latencia de la semilla se debe a la dureza de ésta; es decir, esta cuando las cubiertas de la misma actúan como una barrera física para la germinación a través de la cual se evita la expansión del embrión o el crecimiento de la radícula; o ya sea, restringiendo el suministro del agua o el intercambio gaseoso; por lo que es obvio que para esta latencia sea rota el mecanismo utilizado consistirá en afectar las cubiertas (Reyes, 1993).

Estratificación

La estratificación es un método de tratamiento de semillas en letargo en el cual las semillas embebidas en agua son sometidas a un periodo de enfriamiento para que se efectúe la postmaduración del embrión.

La estratificación ó pre-enfriamiento; consiste en someter las semillas a bajas temperaturas, normalmente entre 1-10° C por un periodo sustancial. Este método utilizado para establecimiento forestal de semillas invernantes o frutos en pepita, y es conocido como “Estratificación”. El periodo mas largo de enfriamiento de semillas intactas probablemente resulta de la existencia de tres mecanismos de latencia; la latencia del embrión, pericarpio duro y la presencia dura de inhibidores en la testa y pericarpio (Reyes, 1993)

Propagación in vitro.

La propagación *in vitro* es la técnica con la cual se lograr el desarrollo de nuevas plantas en un medio artificial en condiciones asépticas a partir de porciones muy pequeñas de plantas, tales como embriones, semillas, puntas de ramas, puntas de raíces, callo, células individuales y órganos de polen.

La propagación *in vitro* permite reproducir cientos de clones de una misma especie, los cuales posteriormente son llevados a un vivero y luego al campo de cultivo, donde se desarrollarán y darán lugar al producto de interés económico. También permite un control fitosanitario estricto, en especial en lo que se refiere a la obtención de plantas libres de virus, y es una herramienta de utilidad para el fitomejoramiento (Kyte y Kleyn, 1996).

El cultivo in vitro es la aplicación de técnica de tejidos a la regeneración y propagación comercial de plantas enteras, es un desarrollo más reciente que se ha convertido en una alternativa importante de los

métodos convencionales de propagación en una amplia gama de especies de plantas (Hartmann y Kester, 1999).

En el desarrollo de cultivo *in vitro* se puede regular efectivamente con la aplicación de reguladores de crecimiento, como también optimizar las condiciones nutricionales y física de los cultivos. La efectividad de reproducción *in vitro* es mucho mayor que la reproducción convencional (in vivo), por eso, en los procesos tecnológicos, se da preferencia al cultivo de yemas apicales y yemas axilares (Rivas, 2001).

La propagación in vitro es una de las áreas de mayor aplicación dentro del cultivo de tejidos. Comprende tres etapas fundamentales: establecimiento aséptico del cultivo, multiplicación, enraizamiento y su transplante al suelo (Cárdenas, 1993).

Proceso del cultivo in vitro

Etapas I: Establecimiento del cultivo. Consiste en la disección y tratamiento de la parte vegetativa de la planta original. Para desinfectar el explante se coloca en una solución de hipoclorito de sodio y fungicida o bactericida, en períodos independientes y tiempos variables. Una vez dado este tratamiento de desinfección, estas partes vegetativas se enjuagan en agua destilada y el explante se coloca en un medio de cultivo básico que contiene algún tipo de regulador de crecimiento. Los explantes permanecen en este medio durante unas dos semanas. Esto permite lo siguiente: a) la detección de explantes contaminados, b) efectuar la selección de los brotes de crecimiento más activo y más sanos para multiplicación posterior y c) efectuar cierto “acondicionamiento” de los tejidos.

Etapas II: Multiplicación. Ya reconocidos los explantes no contaminados, estos son transferidos a un nuevo medio modificado por la adición de reguladores que induzcan o estimulen el desarrollo de brotes axilares, esta función la tienen las citocininas.

Etapa III: Enraizamiento *in vitro*. Los brotes obtenidos en la etapa anterior se colocan en un medio nutritivo compuesto por sales inorgánicas, vitaminas y hormonas, de modo que sea factible la emisión de raíces de dichos brotes y posterior trasplante al suelo. Las auxinas son las más importantes para la inducción de raíces.

Etapa IV: Aclimatación. Consiste en la transferencia del material vegetativo a un ambiente diferente al original, implicando cambios de temperaturas, intensidad lumínica y humedad relativa, junto con la capacitación de otros factores importantes. Esta etapa ha sido definida como un proceso controlado, para adaptar un organismo a un cambio ambiental (Dunstan y Turner, 1984).

Krikorian (1991), Villalobos y Thorpe (1991) y Hartmann y Kester (1995) mencionan que existen varias vías para realizar propagación *in vitro*.

- a) Multiplicación de brotes de yemas terminales, axilares o laterales. El punto de inicio puede estar en los meristemas, las puntas de los brotes, las yemas ó los nudos.
- b) Organogénesis directa. La formación del brote o raíz adventicia ocurre en el explante de un tallo ó de la raíz.
- c) Organogénesis indirecta. La formación de brote adventicio o de la raíz ocurre en un callo inducido a partir del explante de tallo o raíz.
- d) Embriogénesis somática. Los embriones somáticos o embriones pueden formarse directamente en el explante primario, o indirectamente de las células cultivadas en suspensión o en un medio semisólido.

Ventajas del cultivo *in vitro*

- El cultivo *in Vitro* permite a los propagadores operar durante todo el año con la producción programada en forma más acorde a las ventas.
- Permite controlar condiciones ambientales como luz, temperatura y humedad (Hartman y Kester, 1999).

- Un explante puede ser multiplicado en varios miles de plantas en menos de un año. Una vez establecidos los cultivos se dispone de una fuente continua de micro-esquejes, sin importar la estación del año (Tapia y Hepp, 2004).
- Mayor rapidez en la introducción del producto debido a la selección individual de plantas élite, altos coeficientes de propagación, uniformidad en las plantas producidas y elevadas producciones en espacio reducido.
- Mayor calidad del producto: El valor del producto se incrementa como consecuencia de que se reproducen plantas libres de enfermedades y mejoramiento del fenotipo de las plantas (Tapia y Hepp, 2004)

Medio de cultivo

El medio de cultivo tiene dos funciones principales; la primera es proporcionar los nutrientes básicos para el crecimiento continuo de los explantes aislados y los propagados subsiguientes y la segunda función es dirigir el crecimiento y desarrollo mediante el control hormonal. Las clases primarias de hormonas son auxinas y citocininas, pero en situaciones específicas se utilizan giberélinas y el ácido abscísico; el control se realiza por:

- a. La clase de hormona o regulador del crecimiento.
- b. La concentración.
- c. La secuencia en que se proporcionen.

Una secuencia apropiada de hormonas es de importancia particular en cuanto a que una hormona puede tener un efecto inductor, pero luego debe estar ausente o en cantidad reducida para que crezca el órgano (Hartman y Kester, 1999).

Sales inorgánicas

Las sales inorgánicas proporcionan los macroelementos (nitrógeno, fosfato, potasio, calcio y magnesio) y microelementos (Boro, cobalto, cobre, manganeso, yodo, hierro, zinc).

Componentes orgánicos

Podemos clasificarlos en tres grupos: carbohidratos, sustancias hormonales y vitaminas. Frecuentemente se han obtenido buenos resultados cuando se emplean también ciertos aminoácidos y/o amidas, algunas purinas y hexitoles y ácidos orgánicos.

Carbohidratos

La sacarosa es un componente muy importante en cualquier medio nutritivo y es esencial para el crecimiento y desarrollo *in vitro*, ya que el crecimiento tiene lugar en condiciones poco apropiadas para la fotosíntesis o incluso en oscuridad. La sacarosa que se vende en los supermercados resulta generalmente adecuada. Se trata de un producto purificado y de acuerdo con el análisis de los fabricantes se compone de 99.94% de sacarosa, 0.02% de agua y 0.04% de otras sustancias (elementos inorgánicos como la fructosa y glucosa) (Pierik, 1990).

Vitaminas

Las vitaminas más utilizadas son la tiamina (de 0.1 a 0.5 mg/l), el ácido nicotínico (0.5 mg/l) y la piridoxina (0.5 mg/l), para la mayoría de los vegetales. En muchos cultivos resulta beneficioso el inositol, a razón de 100mg/l, que también se agrega en forma rutinaria. Todas estas son solubles en agua y se deben de preparar como soluciones concentradas, listas para disolverse 100x en la solución final (Harman y Kester, 1999).

Hormonas y reguladores de crecimiento

Se define como los compuestos orgánicos distintos de los nutrientes, que en pequeñas cantidades estimulan, inhiben o modifican de algún modo cualquier proceso fisiológico en las plantas.

Las hormonas son, por definición compuestos orgánicos sintetizados por las plantas superiores, que influyen sobre el crecimiento y desarrollo; actúan generalmente en lugar diferente a donde son producidas y se encuentran presentes y activas en muy pequeñas cantidades. Al conjunto de estos productos sintéticos, junto con las hormonas, se denominan reguladores y son los responsables, en primer lugar, de la distribución de los compuestos que la planta biosintetiza. También determinan el crecimiento relativo de todos los órganos de la planta (Pierik, 1990).

Los principales reguladores de crecimiento utilizados en la fase de propagación, in vitro son: las citocininas, auxinas y giberelinas (Grattapaglia y Machado, 1998).

Giberélinas

Este grupo de compuestos se utilizan generalmente en el cultivo in vitro de las plantas superiores, debido a que inducen la elongación de los entrenudos y el crecimiento de los meristemas o yemas; también pueden romper la dormancia de embriones aislados o yemas, a un que pueden inhibir la formación de raíces adventicias y la formación de vástagos adventicios (Pierik, 1990).

La giberélinas parecen transportarse fácilmente en el embrión hidratado por ser hidrosolubles y atravesar fácilmente las membranas celulares; inducen la acción de las encimas hidrolíticas existentes en las semilla y su nueva síntesis, intervienen en el metabolismo de la glucosa, en

la respiración y en la síntesis de nuevas proteínas, incluyendo las proteínas enzimáticas (Besnier, 1989).

Funciones de las giberelinas

Las giberelinas activas muestran muchos efectos fisiológicos; cada efecto depende del tipo de giberelina presente y de las especies. Algunos de los procesos fisiológicos estimulados por las giberelinas se indican a continuación (Davies, 1995; Riely, 1997; Salisbury y Ross, 1994):

- ❖ El tratamiento con concentraciones altas de giberelinas es eficaz para romper la latencia, al provocar una germinación rápida.
- ❖ Estimula el alargamiento del tallo, induciendo división y alargamiento celular.
- ❖ Induce a la floración temprana en plantas jóvenes.
- ❖ Estimula la producción de la enzima (α -amilasa) para la movilización de reservas de semilla en la germinación de granos y cereales.
- ❖ Puede causar partenocarpia en frutos.

Citocininas

Las citocininas son utilizadas frecuentemente en la estimulación del crecimiento y desarrollo, generalmente provocan la división celular y mejoran su actividad si van en compañía de las auxinas; generalmente concentraciones altas inhiben el desarrollo de raíces (Pierik, 1990). Las citocininas comúnmente usadas en los medios de cultivo son: Kinetina, benziladenina y zeatina, las primeras dos son compuestos sintéticos y la última se encuentra en forma natural en la planta (Dodds y Roberts; 1990).

Funciones de las citocininas

- Estimulan la división celular y el crecimiento
- Inhiben el desarrollo de raíces laterales
- Rompen la latencia de las yemas axilares

- Promueven la organogénesis en los callos celulares
- Retrasan la senescencia ó envejecimiento de los órganos vegetales
- Promueven la expansión celular en cotiledones y hojas
- Promueven el desarrollo de los cloroplastos.

Sostenes inertes.

El agar es un derivado de una alga marina, que se usa como agente gelificante en la mayor parte de los medios nutritivos. El agar es un polisacárido con una elevada masa molecular, que tiene la capacidad para gelificar los medios, resulta con facilidad, el componente más caro de los medios nutritivos sólidos.

El agar disuelto forma un gel que es capaz de retener el agua (a mayor concentración de agar, mayor fuerza con el que el agua es retenida) y absorbe compuestos. El tipo de agar también afecta el crecimiento y desarrollo. Cuando mayor es la calidad y la pureza del agar, mejor gelifica (Pierik, 1990).

pH

Se conoce poco la influencia del pH del medio nutritivo en el cultivo *in vitro*. Se supone que el pH en el rango de 5-6.5 es apto para el crecimiento, con un máximo alrededor de 6.0. Un pH bajo (menor de 4.5), o alto (mayor que 7), generalmente frena el crecimiento y desarrollo *in vitro*. Si el pH es demasiado bajo pueden presentarse las siguientes complicaciones.

- ❖ El agar pierde su rigidez.
- ❖ Algunas sales (fosfatos o hierro) pueden precipitar.
- ❖ La vitamina B1 y el ácido pantoténico se hacen menos estables.
- ❖ Se retarda la absorción de iones amonio (Pierik, 1990).

Germinación in vitro del durazno

La rápida multiplicación clonal de plantas es deseable para acortar los programas de mejoramiento en árboles frutales. La estratificación *in vitro* de embriones inmaduros ha permitido mejorar tasas de germinación y reducir el tiempo requerido en el desarrollo de nuevos híbridos (Daorden *et al.*, 2001).

