

ESTUDIO DE ALGUNOS FACTORES QUE INFLUYEN  
EN LA MICROPROPAGACION DEL NOGAL  
(*Carya illinoensis* Koch.)

JOSE ANTONIO RAMIREZ CORTES

TESIS

Presentada como requisito parcial  
para obtener el grado de

Doctor en Ciencias Agrícolas  
Area: Horticultura

Universidad Autónoma Agraria  
"ANTONIO NARRO"



BIBLIOTECA



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA  
ANTONIO NARRO  
PROGRAMA DE POSGRADUADOS

Buenavista, Saltillo, Coah.  
NOVIEMBRE DE 2003

UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

SUBDIRECCION DE POSTGRADO

Estudio de Algunos Factores que Influyen en la Micropropagación del Nogal  
(*Carya illinoensis* Koch.)

TESIS

POR

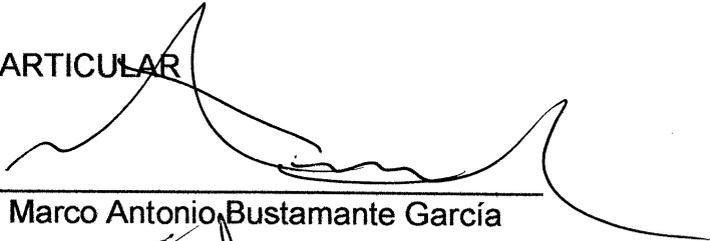
JOSÉ ANTONIO RAMÍREZ CORTÉS

Elaborada bajo la supervisión del Comité Particular de Asesoría y aprobada  
como requisito parcial para otorgar el grado de

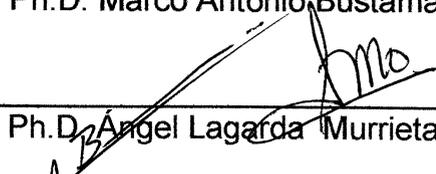
DOCTOR EN CIENCIAS AGRICOLAS, EN EL ÁREA DE HORTICULTURA

COMITE PARTICULAR

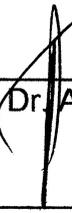
Asesor principal:

  
Ph.D. Marco Antonio Bustamante García

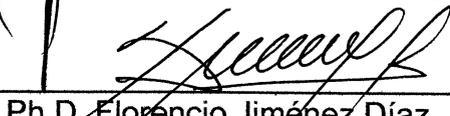
Asesor :

  
Ph.D. Angel Lagarda Murrieta

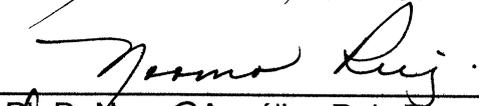
Asesor :

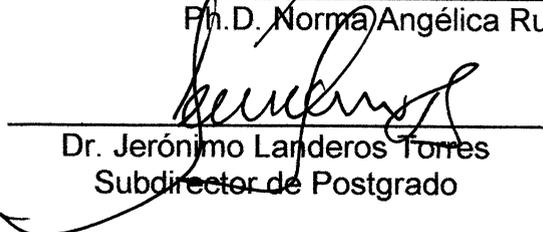
  
Dr. Adalberto Benavides Mendoza

Asesor :

  
Ph.D. Florencio Jiménez Díaz

Asesor :

  
Ph.D. Norma Angélica Ruiz Torres

  
Dr. Jerónimo Landeros Torres  
Subdirector de Postgrado

Buenavista, Saltillo, Coahuila, Noviembre de 2003

## **AGRADECIMIENTOS**

- A la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro por darme la oportunidad de adquirir un tesoro invaluable en mi formación profesional a través de nuevos conocimientos y experiencias en sus aulas, lo que hace que me sienta profundamente orgulloso de mi querida Alma Mater.
- A la Dirección General de Educación Tecnológica Agropecuaria por su amplio apoyo para la realización de mis estudios de doctorado y especialmente al M.C. Juan Jaime Guerrero Martínez en su momento Jefe del Departamento de Investigación y Posgrado por su gran amistad, así como por su decisivo e incondicional apoyo para la realización de esta investigación.
- Al Consejo Nacional del Sistema de Educación Tecnológica (COSNET) por el invaluable apoyo económico que se me otorgó a lo largo de mis estudios de doctorado.
- A los miembros de mi Comité Particular de Asesoría integrado por el Ph.D. Marco Antonio Bustamante García, Ph.D. Ángel Lagarda Murrieta, Dr. Adalberto Benavides Mendoza, Ph.D. Florencio Jiménez Díaz, y Ph.D. Norma A. Ruiz Torres, por su apreciable amistad, valiosos consejos, asesoría en la planeación, conducción y evaluación del trabajo de investigación, así como en la minuciosa revisión del presente escrito. A todos y cada uno de mis asesores y en particular al Dr. Bustamante, les reitero mis respetos por su gran sentido del deber y el alto profesionalismo mostrado a través de mis estudios.
- Al Personal del Departamento de Horticultura de la Universidad, integrado por el Jefe del Departamento, Maestros, Laboratoristas, Secretarias, Almacenistas e Intendencia a todos les doy las gracias por brindarme la oportunidad de convivir con Ustedes, así como por su gran disposición al momento de solicitar su apoyo a lo largo de tres años de mi estancia en la Universidad.
- A la Sra. Laura Durón Ochoa, del laboratorio de horticultura, por su valiosa ayuda y amistad.
- Al M.C. Nathanael Flores González, Director del ITA 10, mi centro de trabajo, por su apoyo y amistad.
- Al Dr. Rogelio Aldaco Nuncio, por su ayuda incondicional en el desarrollo de mi tesis.

## DEDICATORIAS

- A Dios Por darme la vida y estar siempre a mi lado. Gracias SEÑOR por tu incomparable paz y amor, solamente al abrigo de tu bendita mano es posible encontrar el amor perfecto que en tu infinita misericordia nos haz dado y el que cualquier ser humano puede tener simplemente al acercarse a Ti.
- A mis Padres: Sr. Prudencio Ramírez (Finado) y Sra. Leonor Cortés de R. por ser fruto de su Amor y ser en mi vida ejemplo de optimismo y deseos de superación en los momentos más difíciles.
- A mi Esposa: Sra. Alma del Carmen Muñiz B. por ser el mejor regalo que DIOS me dio en Ti. Gracias por tu generoso e incondicional apoyo, siempre lo recordare.
- A mis Hijos: José Aarón, e Irasema del Carmen por su cariño y paciencia hacia mi. Gracias Hijitos por su amor incondicional, siempre estaré al pendiente de Ustedes y nunca les fallaré.
- A mis Hermanos: Susana, Pablo (Finado), Ma. Del Rosario, Antonia, y Florentino, por su apoyo, cariño y respeto Gracias, que DIOS les cuide y les colme de Bendiciones a Ustedes y sus Familias.
- A mis Compañeros y amigos: Por su amistad y su gran espíritu de compañerismo mostrado especialmente a Rogelio Aldaco Nuncio, Fco. Chablé Moreno, Roberto Dorantes, Ramiro Vidrio y José Alfredo Montemayor Trejo.

## COMPENDIO

Estudio de algunos factores que influyen en la micropropagación del nogal

(*Carya illinoensis* Koch.)

POR

JOSE ANTONIO RAMÍREZ CORTÉS

DOCTOR EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

ÁREA: HORTICULTURA

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

BUENAVISTA, SALTILLO, COAHUILA. MÉXICO. NOVIEMBRE 2003

Ph.D. Marco Antonio Bustamante García - Asesor -

Palabras claves: Cultivo de tejidos, propagación *in vitro*, oxidación, carbón activado, ácido benzoico.