Daorden *et al* (2004) trabajaron con dos temperaturas de estratificación (0 y 4 °C) en germinación de embriones de híbridos interespecíficos Myroobolan (*Prunus cerasifera* Ehrh.) Clones (Mb1, Mb2, Mb3), fueron cruzados con chabacano (*Prunus armeniaca* L.). Las frutas inmaduras fueron cosechadas a los noventa días después de la polinización. De las semillas fueron extraídos los embriones en condiciones asépticas. Los embriones fueron sembrados en el medio Cheé y Pool (1987), sin reguladores de crecimiento. Después de un período de estratificación de ocho semanas, los embriones fueron considerados germinados cuando la radícula medía 5mm de longitud. Teniendo resultados de un 91% de germinación de las semillas inmaduras cuando la temperatura de estratificación fue 4 °C y el 21% de semillas germinadas a 0 °C

Marín *et al* (2003) trabajaron en rescate de embriones, de semillas obtenidas de polinización cruzada realizadas a mano, de tres clones de Myroobolan utilizando flores de chabacano y polen del cultivar Maniquí. A los 70 días después de la floración los frutos fueron cosechados, las semillas se extrajeron de las frutas en condiciones asépticas y los embriones fueron rescatados y sembrados en el medio Cheé y Pool (1987) con la tiamina (1.19mM) y la sucrosa (87.6mM), sin reguladores de crecimiento. Los embriones fueron considerados germinados cuando revelaron un desarrollo de la radícula de 5mm de longitud. Después de un período de estratificación a 4 °C en obscuridad, las semillas fueron colocadas en una cámara de crecimiento con una temperatura de 24 °C, un fotoperíodo de 16 horas y 35 $\mu\text{mol}^{-2} \text{s}^{-1}$ de intensidad lumínica. De un total de 419 semillas, se obtuvo un índice de la germinación de 81.4%, teniendo un éxito en el rescate de el

73% de las semillas que posiblemente podrían abortar.

Koukhartchik y Semenas (2003) trabajaron con una población híbrida, de cerezas de maduración temprana ('Gronkavaya' 'Narodnaya', 'Subarovskaya' 'Ranniaya Rozovaya') y de los híbridos interespecíficos de *Prunus L.* Los frutos fueron cosechados a 24–52 días para *P. avium*, 45 – 60 días para híbridos interespecíficos de *Prunus*, el crecimiento de los embriones fue en un medio Murashige y Skoog adicionado con lo siguiente: 2.0–3.0% de sucrosa, 0.6–0.7% de agar, 1.0–2.0 mg/l de GA₃, 0.1–1.0 mg/l de IBA. Los embriones fueron estratificados *in vitro* de (3-5 °C) en oscuridad durante 60–65 días tiempo en el cual germinaron. El 82.0 - 91.9% de plantas regeneradas que habían pasado el período de estratificación tenían el nivel más alto de desarrollo (con dos o más pares de hojas).

Chopra – HR *et al* (1994) utilizando semillas de F1 de duraznos de maduración temprana los cuales normalmente se generaron bajo los sistemas convencionales de estratificación y producción en vivero presentaron una germinación de semilla híbrida de la cruce entre florddasum y shorbato que fue incrementado de 2.5 a 87% mediante el cultivo aséptico de embriones. Las bajas temperaturas fueron benéficas para la germinación *in vitro*.

El rescate de embriones se ha utilizado también con éxito para superar la carencia de la viabilidad en híbridos interespecíficos. Es útil cuando hay pobre desarrollo o aborto del embrión. Las barreras del Post-zygotic en híbridos interespecíficos son una ocurrencia común pero pueden ser superadas con el uso del rescate de embriones (Romming, 1990).

Bassi- D; infante- R. (1994) al efectuar trabajos *in vitro* encontraron que es el desarrollo de semilla de embriones inmaduros la germinación varió de acuerdo al cultivo de cerezo el más alto vigor fue de Bigarreau burlar, que en comparación con Bigarreau Moreau. La alimentación resulto fallida debido a que el desarrollo de la raíz primaria fue superada por la formación de un sistema de raíces capilares como un resultado de la primera poda de

raíces *in vitro*. La vernalización a 5 °C durante 30 días fue efectiva en incrementar el porcentaje de germinación en cereza y nectarinas pero no en durazno Springerest.

Pinto- A. *et al* (1994) encontraron que la aplicación de L- Glutamina (400 Mg. /Litro) promovió e incremento el crecimiento del embrión pero el ácido indolacético más kinetina no logro debido a que ocurrió un efecto antagónico, el uso de estos reguladores no incrementan el crecimiento del embrión *in vitro* en duraznos Sungcrest y Earlygrande.

Liu-Vs *et al* (1991) al utilizar durazno cv. Simong *laomi* y medios de cultivo: Nitsch, NG, MT, SH modificado BT1 y BT2 con varias concentraciones de BA, tria conatol y ácido indolacetico se obtuvieron 97.2 y 96.6 % de germinación con los medios Mt y SH Media respectivamente.

Scozzoli A; Pasini D. (1993) experimentando con semillas de 2 cultivares de maduración muy temprana de durazno (Springcrest y Maycrest), cultivados en el medio liquido Stewart y SH conteniendo 0.03 mg/l. Ácido giberelico a 25 °C. en oscuridad por 2 semanas, diferentes azucares como sacarosa, glucosa, fructuosa y sorbitol, y glutamina (0, 25, 50 y 100 mg/l). Los embriones de las semillas fueron transferidos dentro de un medio sólido por 2 meses a 2 °C , después de germinación se pusieron a 20-25 °C, bajo 15 horas luz y 15 días después fueron evaluados en porcentaje de germinación, crecimiento y número de plántulas buenas. La técnica fue eficiente en el alargamiento de los embriones; solamente los embriones largos desarrollaron buenas plantas. Los mejores resultados fueron en el medio contenido sucrosa, fructosa, y fructosa más glucosa. Glutamina no tuvo efecto a concentración de 50 mg./l., las altas concentraciones fueron negativas.

López (1990), quien trabajo con la organogénesis de embriones de durazno 'Flordaprice' de 50 y 60 días después de plena floración, se mantuvieron cultivados en un medio básico de Murashige y Skoog, modificado con 3% de

sacarosa, 1mg^{-1} de ácido diclorofenoxiacético (2, 4 -D) y 0.6% agar y el pH ajustado a 5.7, se regeneraron estructuras de tipo embrioide, brotes y plantas completas. Estos resultados demostraron la posibilidad de utilizar embriones inmaduros como fuente de inóculo para regenerar plantas de duraznos de maduración temprana.

Barboza *et al.* (1990) trabajaron con embriones de 10 duraznos y nectarinas los cuales fueron cultivados en un medio MS conteniendo BAP a concentraciones de 0,5, 10, 15 y 20 mg/L. El mejor desarrollo de embriones se obtuvo con niveles de 5 y 10 mg/L.

Hersse y Kester, (1955) utilizando un índice de medición comparativo que determinaron PF_1 que relaciono la longitud del embrión entre la longitud de la semilla por 100, encontrando que el valor mínimo crítico para el rescate de embriones de durazno fue un $PF_1 = 70$.

Ramming (1990) rescato embriones de 5–10 mm. de longitud con un $PF_1 = 25$. Este desarrollo estableció de igual forma un tamaño de cotiledón que relaciono su longitud con el respecto al desarrollo mínimo del embrión para hacer posible su rescate, por lo que el tamaño mínimo, para asegurar su rescate de embriones, debe de ser $2/3$ de su tamaño normal.

Raghavan, (1976) menciona, que en los ciclos del mejoramiento se han acortado por medio del cultivo *in vitro* de embriones, por superar el período de reposo, ya que los embriones crecen inmediatamente, reduciéndose con esto el tiempo de polinización a la obtención de fruta de la progenie.

Turkey *et al* (1933) reportan que la fuente de energía en el medio de cultivo los carbohidratos que en el caso del cultivo de embriones de *Prunus* se ha señalado es esencial, además se les ha considerado también como modificadores de la presión osmótica y la mejor fuente es la sacarosa.

Davidson (1934) sugirió que los embriones de cultivares de durazno de madurez temprana podrían cultivarse antes de que abortaran, lo cual permitiría a los genotecnistas de frutales cruzar dos cultivares de maduración precoz donde anteriormente solo se podía usar cultivares de media estación o tardíos como progenitores femeninos.

Rappaport, (1954) señala que la concentración óptima de azúcar en el medio varía con la edad del embrión al momento de su extracción óptima; mientras mas jóvenes sean los embriones se han requerido concentraciones mayores.

Respecto a los resultados del cultivo *in vitro* de embriones, en general han sido muy diversos, ya que tienen influencia significativa algunos factores, como lo es el tamaño del embrión, el cual se ha determinado numéricamente mediante la siguiente fórmula: Grado de desarrollo del embrión = GDE = longitud del embrión/longitud del óvulo X100, de tal manera que se ha determinado que los embriones con alto GDE, germinan, mejor, respecto a aquellos que con bajo GDE (Davison, 1934; Turkey, 1934, Herse y Kester, 1955; Theobald y Hough, 1960; Zagat et al., 1960)

Padron (1991) determinó que el grado de desarrollo del embrión al momento de la siembra define el tiempo que tarda el ovulo en completar su desarrollo y germinación del embrión para dar origen a una planta de durazno.

Cultivo de embriones como una técnica práctica para la genotecnia de frutales, con énfasis en prunus.

Los problemas que limitan el uso de cultivo de embriones como una técnica práctica para la genotecnia de frutales incluyen a los siguientes:

- a. Es crítico el estado de desarrollo del embrión para evitar el aborto y dar mejor germinación, crecimiento y sobre vivencia de las plántulas.

- b. Es esencial que la técnica sea aséptica.
- c. El medio debe ser el correcto para el desarrollo del embrión y para la especie. Generalmente entre más pequeño es el embrión, más especializado es el medio necesario
- d. En comparación con la estratificación convencional y la germinación, un factor limitante en el cultivo aséptico de embriones es el costo extra en el equipo, infraestructura y el tiempo requerido.
- e. La investigación puede llevarse a cabo solamente una vez al año.

Estos problemas no deben ser barreras insuperables si se demostrara que el cultivo de embriones es efectivo y eficiente para desarrollar poblaciones híbridas específicas.

MATERIALES Y MÉTODOS

La presente investigación se realizó en el laboratorio de Cultivo de Tejidos y Análisis Minerales del Departamento de Horticultura de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, en Buenavista, Saltillo Coahuila, México, en el período comprendido de julio de 2005 a febrero de 2006.

Material vegetativo

El material vegetativo utilizado fueron semillas de árboles de durazno de la variedad Diamante de siete años de edad (con un período de floración a cosecha de 110 días), con un tamaño de fruto de 130 – 140gr, firme de buena forma y sabor, árbol vigoroso. Requiere de 250 horas frío.

Descripción de los tratamientos

Se prepararon dieciséis tratamientos, con cinco repeticiones (una repetición = un frasco), cada frasco contenía un embrión, dando un total de 80 unidades experimentales. Se establecieron dos experimentos: Experimento I Semilla cosechada a los 75 días después de la floración, Experimento II semilla cosechada a los 95 días después de la floración. Para cada experimento, los tratamientos quedaron conformados de la siguiente manera.

T1 = $\frac{1}{2}$ MS + 0 ppm de ácido giberélico

T2 = $\frac{1}{2}$ MS + 1 ppm de ácido giberélico

T3 = $\frac{1}{2}$ MS + 10 ppm de ácido giberélico

T4 = $\frac{1}{2}$ MS + 100 ppm de ácido giberélico

T5 = $\frac{1}{2}$ MS + 0 ppm de kinetina

T6 = $\frac{1}{2}$ MS + 2 ppm de kinetina

T7 = $\frac{1}{2}$ MS + 4 ppm de kinetina

T8 = $\frac{1}{2}$ MS + 8 ppm de kinetina

T9 = $\frac{1}{4}$ MS + 0 ppm de ácido giberélico

T10 = $\frac{1}{4}$ MS + 1 ppm de ácido giberélico

T11 = $\frac{1}{4}$ MS + 10 ppm de ácido giberélico

T12 = $\frac{1}{4}$ MS + 100 ppm de ácido giberélico

T13 = $\frac{1}{4}$ MS + 0 ppm de kinetina

T14 = $\frac{1}{4}$ MS + 2 ppm de kinetina

T15 = $\frac{1}{4}$ MS + 4 ppm de kinetina

T16 = $\frac{1}{4}$ MS + 8 ppm de kinetina

Establecimiento del experimento

Preparación del medio de cultivo

La preparación del medio de cultivo se realizó, cuatro días antes de la siembra con el fin de asegurar que no existiera contaminación en el medio de cultivo. En el presente trabajo se utilizó el medio MS (Marashige and Skoog, 1962) con un medio y con un cuarto de la concentración normal de sales, adicionándole diferentes concentraciones de Acido Giberélico y Kinetina en los diferentes tratamientos establecidos.

Cuadro 3.1. Composición del medio nutritivo de Marashige y Skoog.

Macronutrientes.	Gramos litro ⁻¹ .
NH ₄ NH ₃ ▲	16.5
KNH ₃	19
CaCl ₂ .2H ₂ O	3.3217
KH ₂ PO ₄	1.7
MgSO ₄ .7H ₂ O	3.7
Micronutrientes.	
KI	0.0083
H ₃ BO ₃	0.062
MnSO ₄ .4H ₂ O	0.12
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0.086
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.0025
CoCl ₂ .6H ₂ O	0.00025
Na ₂ MoO ₄ .H ₂ O	0.00025
Na ₂ EDTA	0.373
FeSO ₄ .7H ₂ O(°T)	0.278
Vitaminas.	
Inositol	1
Ac. Nicotínico	0.005
Piridpxina HCL	0.001
Tiamina HCL	0.001
Glicina	0.02
Carbohidratos	
Sacarosa	30
Solidificante	
Agar	8-9
Ph	5.7

Colecta del material a utilizar

Los frutos fueron cosechados en el municipio de Tetela del volcán, Morelos y fueron trasladados a la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Se realizaron dos cosechas en campo, tomando como parámetro el diámetro ecuatorial del fruto, la primera cosecha fue a los 75 días después de floración y los mismos median 3.0 cm de diámetro. La segunda cosecha en campo se realizó a los 95 días después de floración, los frutos presentaban un diámetro de 4.0 cm.

Despulpe de los frutos

Obteniendo los frutos de durazno, fueron despulpados para obtener el endocarpio o hueso, de los cuales posteriormente fueron extraídos los embriones inmaduros.

Desinfección del material

Teniendo el endocarpio o hueso, fueron lavados previamente, colocándose en recipientes que contenían una solución de hipoclorito de sodio al 10%.

Escarificación de la semilla de durazno

Se realizó la escarificación con el fin de romper la barrera (testa o cubierta) que limita la germinación. De manera manual utilizando unas tijeras de podar.

Siembra de los embriones inmaduros

La siembra de los embriones fue realizada en la campana de flujo laminar, las semillas ya obtenidas se pasaron a vasos de precipitado, los cuales contenían una solución de hipoclorito de sodio al 10%, donde permanecieron por tiempo de 5 minutos, posteriormente se eliminó la cubierta membranosa que protege a los cotiledones, obteniendo de esta manera los embriones, los cuales fueron sembrados en el medio de cultivo e introducidos al refrigerador para el proceso de estratificación.

Estratificación de semilla de durazno

Se realizó para cada fecha de siembra por un período de 60 días a una temperatura que oscilaba entre (4–6 °C), los frascos que contenían los embriones se cubrieron con cajas de cartón para no permitirles la entrada de la luz y se metieron en un refrigerador.

Crecimiento de las plántulas

El crecimiento de las plántulas se realizó en una incubadora con un fotoperíodo de 16 horas luz, proporcionado por lámparas fluorescentes, con intensidad lumínica de (1000 lux), una temperatura diurna de 25 °C y durante la noche 18 °C, permaneciendo por un período de 12 días.

Parámetros evaluados

Germinación

La evaluación se realizó de manera visual cada cuatro días a partir de que la semilla presentara el promedio 5 mm de longitud de la radícula para que se considerara germinada.

Longitud de la radícula

Con la ayuda de una regla graduada, se midió la longitud de la raíz.

Longitud de plántula

Se utilizó una regla graduada, midiendo desde la base del cotiledón hasta la última hoja de la plántula.

Análisis Estadístico

Se usó un diseño completamente al azar con arreglo factorial de 2X2X4 en 5 repeticiones; donde el factor A son las concentraciones del medio de cultivo en $\frac{1}{2}$ y $\frac{1}{4}$ de la solución normal del medio MS; factor B son las hormonas utilizadas giberelinas y kinetinas; y factor C que son las

diferentes concentraciones de las dos hormonas, giberelinas 0, 1, 10, 100 ppm y kinetina 0, 2, 4, 8 ppm, cuyo modelo estadístico es el siguiente.

$$Y_{ijkl} = \mu + \alpha_i + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} + \delta_k + (\alpha\delta)_{ik} + (\beta\delta)_{jk} + (\alpha\beta\delta)_{ijk} + EE_{ijkl}$$

Donde:

$i = 1, 2$ concentraciones del medio de cultivo.

$j = 1, 2$ hormonas agregadas al medio de cultivo.

$k = 1, 2, 3, 4$ concentraciones de las hormonas en ppm agregadas a los medios de cultivo.

$l = 1, 2, 3, 4, 5$ número de repeticiones en cada uno de los tratamientos.

EE_{ijkl} = Error experimental

Para:

Y_{ijkl} = Variable aleatoria observable correspondiente al i -ésimo nivel del medio de cultivo, a la j -ésima hormona agregada al medio, a la k -ésima concentración de ambas hormonas agregadas al medio, l -ésima repetición.

μ = Media general

α_i = Efecto del i -ésimo nivel del medio de cultivo.

β_j = Efecto del j -ésimo nivel de hormonas agregadas al medio.

$(\alpha\beta)_{ij}$ = Efecto interactivo entre el i -ésimo nivel del medio de cultivo y con j -ésimo nivel de hormona agregada al medio de cultivo.

δ_k = Efecto del k -ésimo nivel de concentración en ppm de ambas hormonas.

$(\alpha\delta)_{ik}$ = Efecto interactivo entre el i -ésimo nivel del medio de cultivo y con k -ésimo nivel de concentración en ppm de ambas hormonas agregadas al medio de cultivo.

$(\beta\delta)_{jk}$ = Efecto interactivo entre el j -ésimo nivel de hormonas agregadas al medio y k -ésimo nivel de concentración en ppm de ambas hormonas.

$(\alpha\beta\delta)_{ijk}$ = Efecto interactivo entre el i-ésimo nivel del medio de cultivo, j-ésimo nivel de hormonas agregadas al medio de cultivo y el k-ésimo nivel de concentración en ppm de de ambas hormonas agregadas al medio de cultivo.

EE_{ijk} = Error experimental.

Se realizó el ANVA para cada una de las variables, para las variables con significancia estadística se utilizó la prueba de rango múltiple de Duncan ($p \leq 0.05$) utilizando el programa SAS versión 6.13 (SAS, Institute, 1997).

Se utilizó la transformación $\sqrt{X + 0.05}$ en las variables longitud de radícula y longitud de plántula.

RESULTADOS Y DISCUSION

Experimento I. Semilla cosechada a los 75 días después de la floración

Germinación

En la Figura 4.1, se presenta el efecto del AG₃ en ppm, en un ½x del medio MS, en la cual se observa que para 40 días bajo condiciones de estratificación, los porcentajes mayores de germinación fueron de un 40% con AG₃ a 1 y 100 ppm; a los 57 días se aprecia que a estas mismas concentraciones alcanzaron un 80%, observándose las concentraciones de 0 ppm con 60% y de 10 ppm con un 40%; a los 60 días las concentraciones de 100 y 10 ppm presentan el 100% de germinación.

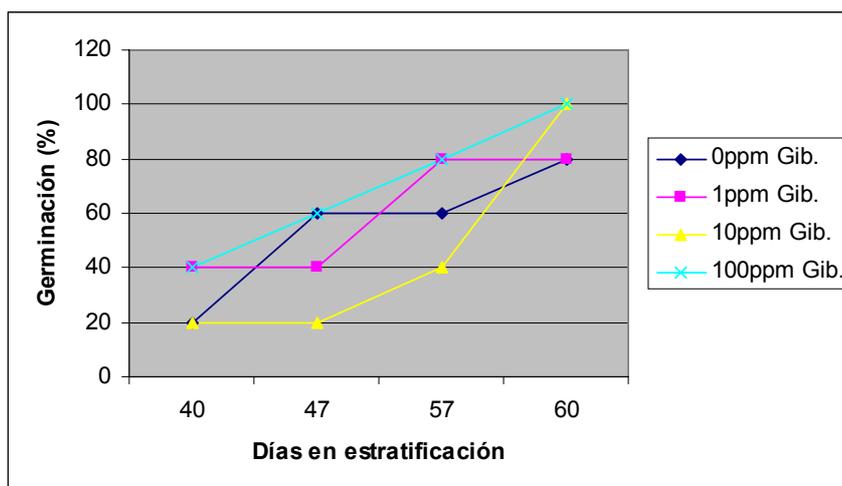


Figura. 4.1 Germinación de embriones de 75 días de durazno en ½x del medio MS más AG₃, bajo condiciones de estratificación.

Analizando el comportamiento de la germinación (Figura 4.2) en ¼x del medio MS más AG₃, se observa que a los 40 días de estratificación los porcentajes menores fueron de un 20% con 1, 10 y 100 ppm; a los 57 días la germinación más alta es de 80% con 1 y 100 ppm, las concentraciones restantes oscilaron entre un 50 y 40%; para los 60 días a 100, 1 y 0 ppm alcanzaron un 100% de germinación.

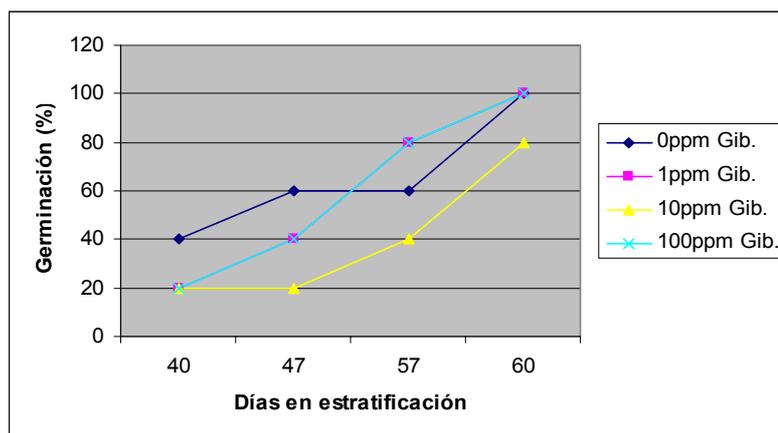


Figura. 4.2 Germinación de embriones de 75días de durazno en $\frac{1}{4}x$ del medio MS más AG_3 , bajo condiciones de estratificación.

Al comparar los dos medios de cultivo y después de 60 días de estratificación (Figura. 4.3) se observa que la germinación fue de 100% con todas las concentraciones de AG_3 especialmente con $\frac{1}{4}x$ del medio MS. Mientras que con $\frac{1}{2}x$ del medio MS fue de un 80% con 0 y 1 ppm AG_3 siendo la germinación numéricamente diferente pero no estadísticamente significativa (Cuadro 1A) la mayor germinación obtenida con $\frac{1}{4}x$ del medio MS que con $\frac{1}{2}x$ del MS se puede deber a que con una mayor concentración de sales se genera un efecto osmótico que reduce la entrada del agua al embrión ó al efecto negativo de alguno de los componentes del medio nutritivo sobre el proceso de la germinación. También podemos concluir que el AG_3 estimula la germinación, pero solo con $\frac{1}{2}x$ del medio MS.

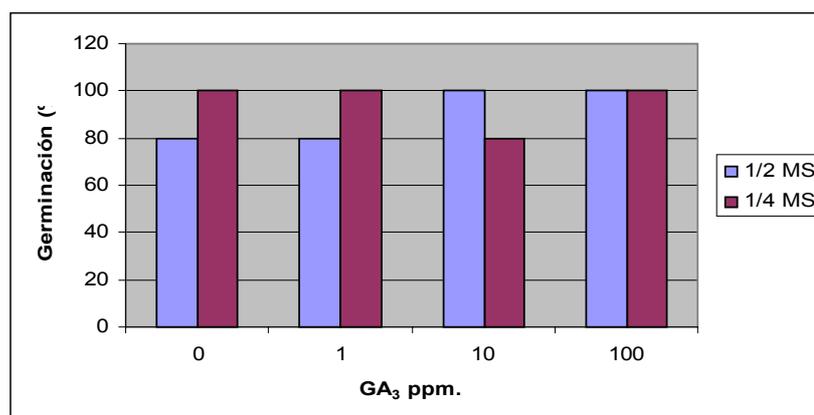


Figura 4.3 Efecto del AG_3 y la estratificación por 60 días, en dos niveles de concentración del medio de cultivo MS, sobre la germinación de embriones de 75 días de durazno.

La germinación a $\frac{1}{2}x$ del medio MS más kinetina (Figura 4.4), se observa que a los 40 días de estratificación con 2 ppm alcanza un porcentaje del 40%, durante esta fecha las concentraciones 8, 4 y 0 ppm son los porcentajes más bajos con un 20%; a los a los 57 días las concentraciones 2 y 4 ppm alcanzan un 80% de germinación; a los 60 días se aprecia que a 2, 4 y 8 ppm kinetina se obtienen el 100% de la germinación, mientras que con 0 ppm se quedo en un 80%.