Las áreas de producción del nogal han sido recientemente incrementadas, debido a los múltiples usos de la nuez en la industria alimentaria. Uno de los problemas de los productores de nuez es la variabilidad que se presenta en los huertos, debido a la influencia de los portainjertos que se utilizan, los cuales son propagados por semilla y lo cual causa decremento en la producción y calidad. Una alternativa para la solución de este problema es la micropropagación de portainjertos que permita la producción de árboles con características homogéneas, sin embargo esta tecnología aún no es factible utilizarla en la producción comercial de portainjertos de nogal, como es común en otros frutales. Este trabajo de investigación fue enfocado al estudio de

algunos factores que afectan la micropropagación de esta planta en estado juvenil y adulto. Tres medios de cultivo fueron usados en este estudio, el WPM (Woody plant medium), MS (Murashige y Skoog) y DKW (Driver y Kuniyuky). Los medios de cultivo fueron suplementados con benciladenina y ácido giberélico. Los explantes fueron desinfectados utilizando fungicida Benonil® e Hipoclorito de sodio al 1 por ciento.

Los resultados mostraron que el WPM fue el medio de cultivo más eficiente, sin embargo fue observada oxidación en el explante, por lo que se probaron varias combinaciones de soluciones controladoras de la oxidación y estimulantes de brotación en el medio WPM. Pruebas complementarias de enraizamiento y deficiencias nutrimentales fueron estudiadas, usando diferentes dosis de ácido indolbutírico e incrementando las concentraciones de calcio y fósforo a 200 y 300 por ciento respectivamente.

El mejor tratamiento para producción de brote fue la combinación de carbón activado y ácido benzoico, determinando que las yemas axilares resultaron el mejor tipo de explante utilizado. Fue observado que el uso de tapas perforadas en frascos no mostró efectos positivos en el desarrollo de brote. Los resultados de las pruebas de enraizamiento, no presentaron una respuesta clara y sólo las dosis de 0.8 y 1.6 mg l<sup>-1</sup> mostraron desarrollo de raíz. Los incrementos del 200 y 300 por ciento de calcio y fósforo respectivamente no corrigieron las deficiencias nutrimentales en los brotes.

## **ABSTRACT**

Study of some factors that influence pecan (*Carya illinoensis* Koch.)

micropropagation

BY

JOSE ANTONIO RAMÍREZ CORTÉS

DOCTOR EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

AREA: HORTICULTURAL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

BUENAVISTA, SALTILLO, COAHUILA. MÉXICO. NOVEMBER 2003

Ph. D. Marco Antonio Bustamante García - Advisor -

Key words: Tissue culture, *in vitro* propagation, oxidation, activated charcoal,  
benzoic acid.

Pecan production has recently grown because of the multiple use of the pecan nut in the alimentary industry. One of the problems the pecan growers are facing, is the variability in the pecan orchards, due to the use of seedling rootstocks which influence the characteristics of the grafted cultivars, which causes a decrease in yield and nut quality. An alternative solution for this problem is the micropropagation of roots stocks, allowing production of pecan trees with homogeneous characteristics; however this technology has not been used for commercial pecan production, as is more common with other fruit trees.

This research work was focused on the study of some factors affecting the micropropagation of this crop in juvenile and adult stages. Three culture mediums were used in this study: WPM (Woody Plant Medium), MS (Murashige and Skoog) and DKW (Driver and Kuniyuky). The culture mediums were supplemented with benziladenine and giberelic acid. Explants were disinfected with fungicide Benonil® and sodium hipoclorite 1 %. The results showed that WPM was the more efficient culture medium, however oxidation of explants was observed, for this reason several combinations of oxidation control solutions and bud breaking stimulants were tested with WPM. Complementary rooting tests and nutrition deficiencies were studied by using different doses of indolbutiric acid and increasing calcium and phosphorous concentrations at 200 and 300 percent, respectively.

The best treatment for shoot production was the combination of activated charcoal and benzoic acid, observing that axial bud was the best explant used. It was observed that use of drilled lids in glass containers, did not show positive effect on shoot development.

The results of rooting test did not present a clear response to the treatments of indolbutiric acid, since only two experiments with 0.8 and 1.6 mg l<sup>-1</sup> showed root development. Increments up to 200 and 300 percent of calcium and phosphorous respectively did not correct the shoot nutritional deficiencies .