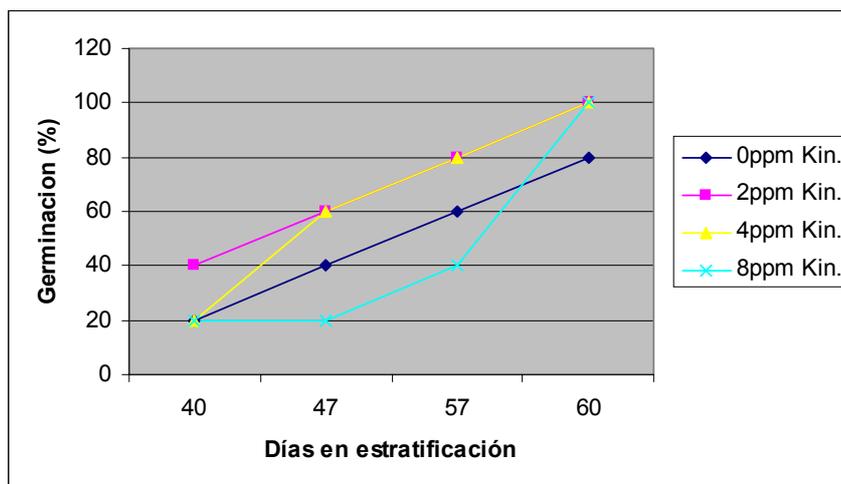


Figura. 4.4 Germinación de embriones de 75 días de durazno en $\frac{1}{2}x$ del medio MS más kinetinas, bajo condiciones de estratificación.

La Figura 4.5, muestra el comportamiento de la germinación con $\frac{1}{4}x$ del medio MS más kinetina, observándose que a los 40 días el porcentaje más alto es de 40% a 8, 0 ppm; para los 57 días se aprecia que con 2 ppm alcanza un 80%, las concentraciones restantes presentan un 60% de germinación; a los 60 días se obtiene un 100% a 2, 4 y 0 ppm de kinetina; que dándose en un 80% con 8 ppm de kinetina.

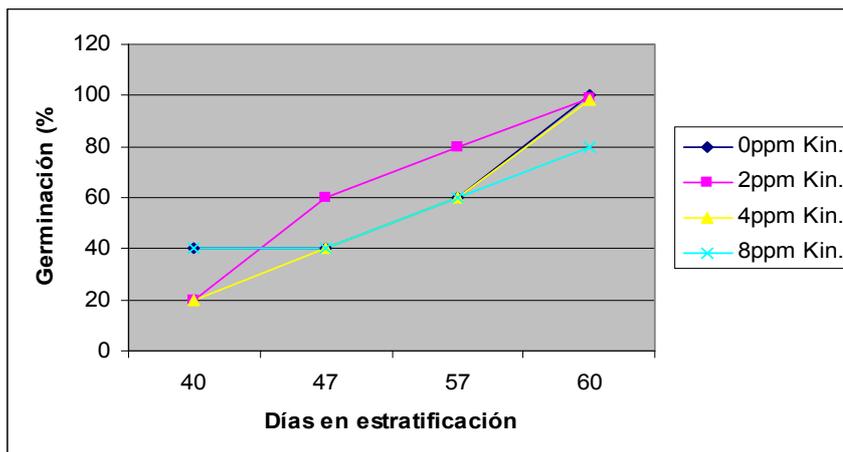


Figura 4.5. Germinación de embriones de 75 días de durazno en $\frac{1}{4}x$ del medio MS más kinetina, bajo condiciones de estratificación

Con lo que respecta a la Kinetina (Figura 4.6), se observa que con $\frac{1}{2}x$ del medio MS, se observa que a todos los tratamientos que se les adicionó kinetina presentan los porcentajes mayores de germinación, con respecto a 0ppm que sólo llegó al 80%. Con $\frac{1}{4}x$ del medio MS, se aprecia que con 4 y 0 ppm de kinetina presentaron un 100% de germinación, en 2 y 8 ppm se obtiene un 80 por ciento.

Podemos concluir que no es necesario agregar ni AG_3 ni kinetinas al medio de cultivo para obtener un 100% de germinación pero que es necesario utilizar un $\frac{1}{4}x$ del medio MS.

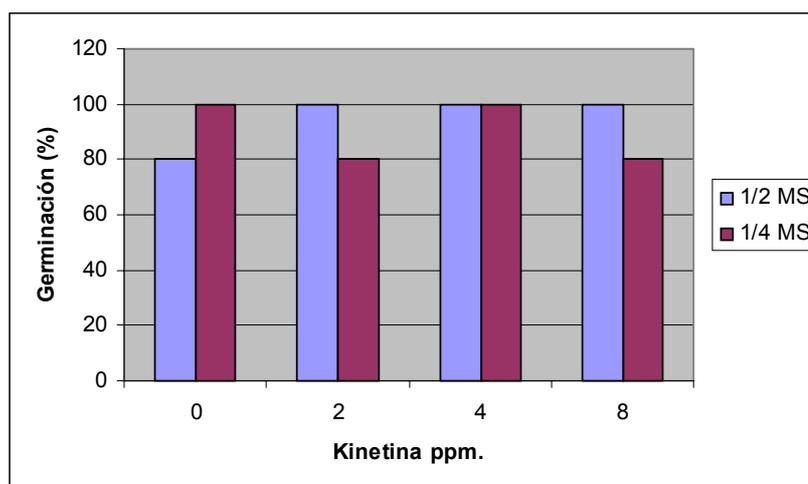


Figura 4.6 Efecto de la Kinetina y la estratificación por 60 días, en dos niveles de concentración del medio de cultivo MS, sobre la germinación de embriones de 75 días de durazno.

Longitud de raíz.

En la variable longitud de raíz en el (cuadro 2A), se presenta el análisis de varianza donde la comparación de medias muestran, que existe diferencias altamente significativa ($\alpha = 0.05$) entre el factor hormona, factor dosis así como la interacción entre hormona y dosis.

De acuerdo a la Figura 4.7, encontramos que con $\frac{1}{2}x$ del medio MS, obtuvimos la mejor respuesta en longitud de la raíz de 3.9 cm a 1ppm AG₃, en comparación con 0 ppm la longitud es de 3.2 cm, se aprecia que las demás concentraciones presentan una menor longitud de raíz. El efecto del AG₃ en un $\frac{1}{4}$ del medio MS, se aprecia que la mejor longitud de raíz es de 4.6 cm a 0 ppm, seguido de 3.6 cm a 100 ppm. Siendo a $\frac{1}{4}x$ del medio MS en la cual se obtienen la mejor longitud de raíz. Se aprecia que tanto en $\frac{1}{2}x$ y $\frac{1}{4}x$ el AG₃ tendió a inhibir el crecimiento de la raíz.

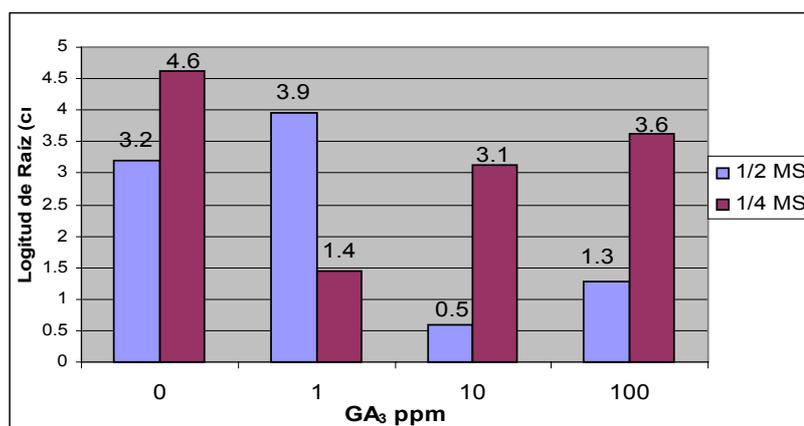


Figura 4.7 Efecto del AG₃, en dos niveles de concentración del medio de cultivo MS, sobre la longitud de raíz en embriones de 75 días de durazno.

Con lo que respecta al efecto de la kinetina con $\frac{1}{2}x$ del medio MS (Figura 4.8), la mejor respuesta en longitud de raíz es de 5.9 cm a 2 ppm, seguido por 5.8 cm a 4 ppm, comparando con 0ppm que presenta una longitud de 3.7 cm.

Con $\frac{1}{4}x$ del medio MS y el efecto de kinetina en la longitud de raíz, a 2 ppm se obtiene 6.7 cm, comparando con 0 ppm que presenta una longitud

de 4.0 cm. Se aprecia que a medida que se incrementa la dosis de kinetina en ppm la longitud de raíz, se estimula, pero después se inhibe a las dosis más altas.

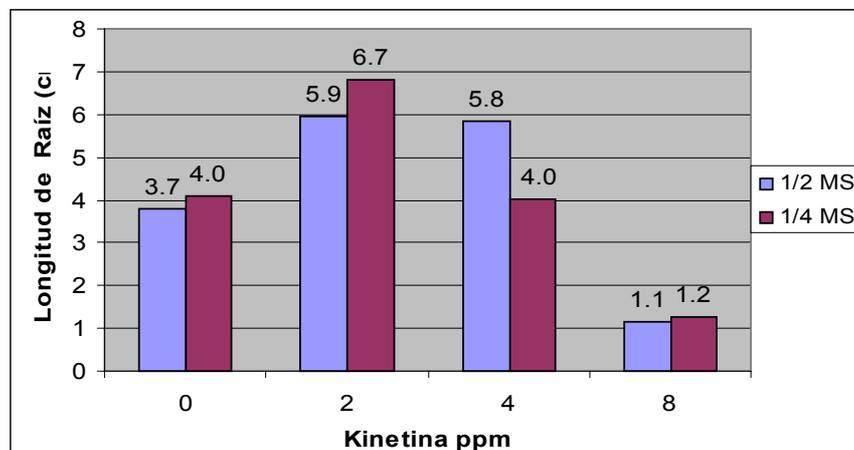


Figura 4.8 Efecto de la Kinetina, en dos niveles de concentración del medio de cultivo MS, sobre la longitud de raíz en embriones de 75 días de durazno.

Comparando AG₃ y Kinetina el regulador que mejor respuesta presenta en longitud de raíz es la kinetina, en los dos niveles del medio de cultivo lo cual, puede deberse a que las giberélinas inducen el alargamiento celular del los tallos y no de las raíces, mientras que las citocininas inducen la división celular en las raíces.

Longitud de tallo.

En la variable longitud de tallo en el Cuadro 3A, se presenta el análisis de varianza donde la comparación de medias demuestran, que existe diferencia altamente significativa ($\alpha = 0.05$) entre el factor hormona, factor dosis así como la interacción entre hormona y dosis.

En cuanto al efecto que presenta el AG₃ en la longitud del tallo (Figura 4.9), a 1/2x del medio MS, se obtiene una longitud de 3.0 cm a 0 ppm, seguido de 2.3 cm a 1 ppm, mientras que a 100 ppm tiene 1.8 cm, la menor longitud se presenta con 10ppm AG₃. Los resultados obtenidos a 1/4x del medio MS, el efecto que presenta el AG₃, la mejor longitud de tallo es 4.3 cm

a 100 ppm, en comparación con 0 ppm teniendo 2.9 cm de longitud, se puede observar que a 10 ppm la longitud del tallo es numéricamente la más baja.

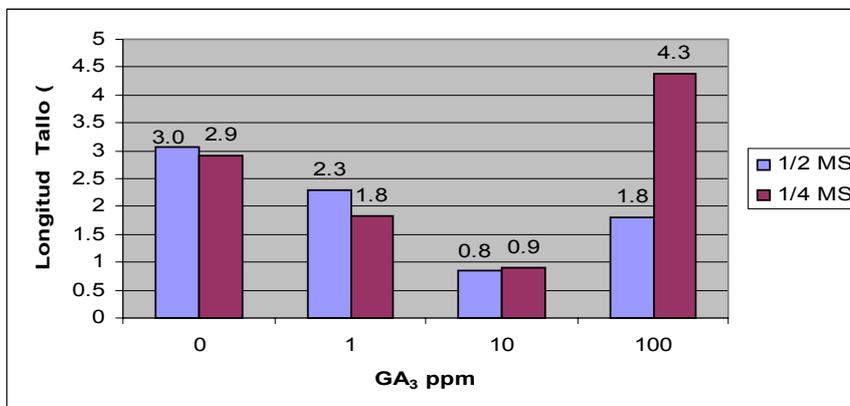


Figura 4.9 Efecto del AG₃, en dos niveles de concentración del medio de cultivo MS, sobre la longitud de tallo en embriones de 75 días de durazno.

En la Figura 4.10, se presenta el efecto de la kinetina con $\frac{1}{2}x$ del medio MS en la longitud del tallo, se obtuvieron los mejores resultados a 2 ppm con 3.4 cm, seguido de 2.9 cm a 4 ppm, comparado con 0 ppm con 2.5 cm. En cuanto a $\frac{1}{4}x$ del medio MS, se aprecia que a 2 ppm fue lo óptimo para la longitud del tallo, se aprecia también la tendencia a que a medida que se incrementa la concentración de kinetina la longitud del tallo es menor. La mayor longitud de tallo se obtuvo con AG₃, pero únicamente con 100 ppm y utilizando $\frac{1}{4}x$ del medio MS. La kinetina estimula la longitud de tallo a bajas dosis y luego inhibe a mayores concentraciones.

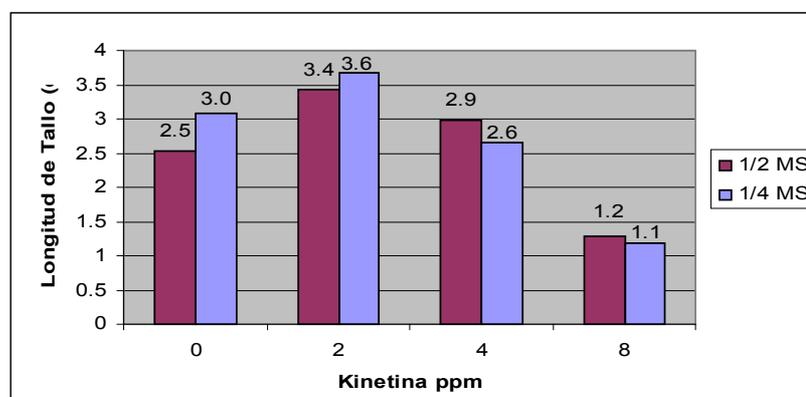


Figura 4.10 Efecto de kinetina, en dos niveles de concentración del medio de cultivo MS, sobre la longitud de tallo, en embriones de 75 días de durazno.

Experimento II semilla cosechada a los 95 días después de la floración

Germinación.

En la variable germinación (cuadro 4A), se presenta el análisis de varianza donde la comparación de medias muestra, que existe diferencia altamente significativa ($\alpha = 0.05$) entre el factor medio, hormona, dosis, así como la interacción entre medio por hormona, medio por dosis y hormona por dosis,

Analizando el comportamiento de la germinación bajo condiciones de estratificación a $\frac{1}{2}x$ del medio MS más AG_3 (Figura 4.11), se aprecia que a los 40 días se obtiene un 40% a 100 ppm, mientras que a 1 y 0 ppm presentan un 20%, para los 57 días se obtiene un 100% en la concentración de 100 ppm, y de un 80% a 1 ppm, en cuanto a 10 y 0 ppm presentan un 60% de dicha variable; a los 60 días se obtiene un 100% de germinación a 1 y 100 ppm.

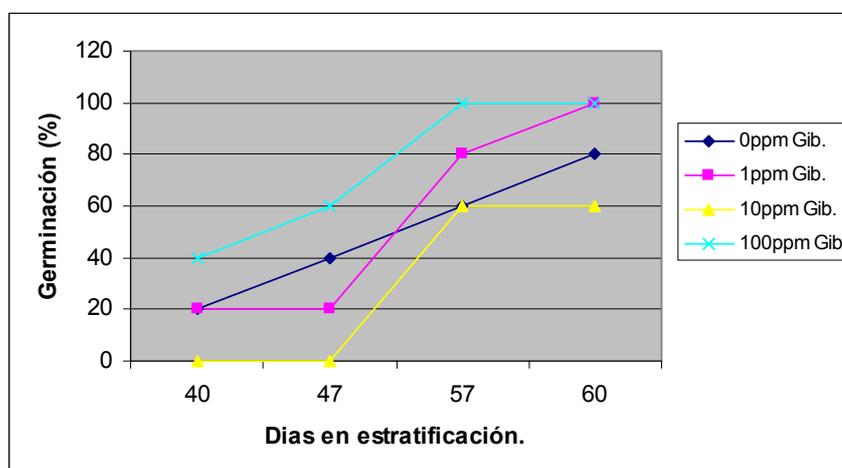


Figura. 4.11 Germinación de embriones de 95 días de durazno en un $\frac{1}{2}x$ del medio MS más AG_3 , bajo condiciones de estratificación.

En la figura 4.12, se presenta el efecto del AG_3 con $\frac{1}{4}x$ del medio MS, en la cual se observa que para 40 días, los porcentajes mayores de germinación es de un 40% a 1 y 100 ppm; a los 57 días se aprecia que a 100 ppm alcanza un 100%, seguido de un 80% con 1 ppm, a 0 ppm alcanza

un 60%, mientras que a 10 ppm la germinación no se presenta; para los 60 días se presenta el 100% a 100, 1 y 0 ppm, en cuanto a 10 ppm los embriones no germinaron.

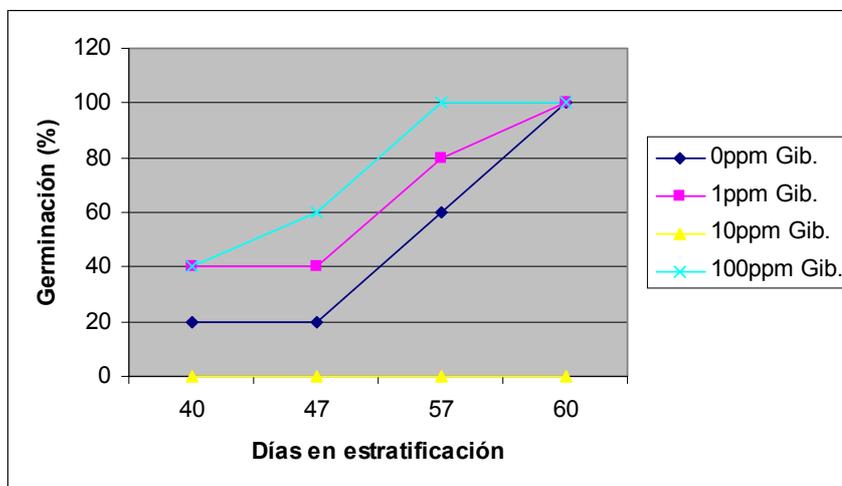


Figura 4.12. Germinación de embriones de 95 días durazno en $\frac{1}{4}x$ del medio MS más AG_3 , bajo condiciones de estratificación.

Al comparar la germinación en los dos experimentos, es claro que la semilla cosechada a los 95 días después de la floración alcanzó más rápidamente (A los 57 días en estratificación) el 100% de germinación, mientras que la semilla cosechada a los 75 días después de floración, requirió 60 días en la estratificación para alcanzar el 100% de germinación. Esto se puede explicar en base a que la semilla de 95 días es más madura y tiene más reservas ó su embrión esta mejor desarrollado morfológicamente, que la semilla de 75 días, lo cual ayudara a alcanzar un 100% de germinación más rápidamente, esto se logra únicamente con 100 ppm de AG_3 , pero el efecto es muy similar con 0 ppm y las otras concentraciones de AG_3 a los 60 días en estratificación (Figura 4.13), excepto a 10 ppm, donde alguna razón los embriones no germinaron ó tuvieron una menor germinación.

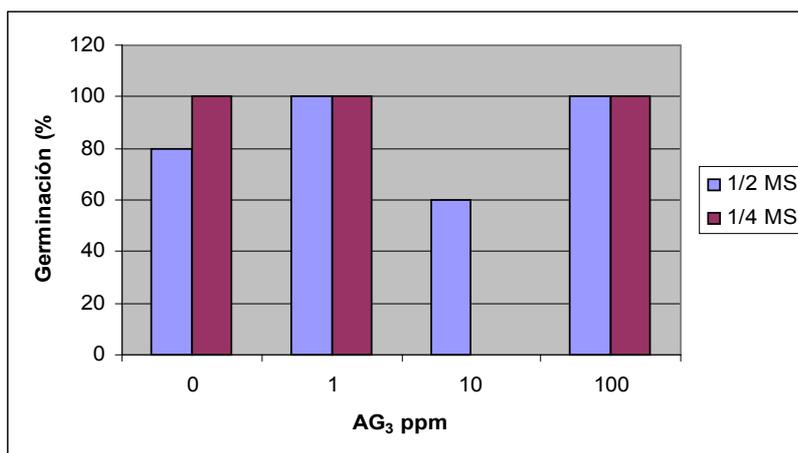


Figura 4.13 Efecto del AG₃ y la estratificación por 60 días, en dos niveles de concentración del medio de cultivo MS, sobre la germinación de embriones de 95 días de maduración.

En la Figura 4.14, se observa la germinación a $\frac{1}{2}x$ del medio MS más kinetina, notándose que a los 40 días a 2 y 4 ppm alcanza un porcentaje del 20%, durante esta fecha las concentraciones 8, y 0 ppm son los porcentajes más bajos con un 0%, a los 57 días las concentraciones 2 y 4 ppm alcanzan un 80% de germinación, mientras que a 0 ppm presenta un 60%; a los 60 días se muestra que a 2, 4 ppm kinetina se obtienen el 100% de la germinación, a 8 y 0 ppm presenta un 80% de embriones germinados.

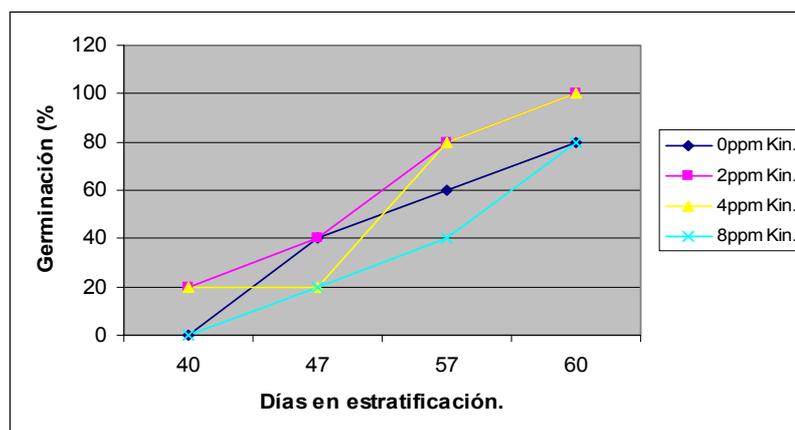


Figura. 4.14 Germinación de embriones inmaduros de 95 días de durazno en $\frac{1}{2}x$ del medio MS más kinetina, bajo condiciones de estratificación.

En la Figura 4.15, se muestra el comportamiento de la germinación con $\frac{1}{4}x$ del medio MS más kinetina, se observa que a los 40 días el porcentaje más alto es de 20% a 2 y 0 ppm; para los 47 días se aprecia que con 2 ppm alcanza un 40%, mientras que a 0 ppm se mantiene en 20%; a

los 57 días las concentraciones 2 y 0 ppm de kinetina alcanza un 60%; a los 60 días se obtiene un 80% a 2 y 0 ppm de kinetina, mientras que a 4 y 8 ppm aun no se presenta ninguna germinación de los embriones inmaduros de durazno.

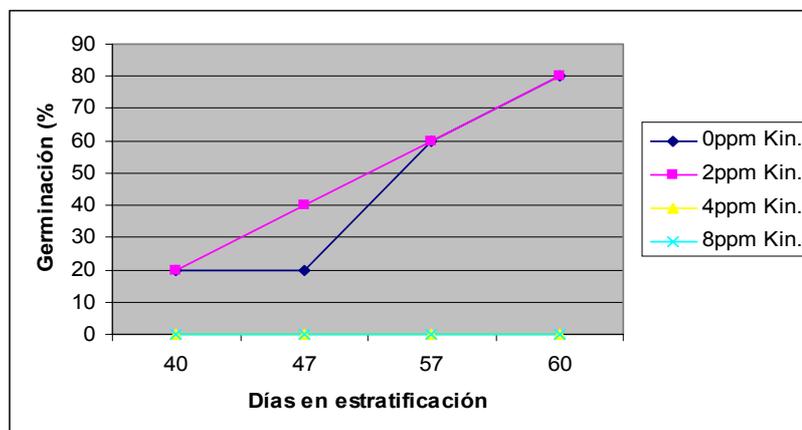


Figura. 4.15. Germinación de embriones de 95 días de durazno en $\frac{1}{4}$ x del medio MS más kinetina, bajo condiciones de estratificación.

Observando las dos anteriores figuras y la Figura 4.16, se aprecia que la kinetina tendió a inhibir la germinación de los embriones de 95 días, ya que con solo con 2 ppm se logro estimular ligeramente la germinación, comparado con el testigo. El efecto más negativo se vio con $\frac{1}{4}$ x del medio MS, aunque no hay que descartar que esos embriones que no germinaron pudieron haber sido dañados durante el tratamiento de desinfección.

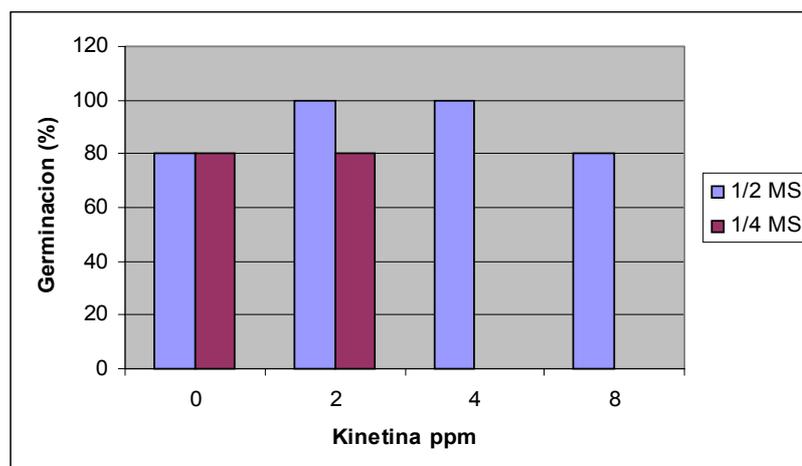


Figura 4.16. Efecto de la Kinetina y la estratificación por 60 días, en dos niveles de concentración del medio de cultivo MS, sobre la germinación de embriones de 95 días de durazno.