## INDICE DE CONTENIDO

	Pagina
<b>COMPENDIO</b> .....	V
<b>ABSTRACT</b> .....	Vii
<b>INDICE DE CONTENIDO</b> .....	Ix
<b>INDICE DE CUADROS</b> .....	Xii
<b>INDICE DE FIGURAS</b> .....	Xiv
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	1
Objetivos e Hipótesis.....	4
Objetivos .....	4
Hipótesis.....	4
<b>REVISIÓN DE LITERATURA</b> .....	5
Importancia del cultivo de tejidos vegetales.....	5
Importancia y propagación del nogal.....	6
Cultivo <i>in vitro</i> del nogal.....	7
Oxidación y su control.....	12
Formación de raicillas.....	15
Desarrollo de planta completa.....	17
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	20
Material de estudio.....	20
Pruebas con nogal adulto.....	20
Árboles sin podar.....	20
Prueba de desinfestación del material vegetal.....	20
Árboles podados.....	23
Pruebas para evitar la oxidación del explante.....	23
Experimento 1.....	23
Experimento 2.....	24
Experimento 3.....	25
Experimento 4.....	25
Segmentos de tallo.....	25
Prueba para estimular la brotación.....	26
Pruebas con plantas jóvenes.....	26
Inducción de la brotación.....	27
Efecto de tres medios de cultivo.....	27
Efecto del carbón activado, ácido benzoico y ácido salicílico.....	29
Efecto de un extracto de raíz, ácido benzoico y una mayor dosis de benciladenina.....	30
Transferencia constante de explantes a medios frescos.....	30

Prueba con Calcio y Fósforo para corregir deficiencias nutricionales.....	31
Efectos del ácido ascórbico, caseína y ácido benzoico	31
Efecto del tiazuron.....	32
Efecto del ácido giberélico AG <sub>3</sub> .....	32
Prueba con tapas que permiten mayor intercambio gaseoso.....	32
Influencia de la posición de la yema sobre el potencial de brotación.....	33
Iniciación del enraizamiento.....	33
Efecto del ácido indolbutírico (AIB), con y sin carbón activado (CA).....	33
Prueba con tres medios de cultivo.....	34
Prueba con dosis elevadas de ácido indolbutírico (AIB).....	35
Modelo estadístico.....	35
Parámetros evaluados.....	36
Análisis estadístico.....	36
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>37</b>
Pruebas con nogal adulto.....	37
Árboles sin podar.....	37
Prueba de desinfección del material vegetal.....	37
Árboles podados.....	39
Pruebas para evitar la oxidación del explante.....	39
Experimento 1.....	39
Experimento 2.....	41
Experimento 3.....	41
Experimento 4.....	43
Segmentos de tallos.....	43
Prueba para estimular brotación.....	47
Pruebas con plantas jóvenes.....	48
Inducción a brotación.....	48
Efecto de tres medios de cultivo.....	49
Efecto del carbón activado, ácido benzoico y ácido salicílico...	50
Efecto de un extracto de raíz, ácido benzoico y una mayor dosis de benciladenina.....	54
Transferencia constante de explantes a medios frescos.....	56
Prueba con Calcio y Fósforo, para corregir deficiencias nutricionales.....	58
Efectos del ácido ascórbico, caseína y ácido benzoico.....	60
Efecto del tiazuron.....	62
Efecto del ácido giberélico (AG <sub>3</sub> ).....	65
Prueba con tapas que permiten mayor intercambio gaseoso.....	67
Influencia de la posición de la yema sobre el potencial de brotación...	68
Iniciación del enraizamiento.....	70
Efecto del ácido indolbutírico (AIB), con y sin carbón activado (CA).....	70
Prueba con tres medios de cultivo.....	72

Prueba con dosis elevadas de ácido indolbutírico (AIB).....	73
<b>CONCLUSIONES</b> .....	75
<b>RESUMEN</b> .....	77
<b>LITERATURA CITADA</b> .....	79