Longitud de raíz

En la variable longitud de raíz (cuadro 5A), se presenta el análisis de varianza donde la comparación de medias muestra, que existe diferencia altamente significativa ($\alpha = 0.05$) entre el factor medio, hormona, dosis, así como la interacción entre medio por dosis, hormona por dosis y la interacción medio por hormona por dosis.

Analizando la Figura 4.17, se presenta el efecto del AG_3 , a $\frac{1}{2}x$ del medio MS, se obtiene la mayor longitud de raíz de 7.6 cm a 1 ppm, seguido de 7.2 cm a 100 ppm, se puede apreciar que a medida que aumenta la concentración de AG_3 favorecen a la longitud de la raíz. Con lo que respecta a 10 ppm AG_3 , el 40% de embriones no germinaron lo cual provoca que la media de longitud sea menor. Cuando se analiza $\frac{1}{4}x$ del medio MS y el efecto del AG_3 , la mejor respuesta de longitud es de 6.8 cm a 1 ppm, seguido de 5.8 cm a 0 ppm, se puede observar que a 100 ppm AG_3 no presenta efecto positivo en el desarrollo de longitud de raíz, con respecto al testigo. Así pues, el AG_3 estimuló más la longitud de raíz con $\frac{1}{2}x$ que con $\frac{1}{4}x$ del medio MS.

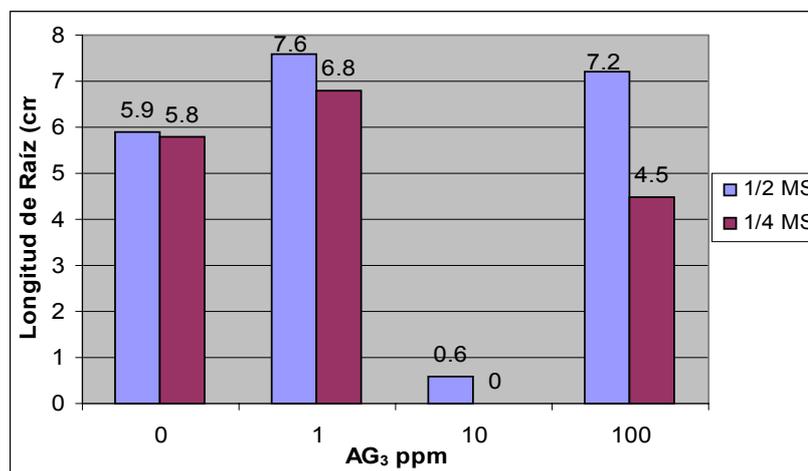


Figura 4.17. Efecto del AG_3 , en dos niveles de concentración del medio de cultivo MS, sobre la longitud de raíz en embriones de 95 días de durazno.

En la Figura 4.18, se presenta el efecto de la kinetina con $\frac{1}{2}x$ del medio MS, sobre la longitud de raíz y se observa una tendencia que cuando se incrementa la concentración de la kinetina la longitud de raíz tiende a ser menor. En cuanto a $\frac{1}{4}x$ del medio MS, se observa que el testigo fue superior al testigo de $\frac{1}{2}x$ al obtener una longitud de raíz de 8.4 cm y que con la adición de kinetina se reduce la longitud de raíz, aunque no fue posible evaluarla completamente debido a que no hubo germinación en dos de los tratamientos más altos.

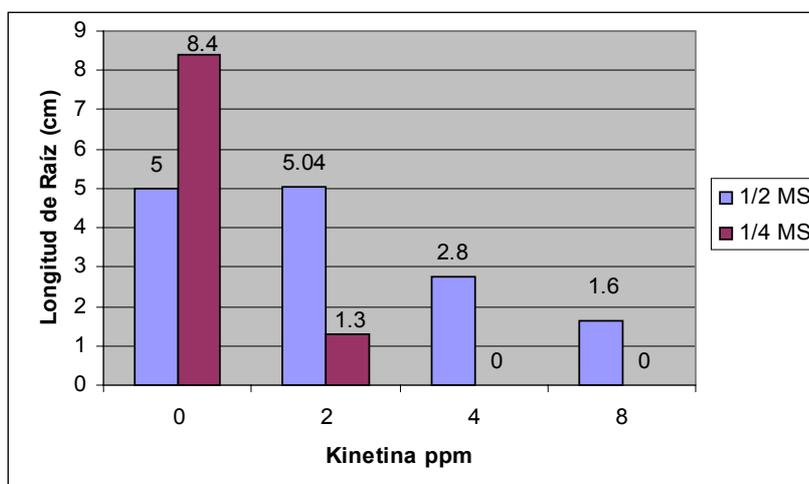


Figura 4.18 Efecto de la Kinetina, en dos niveles de concentración del medio de cultivo MS, sobre la longitud de raíz en embriones de 95 días de durazno.

Longitud de tallo

En la variable longitud de tallo (cuadro 6A), se presenta el análisis de varianza donde la comparación de medias muestra, que existe diferencia altamente significativa ($\alpha = 0.05$) entre el factor medio, hormona, dosis, así como la interacción entre medio por dosis, hormona por dosis y la interacción medio por hormona por dosis.

Analizando la Figura 4.19 se aprecia el efecto de AG_3 a $\frac{1}{2}x$ del medio MS sobre la longitud del tallo, siendo de 4.4 cm a 100 ppm, se puede decir que a mayor concentración del AG_3 la longitud del tallo es mayor. En cuanto a $\frac{1}{4}x$ del medio MS más AG_3 , se obtuvieron los mejores resultados con

100ppm que fue de 3.1cm, mientras que a 10ppm no se evaluó la longitud debido a que los embriones no germinaron.

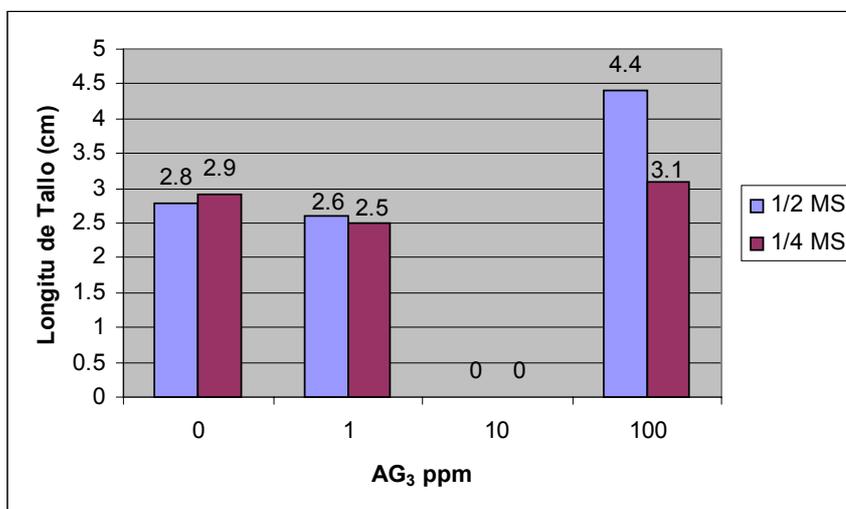


Figura 4.19 Efecto de AG₃, en dos niveles de concentración del medio de cultivo MS, sobre la longitud de tallo en embriones de 95 días de durazno.

En la Figura 4.20, se muestra el efecto de la kinetina a ½ de MS, sobre la longitud del tallo observándose que a medida que se aumento la concentración, la longitud de tallo fue menor, ocurriendo lo mismo en el medio 1/4x.

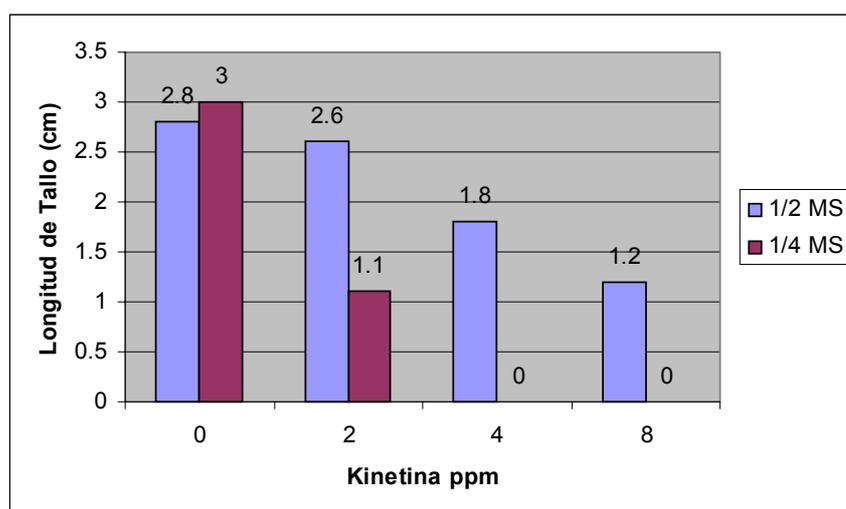


Figura 4.20 Efecto de kinetina, en dos niveles de concentración del medio de cultivo MS, sobre la longitud de tallo, en embriones de 95 días de durazno.

CONCLUSIONES

Es factible la germinación in Vitro de embriones inmaduros de duraznos 'Diamante' a partir de 75 días después de plena floración.

La germinación in vitro de embriones inmaduros de 75 días después de la floración, requiere de 60 días de estratificación para alcanzar un 100%, mientras que a la semilla cosechada a los 95 días requiere de 57 días de estratificación para lograr un 100% de germinación.

La semilla cosechada a los 95 días después de floración es mas madura, cuenta con más reservas, el embrión morfológicamente esta mejor desarrollado en comparación a los 75 días que el embrión se encuentra menos desarrollado y cuenta con menos reservas.

No es necesario suplementar ni con AG_3 ni kinetinas al medio cultivo para obtener un 100% de germinación, pero que es necesario utilizar $\frac{1}{4}x$ del medio Murashige y Skoog (1962).

El AG_3 estimulo más la longitud de la raíz tanto con $\frac{1}{2}$ que con $\frac{1}{4}x$ del medio MS; mientras que la kinetina en bajas concentraciones estimula el crecimiento de la raíz pero en altas concentraciones tiende a inhibir tanto como en $\frac{1}{2}x$ como de $\frac{1}{4}x$ del medio MS.

El AG_3 a medida que se incrementa la concentración induce a la longitud del tallo tanto como en $\frac{1}{2}$ y $\frac{1}{4}x$ del medio MS. La kinetina estimula la longitud del tallo a bajas concentraciones a mayores concentraciones tiende a inhibir el crecimiento del tallo.

LITERATURA CITADA

- Barboza W. et al 1990. Invitro effects of benzylamino purina (BAP) on early peach and nectarine embryo development. *Bragatia*. 40, 2, 233-239.
- Bassi D, Infante 1994. Embryo culture experiments in Peach and Cherry breeding. *Rivista de Frutticoltura e di ortofloricoltura* 56: 7-8 65-70.
- Besnier, R. F. 1989 "Semillas Biología y Tecnología" Ed. Mundi-Prensa, Madrid, España.
- Bidwell, R. G. S. 1979. *Fisiología Vegetal*. 1º Ed. en español. A. G. T. Editor, S. A. México, D. F.
- Cárdenas B. 1993. Memorias del Diplomado de Biotecnología Aplicada a la Agricultura, SEP., I.T.A. No 9, ITESM
- Chopra H. R. 1990. Embryo culture as an effective aid for rescuing hybrid seedlings of early ripening peaches (*Prunus persica* B.) *Journal of research punjab-Agricultural University*. 31:2, 127-130.
- Daorden, Garcia, E., Marín, J. A., Arbeloa, A. 2001. Cultivo *in vitro* de embriones inmaduros de *Prunus*. *Acta Horticultura*. (en prensa).
- Daorden, M.E, Marín, J. A. and Arbeloa, A. 2004. Stratification temperature affects the *In Vitro* germination of immature *Prunus* embyos. *Acta Horticultura*. 658, Pág. 135-140
- Davison, O. W. 1934. Growing trees from "non-viable" peach seeds. *Proc, Soc. Hort. Sci*. 32. 308-312.
- Davies, P. J. 1995. *Plant Hormones: Physiology, biochemistry and molecular biology*. Dordrecht: Kluwer. Pág. 10-25
- Dunstan, D. Y and K. E. Tuner 1984. The acclimatization of micropropagated plantas. *Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants*. Vol. I
- Grattapaglia, Machado, M. A. 1998. Micropropagação. In: Torres, A.C.; Caldas, L. S.; Buso, J. A. (Ed.) *Cultivo de tejidos y transformación genética de plantas*, Brasília: Embrapa – Servicio de Producción y de Información /Embrapa – CNPH. v. 1, p. 183 – 260.
- Gouvea, L. 1983. *A germinacao das sementes*. Secretaria-general de organizacao das Esyado Americanos, Washinton, D.C 722pp.
- Hartmann T.H. y Dale E. Kester. 1999 *Propagación de Plantas*. Compañía Editorial Continental, S. A. de C. V. México.

- Harrington, F. 1970. Seed and pollen storage for conservation of plant gene resources. In Frankel, O.H. and Bennett, E. Handbook No.11 Davis, Philadelphia
- Hersse. C. O. and D. E. Kester. 1995. Germination of embryos of prunus related to degree of embryo development and method of handling. Proc. Amer. Soc. Hort. Sci. 65:251-264.
- James N. Moore y Joules Janick 1988. Métodos Genéticos en Frutales, Capítulo de embriones. Editorial AG. Editor S. A. México DF. Pág. 183-194
- Khan, A.A. 1980-1981. Ornamental regulation of primary and secondary dormancy. Israel Jour. Bot. 29: 207-224.
- Koukhartchit N. V. and S. Semenas 2000. Embryo Culture in *Prunus L.* breeding. Acta Horticultura 538 Pág. 663-665.
- Kyte, L. J. Kleyn. 1996. *Plants from test tubes: An introduction to Micropropagation*. 3º edición, Timber Press, EUA, pp 21–26, 84–89, 108–125, 137–145, 171–203
- Marín, J. A, A. Arbeola, M.E. Doarden, E. Garcia 2003. Successful establishment of *In Vitro* cultures of *Prunus cerasifera* hybrids by embryo culture of immature fruits. Acta Horticultura 616, Pág 375-378.
- Moreno, M. E. 1996 “Análisis Físico y Biológico de Semillas Agrícolas” 3ra. Edición. Instituto de Biología. UNAM. México.
- Matias, A. C. 1995. Establecimiento y multiplicación *in vitro* de *pessegueiro* (*Prunus persica* L. Batsch.) cultivares Flordaprince e Diamante. Pelotas, 84p. Dissertação (Maestría en Agronomía), Facultad de Agronomía “Eliseu Maciel”, Universidad Federal de Pelotas.
- Liu-VS 1991. Study on *in Vitro* ovule culture of early maturing peach. Acta Universitatis Agriculture Boreali occidentalis. 19:3 37-43
- López, M. J. 1990. Organogenesis *in vitro* de durazno ‘Flordaprince y ‘Oro A’. Tesis de maestría en ciencias, Colegio de Posgraduados, Montecillo, México.
- Padrón, C. J. E. 1988. Cultivo *in vitro* de ovulos y embriones de durazno precoces (*Prunus persica* L.). Tesis de maestría en ciencias. Colegio de posgraduados, Montecillo México.
- Padron C. J. E 1991 Cultivo *in vitro* de ovulos y embriones de durazno precoces (*Prunus persica*). Revista Agrociencia serie Fitotecnia Vol. 2 Num. 3 Julio-septiembre 1991 P. 123-137

- Pierik, R.L.M. 1987. *In vitro* Culture of Higher Planst. Martínez Nighoff Pub. The Netherlands. P. 67
- Pierik R. L. M. 1990. Cultivos *in vitro* de plantas superiores. Ediciones Mundi-presa. Madrid.
- Pinto A. C. Q 1993. Influence de ovule perforation, plant growth regulators, and glutamine on in vitro growth of immature peach embryos, *In vitro* cellular and Developmental biology Plants. 29: 2, 55-58
- Raghavan, V. 1976. Experimental Embryogenesis in Vascular Plants. London. Academic Press.
- Ramming D. 1990. The use of embryo cultures in fruit breeding. *HortScience* 25(4):393-398
- Rappaport, J. 1954. *In vitro* culture of plan embryos and factor controlling their growth. *Bot. Rev.* 10:201-225.
- Rivas W. L. 2001. Czech University of Agricultura Prague-Institute of Tropical-and- Su´btropical-Agriculture.
Disponible en:
http://www.czu.cz/struktura/itsz/ktsppages/os_stranky/eloywww/cultivodetejid os.htm
- Rojas, G.M.; H. Ramirez. 1993. Control Hormonal del Desarrollo de Plantas. *Fisiología- Tecnica_ Experimental* 2ª Ed. Limusa. Mexico. P. 20-27.
- Salisbury, B. F. y Ross. 1994. *Fisiología Vegetal*. Editorial Iberoamérica S. A de C.V.
- Scozzoli A. Pasini D. 1992. Effects of different media constituents on the development of peach embryos cultured in vitro. *Acta Horticulture*. No. 300, 265-268.
- Tukey, H.B. 1934. Artificial culture methods for isolated embryos of decidous fruits. *Proc. Amer. Soc. Hort. Sci.* 32:313-322.
- Tapia, V. M, Ruperto Heep. G. 2002-2004 Universidad de Concepción, Campus. Chillan, Facultad de Agronomia.
Disponible en:

[hpp://www.chillan.udec.cl/~agronomi/provegetal/labs/biotecnología.html](http://www.chillan.udec.cl/~agronomi/provegetal/labs/biotecnología.html)
- Weaver, R.J. 1990. Reguladores de Crecimiento de las Plantas en la Agricultura. Ed. Trillas. México. Pág. 113-115.
- Zagaja, S.W.; L:F Hough and C.H. Bailey. 1960. The responce of inmature peach embryos. *Amer. Soc. Sci.* 75:171-180.

APÉNDICE

Cuadro 1A Concentración de datos para la variable por ciento de germinación de embriones inmaduros de durazno cultivar Diamante, por sesenta días de estratificación. A los 75 después de floración.

TRA	FACTOR			REPETICION					MEDIA
	A	B	C	I	II	III	IV	V	
1	1	1	1	0	100	100	100	100	80
2	1	1	2	0	100	100	100	100	80
3	1	1	3	100	100	100	100	100	100
4	1	1	4	100	100	100	100	100	100
5	1	2	1	100	100	100	100	0	80
6	1	2	2	100	100	100	100	100	100
7	1	2	3	100	100	100	100	100	100
8	1	2	4	100	100	100	100	0	80
9	2	1	1	100	0	100	100	100	80
10	2	1	2	100	100	100	100	100	100
11	2	1	3	100	100	100	0	100	80
12	2	1	4	100	100	100	100	100	100
13	2	2	1	100	100	100	100	100	100
14	2	2	2	100	100	100	100	0	80
15	2	2	3	100	100	100	100	100	100
16	2	2	4	100	0	100	100	100	80

Análisis de varianza.

FV	GL	SC	CM	F	P > F
FACTOR ME	1	0.00000000	0.00000000	0.00	1.0000 NS
FACTOR HO	1	0.00000000	0.00000000	0.00	1.0000 NS
FACTOR DO	3	1000.00000	333.333333	0.33	0.8013 NS
ME*HO	1	0.00000000	0.00000000	0.00	1.0000 NS
ME*DO	3	1000.00000	333.333333	0.33	0.8013 NS
HO*DO	3	3000.00000	1000.00000	1.00	0.3987 NS
ME*HO*DO	3	3000.00000	1000.00000	1.00	0.3987 NS
Error	64	64000.0000	1000.00000		
Total	79	72000.0000			

C. V= 35.13642

Cuadro 2A Concentración de datos para la variable de respuesta longitud de raíz de embriones inmaduros de durazno cultivar Diamante. Datos trasformados con

$$\sqrt{X + 0.05}$$

TRA	FACTOR			REPETICION					MEDIA
	A	B	C	I	II	III	IV	V	
1	1	1	1	8	9	1.5	8	1	5.5
2	1	1	2	7.5	3	8	0.7	6	5.04
3	1	1	3	0.7	1.5	0.7	0.7	0.7	0.86
4	1	1	4	1	0.7	2	2	1	1.34
5	1	2	1	7.2	9	10.6	1.7	0.8	5.86
6	1	2	2	8	9.5	3.5	7.8	10.6	7.88
7	1	2	3	5.7	8.2	7.3	6.3	8.5	7.2
8	1	2	4	1.5	1	0.9	2	1.5	1.38
9	2	1	1	6.2	1.4	5.3	9.9	2.8	5.12
10	2	1	2	2.7	3.8	1.2	1.5	2.2	2.28
11	2	1	3	0	0	0	0	13	2.6
12	2	1	4	2.8	7	9.7	1.1	2.7	4.66
13	2	2	1	10.7	10	5.3	5.5	2.8	6.86
14	2	2	2	11.5	11.3	11.1	3.4	10	9.46
15	2	2	3	3.5	6	5.2	4.5	5.5	4.94
16	2	2	4	4.2	0.7	3	0.7	0.7	1.86

Análisis de varianza.

FV	GL	SC	CM	F	P > F
FACTOR ME	1	0.22050000	0.22050000	0.55	0.4626 NS
FACTOR HO	1	5.33544500	5.33544500	13.21	0.0006 **
FACTOR DO	3	10.1976100	3.39920333	8.42	0.0001 **
ME*HO	1	0.05724500	0.05724500	0.14	0.7078 NS
ME*DO	3	1.11333000	0.37111000	0.92	0.4367 NS
HO*DO	3	7.50138500	2.50046167	6.19	0.0009 **
ME*HO*DO	3	2.62368500	0.87456167	2.17	0.1006 NS
Error	64	25.83952000	0.40374250		
Total	79	52.88872000			

C. V= 30.19997

TABLA DE MEDIAS DEL FACTOR HO

FACTOR HO	MEDIA
1	2.014 A
2	1.725 B

Medias seguidas de la misma letra no son significativamente diferentes (Duncan al 0.05%).

TABLA DE MEDIAS DEL FACTOR DO

FACTOR DO	MEDIA
1	2.4020 A
2	2.4645 A
3	1.9675 B
4	1.5820 B

Medias seguidas de la misma letra no son significativamente diferentes (Duncan al 0.05%).

TABLA DE MEDIAS PARA LA INTERACCION HO*DO

FACTOR HO	FACTOR DO				MEDIA
	1	2	3	4	
1	2.9700 ab	1.9480 bc	1.3880 c	1.7500 bc	2.014
2	2.5070 ab	2.9810 a	2.5470 ab	1.4140 c	1.725

MEDIA 2.4020 2.4645 1.9675 1.5820 1.8695

Medias seguidas de la misma letra no son significativamente diferentes (Duncan al 0.05%).

Cuadro 3A Concentración de datos para la variable de respuesta longitud de tallo de embriones inmaduros de durazno cultivar Diamante. Datos transformados con

$$\sqrt{X + 0.05}$$

TRA	FACTOR			REPETICION					MEDIA
	A	B	C	I	II	III	IV	V	
1	1	1	1	3	4	1.8	4	2.5	3.06
2	1	1	2	2.5	1.5	3	2	2.5	2.3
3	1	1	3	0.5	1.3	0.5	0.5	1.5	0.86
4	1	1	4	2	1	2.5	2.5	1	1.8
5	1	2	1	1.5	3	4.2	2	2	2.54
6	1	2	2	3.5	3.5	3	3.5	3.6	3.42
7	1	2	3	4	2.4	2.8	2.5	3.2	2.98
8	1	2	4	2	0.7	0.7	1.5	1.5	1.28
9	2	1	1	3.9	3.2	1	3.2	3.3	2.92
10	2	1	2	2.2	2.5	1.2	1.2	2	1.82
11	2	1	3	0	0	0	0	4.5	0.9
12	2	1	4	4.2	4.5	4.7	4.5	4	4.38
13	2	2	1	3	3.1	2.2	3.9	3.2	3.08
14	2	2	2	4.5	3.5	3.5	3.4	3.5	3.68
15	2	2	3	2.5	2.2	2.5	3.2	2.9	2.66
16	2	2	4	3	1	0.5	0.7	0.7	1.18

Análisis de varianza.

FV	GL	SC	CM	F	P > F
FACTOR ME	1	0.064980	0.0649800	0.88	0.3515 NS
FACTOR HO	1	0.375380	0.3753800	5.09	0.0275 **
FACTOR DO	3	1.980210	0.6600700	8.95	0.0001 **
HO*DO	6	6.778320	1.1297200	15.31	0.0001 **
ME*DO	6	2.533480	0.4222466	5.72	0.0001 **
ME*HO*DO	3	0.844870	0.2816233	3.82	0.0140 **
Error	64	4.721320	0.0737706		
Total	79	13.36552			

C. V= 30.19997

TABLA DE MEDIAS DEL FACTOR HO

FACTOR HO	MEDIA
1	1.5925 B
2	1.7295 A

Medias seguidas de la misma letra no son significativamente diferentes (Duncan al 0.05%).

TABLA DE MEDIAS DEL FACTOR DO

FACTOR C	MEDIA
1	1.8255 A
2	1.7985 A
3	1.4490 B
4	1.5710 B

Medias seguidas de la misma letra no son significativamente diferentes (Duncan al 0.05%).

TABLA DE MEDIAS PARA LA INTERACCIÓN HO*DO

FACTOR HO	FACTOR DO				MEDIA
	1	2	3	4	
1	1.8470 ab	1.5870 bc	1.0830 d	1.8530 ab	1.5925
2	1.8040 ab	2.0100 a	1.8150 ab	1.2890 cd	1.7295
MEDIA	1.8255	1.7985	1.4490	1.5710	1.661

Medias seguidas de la misma letra no son significativamente diferentes (Duncan al 0.05%).

TABLA DE MEDIAS DE TRATAMIENTOS ABC

FACTORES ME HO		FACTOR DO				MEDIA
		1	2	3	4	
1	1	1.872 abc	1.554 bcd	1.150 ef	1.4960 ab	
1	2	1.722 bc	1.978 ab	1.858 abc	1.320 def	
2	1	2.462 ab	2.682 ab	1.016 cde	2.210 a	
2	2	1.886 abc	2.042 ab	1.772 bc	1.258 ef	

Medias seguidas de la misma letra no son significativamente diferentes (Duncan al 0.05%).

Experimento II cosecha a los 95 días después de floración.Cuadro 4A. Concentración de datos para la variable de respuesta germinación en la especie de durazno (*Prunus persica* L.) cultivar Diamante.

TRA	FACTOR			REPETICION					MEDIA
	A	B	C	I	II	II	IV	V	
T1	1	1	1	0	100	100	100	100	80
T2	1	1	2	100	100	100	0	0	60
T3	1	1	3	100	100	100	100	100	100
T4	1	1	4	100	100	100	100	0	80
T5	1	2	1	100	100	100	100	100	100

T6	1	2	2	100	100	100	100	100	100
T7	1	2	3	100	100	100	100	0	80
T8	1	2	4	100	100	100	100	100	100
T9	2	1	1	100	100	100	100	100	100
T10	2	1	2	100	100	100	0	0	60
T11	2	1	3	0	0	0	100	100	40
T12	2	1	4	100	100	100	100	0	80
T13	2	2	1	100	100	100	100	0	80
T14	2	2	2	100	100	100	0	0	60
T15	2	2	3	0	0	0	0	0	0
T16	2	2	4	0	0	0	0	0	0

Análisis de varianza.

FV	GL	SC	CM	F	P > F
FACTOR ME	1	21125.00000000	21125.00000000	28.17	0.0001 **
FACTOR HO	1	6125.00000000	6125.00000000	8.17	0.0058 **
FACTOR DO	3	29298.55889724	9766.18629908	13.02	0.0001 **
ME*HO	1	6125.00000000	6125.00000000	8.17	0.0058 **
ME*DO	3	27562.55221387	9187.51740462	12.25	0.0001 **
HO*DO	3	12451.44110276	4150.48036759	5.53	0.0019 **
ME*HO*DO	3	4187.44778613	1395.81592871	1.86	0.1451 NS
Error	64	48000.00000000	750.00000000		
Total	79	154875.00000000			

C. V. 37.13373

TABLA DE MEDIAS DEL FACTOR ME

FACTOR ME	MEDIA
1	90.000 A
2	57.500 B

Medias seguidas de la misma letra no son significativamente diferentes (Duncan al 0.05%).

TABLA DE MEDIAS DEL FACTOR HO

FACTOR HO	MEDIA
1	82.500 A
2	65.000 B

Medias seguidas de la misma letra no son significativamente diferentes (Duncan al 0.05%).

TABLA DE MEDIAS DEL FACTOR DO

FACTOR C	MEDIA
1	85.000 AB
2	95.238 A
3	45.000 C
4	68.421 B

Medias seguidas de la misma letra no son significativamente diferentes (Duncan al 0.05%).

TABLA DE MEDIAS DE TRATAMIENTOS ME*HO

FACTOR ME	FACTOR HO		MEDIA
	1	2	
1	90.000 a	90.000 a	90.000 A
2	75.000 b	40.000 c	57.500 B

MEDIA 82.500 65.00 73.750

Medias seguidas de la misma letra no son significativamente diferentes (Duncan al 0.05%).

TABLA DE MEDIAS DE TRATAMIENTOS ME*DO

FACTOR ME	FACTOR DO				MEDIA
	1	2	3	4	
1	80.00 ab	100.00 aa	90.00 aa	88.88 ab	90.00
2	90.00 aa	90.000 aa	0.000 d	50.00 c	57.500
MEDIA	85.000	95.238	45.000	68.421	63.611

Medias seguidas de la misma letra no son significativamente diferentes (Duncan al 0.05%).

TABLA DE MEDIAS DE TRATAMIENTOS HO*DO

FACTOR HO	FACTOR DO				MEDIA
	1	2	3	4	
1	90.00 aa	100.00 aa	40.00 c	100.00 a	82.500
2	80.00 ab	90.00 a	50.00 bc	40.00 c	65.000
MEDIA	85.000	95.238	45.000	68.421	73.75

Medias seguidas de la misma letra no son significativamente diferentes (Duncan al 0.05%).

Cuadro 5A. Cuadro A. Concentración de datos para la variable de respuesta longitud de radícula en la especie durazno (*Prunus persica* L.) cultivar Diamante. Datos transformados $\sqrt{x + 0.05}$

TRA	FACTOR			RAPETICION					Media
	A	B	C	I	II	III	IV	V	
T1	1	1	1	7	5.5	5	5.5	6.5	5.9
T2	1	1	2	6	9	7	8	8	7.6
T3	1	1	3	0.5	0.7	0.5	0.6	0.7	0.6
T4	1	1	4	7.5	7	7	6	8.5	7.2
T5	1	2	1	6	6	5	5	3	5
T6	1	2	2	5	0.7	7.5	4	8	5.04
T7	1	2	3	4	0.7	5.5	2.5	1.1	2.76
T8	1	2	4	3	0.7	0.7	0.7	3	1.62
T9	2	1	1	6	6	6	2	9	5.8
T10	2	1	2	7	8	6	4	9	6.8
T11	2	1	3	0	0	0	0	0	0
T12	2	1	4	3.5	2	6	1	10	4.5
T13	2	2	1	8	9	8	9	8	8.4
T14	2	2	2	1.4	1.5	0.5	2	1	1.28
T15	2	2	3	0	0	0	0	0	0
T16	2	2	4	0	0	0	0	0	0

Análisis de varianza.

FV	GL	SC	CM	F	P > F
ME	1	3.27240500	3.27240500	14.29	0.0003 **
HO	1	4.28738000	4.28738000	18.72	0.0001 **
DO	3	23.53179203	7.84393068	34.25	0.0001 **
ME*HO	1	0.19800500	0.19800500	0.86	0.3560 NS
ME*DO	3	3.44482378	1.14827459	5.01	0.0035 **
HO*DO	3	7.96200878	2.65400293	11.59	0.0001 **
ME*HO*DO	3	2.43224041	0.81074680	3.54	0.0194 **
Error	64	14.65926500	0.22905102		
Total	79	59.78792000			

C. V. 25.00485

TABLA DE MEDIAS DEL FACTOR ME

FACTOR ME	MEDIA
1	90.000 A
2	57.500 B

Medias seguidas de la misma letra no son significativamente diferentes (Duncan al 0.05%).

TABLA DE MEDIAS DEL FACTOR HO

FACTOR HO	MEDIA
1	82.500 A
2	65.000 B

Medias seguidas de la misma letra no son significativamente diferentes (Duncan al 0.05%).

TABLA DE MEDIAS DEL FACTOR DO

FACTOR C	MEDIA
1	2.5770 A
2	2.2157 B
3	1.1420 D
4	1.6953 C

Medias seguidas de la misma letra no son significativamente diferentes (Duncan al 0.05%).

TABLA DE MEDIAS DE TRATAMIENTOS ME*DO

FACTOR ME	FACTOR DO				MEDIA
	1	2	3	4	
1	2.4310 a	2.4118 ab	1.5740 bc	2.0077 b	2.11625
2	2.7230 a	2.0000 b	0.7100 d	1.4140 c	1.71175

MEDIA 2.5770 2.2157 1.1420 1.6953 73.75

Medias seguidas de la misma letra no son significativamente diferentes (Duncan al 0.05%).

TABLA DE MEDIAS DE TRATAMIENTOS HO*DO

FACTOR HO	FACTOR DO				MEDIA
	1	2	3	4	
1	2.4950 a	2.6018 a	1.0630 c	2.4022 aa	2.1455
2	2.6590 a	1.7910 b	1.2210 bc	1.0590 c	1.6825

MEDIA 2.5770 2.2157 1.1420 1.6953 1.914

Medias seguidas de la misma letra no son significativamente diferentes (Duncan al 0.05%).

TABLA DE MEDIAS DE TRATAMIENTOS ABC

FACTORES ME HO	FACTOR DO				MEDIA
	1	2	3	4	
1 1	2.528 ab	2.535 ab	1.4160 d	2.7575 ab	
1 2	2.334 abc	2.264 bc	1.7320 cd	1.4080 d	
2 1	2.462 ab	2.682 ab	0.7100 e	2.1180 bc	
2 2	2.984 a	1.318 d	0.7100 e	0.7100 e	

Medias seguidas de la misma letra no son significativamente diferentes (Duncan al 0.05%).

Cuadro 6A. Concentración de datos para la variable de respuesta longitud de plántula en la especie durazno (*Prunus persica* L.) cultivar Diamante.

TRA	FACTORES			REPETICION					MEDIA
	A	B	C	I	II	III	IV	V	
T1	1	1	1	3	2.5	3	2	3.4	2.78
T2	1	1	2	2.5	2.5	2.5	2.5	3	2.6
T3	1	1	3	0	0	0	0	0	0
T4	1	1	4	3.5	5	5.5	4	4	4.4
T5	1	2	1	3.5	2.5	3	3	2	2.8

T6	1	2	2	2	4	2.5	3.5	1	2.6
T7	1	2	3	1.5	1.5	2	2	2	1.8
T8	1	2	4	2	1	0.5	1	1.5	1.2
T9	2	1	1	3	3	2.5	3	3	2.9
T10	2	1	2	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
T11	2	1	3	0	0	0	0	0	0
T12	2	1	4	3	2.5	3.5	3.5	3	3.1
T13	2	2	1	2.5	2	2.5	4	4	3
T14	2	2	2	0.5	0.5	1.5	1.5	1.5	1.1
T15	2	2	3	0	0	0	0	0	0
T16	2	2	4	0	0	0	0	0	0

Análisis de varianza.

FV	GL	SC	CM	F	P > F
FACTOR ME	1	10.804500	10.80450000	22.68	0.0001 **
FACTOR HO	1	11.552000	11.55200000	24.25	0.0001 **
FACTOR DO	3	50.132002	16.71066750	35.08	0.0001 **
ME*HO	1	3.4445000	3.44450000	7.23	0.0091 **
ME*DO	3	5.1814873	1.72716246	3.63	0.0176 **
HO*DO	3	38.983078	12.99435943	27.28	0.0001 **
ME*HO*DO	3	4.6515984	1.55053282	3.25	0.0273 **
Error	64	30.488833	0.47638802		
Total	79	155.23800			

C. V. 36.23143

TABLA DE MEDIAS DEL FACTOR ME

FACTOR DO	MEDIA
1	81.057007 A
2	58.699501 B

Medias seguidas de la misma letra no son significativamente diferentes (Duncan al 0.05%).

TABLA DE MEDIAS DEL FACTOR HO

FACTOR HO	MEDIA
1	72.113998 A
2	67.642502 B

Medias seguidas de la misma letra no son significativamente diferentes (Duncan al 0.05%).

TABLA DE MEDIAS DEL FACTOR HO

FACTOR C	MEDIA
1	2.7950 A
2	2.0952 B
3	0.6250 C
4	2.1053 B

Medias seguidas de la misma letra no son significativamente diferentes (Duncan al 0.05%).

TABLA DE MEDIAS PARA LA INTERACCION ME*HO

FACTOR ME	FACTOR HO		MEDIA
	1	2	
1	2.4450 a	2.1000 ab	2.2725
2	2.1250 ab	0.9500 c	1.5375
MEDIA	2.285	1.525	1.905

Medias seguidas de la misma letra no son significativamente diferentes (Duncan al 0.05%).

TABLA DE MEDIAS PARA LA INTERACCION ME*DO

FACTOR ME	FACTOR DO				MEDIA
	1	2	3	4	
1	2.7900 a	2.3636 b	1.2500 c	2.7222 ab	2.2725
2	2.8000 a	1.8000 bc	0.0000 d	1.5500 bc	1.5325

MEDIA 2.7950 2.0952 0.6550 2.1053

Medias seguidas de la misma letra no son significativamente diferentes (Duncan al 0.05%).

TABLA DE MEDIAS PARA LA INTERACCION HO*DO

FACTOR HO	FACTOR DO				MEDIA
	1	2	3	4	
1	2.8400 b	2.3181 c	0.3500 f	3.7777 a	72.1140
2	2.7500 b	1.8500 d	0.9000 c	0.6000 ef	67.6425

MEDIA 2.7950 2.0952 0.6550 2.1053

Medias seguidas de la misma letra no son significativamente diferentes (Duncan al 0.05%).

TABLA DE MEDIAS PARA LA INTERACCION ME*HO*DO

FACTORES ME HO	FACTOR DO				MEDIA
	1	2	3	4	
1 1	2.780 ab	2.166 cd	0.700 d	4.625	
1 2	2.800 a	2.600 abc	1.800 c	1.200	
2 1	2.900 a	2.500 abc	0.000 e	3.100	
2 2	2.700 ab	1.100 c	0.000 e	0.000	

Medias seguidas de la misma letra no son significativamente diferentes (Duncan al 0.05%).

Germinación in Vitro de embriones inmaduros



1A Estratificación de embriones (4-6 °C)



2A Cámara de crecimiento, plántulas en crecimiento.



3A Desarrollo de plántulas de durazno.



4A Plántula de durazno lista para trasplante.



5A Plántula transplantada en sustrato.