## INDICE DE CUADROS

Cuadro		Pagina
3.1	Tratamientos para la desinfestación de los explantes, variando los tiempos de exposición.....	21
3.2	Componentes inorgánicos de los medios de cultivo utilizados, para la micropropagación del nogal.....	28
3.3	Tratamientos con ácidos benzoico y salicílico, con y sin carbón activado.....	29
3.4	Tratamientos para corregir deficiencias nutricionales.....	31
3.5	Tratamientos para inducir brotación en nogal de tres meses de edad. ....	32
3.6	Prueba de 10 tratamientos a base de AIB con y sin CA, para inducir enraizamiento en brotes obtenidos <i>in vitro</i> .....	34
3.7	Prueba de tres medios de cultivo (MS, WPM y DKW), suplementado en cada caso con dos niveles de AIB (0.8 y 1.6 mg l <sup>-1</sup> ), para enraizamiento de brotes de nogal inducidos <i>in vitro</i> .....	35
4.1	Resultados del proceso de desinfectación de yemas axilares de acuerdo al tratamiento aplicado a los ocho días de cultivo..	38
4.2	Orden en que se fueron oxidando los tejidos de nogal, al ser sumergidos en diferentes soluciones.....	40
4.3	Respuesta de la prueba de tres medios de cultivo al índice de brotación y formación de entrenudos en la multiplicación <i>in vitro</i> del nogal, a los 60 días de cultivo.....	49
4.4	Efecto del ácido benzoico y ácido salicílico con y sin carbón activado sobre el porcentaje de brotación y número de nudos formados en explantes nodales de nogal de tres meses de edad cultivados <i>in vitro</i> , durante 60 días.....	53
4.5	Efecto de extracto de raíz, ácido benzoico y una mayor dosis de benciladenina sobre el porcentaje de explantes con brotes, número de nudos y altura de tallos a los 60 días de cultivo.....	55

4.6	Tendencias resultantes en el experimento donde fueron probadas diferentes dosificaciones de Calcio y Fósforo para evitar muerte regresiva de plántula de nogal <i>in vitro</i> .....	59
4.7	Efectos del ácido benzoico, ácido ascórbico y caseína sobre brotación y cantidad de nudos, en explantes nodales de nogal a los 60 días de cultivo.....	62
4.8	Efecto del TDZ sobre la cantidad de nudos formados y la longitud de tallos a los 60 días de cultivo en explantes de nogal.....	64
4.9	Efecto del ácido giberélico sobre la brotación en explantes de nogal a los 60 días de cultivo.....	65
4.10	Efecto de la posición del explante nodal en la planta, con respecto al ápice, sobre la brotación y el número de nudos a los 60 días de cultivo <i>in vitro</i> .....	69
4.11	Efecto del AIB con y sin carbón activado, sobre el enraizamiento de brotes de nogal inducidos <i>in vitro</i> a los 60 días de cultivo.....	71

## INDICE DE FIGURAS

Figura		Pagina
3.1	Segmentos tomados de árboles adultos de la nogalera de la UAAAN con ápices y yemas axilares.....	22
3.2	Árboles podados en la nogalera de la U.A.A.A.N. de donde fueron tomados los explantes .....	23
3.3	Planta de tres meses de edad , de donde fueron tomados los explantes .....	27
4.1	Diferentes tamaños de explante derivados de árboles de nogal adulto, donde se exhibe, el grado de oxidación resultante a los cinco días de cultivo.....	38
4.2	Apariencia del tejido con un elevado grado de oxidación cuando no fue aplicado ningún tratamiento para cubrir el corte.....	42
4.3	Pequeños brotes obtenidos a partir de tejido meristemático de nogal adulto a los 45 días de cultivo, en un medio WPM...	45
4.4.	Brotos obtenidos a los 60 días de cultivo <i>in vitro</i> , de nudos con yemas axilares de nogal adulto podado drásticamente....	46
4.5	Efecto del ácido benzoico (B) a dos concentraciones ( $10^{-4}$ y $10^{-6}$ M), sobre el % de (B) brotación y la (LT): Longitud de tallos (mm).....	48
4.6	Respuesta de la prueba de tres medios de cultivo al índice de brotación y formación de entrenudos en la multiplicación <i>in vitro</i> del nogal, a los 60 días de cultivo.....	52
4.7	Apariencia de brotes formados en explantes nodales de nogal de tres meses de edad a los 60 días de cultivo, con carbón activado más ácido benzoico a dos concentraciones..	52
4.8	Brotos derivados de segmentos nodales de nogal en etapa juvenil.....	57

4.9	Longitud de tallos de nogal alcanzada a los 60 días de cultivo <i>in vitro</i> , en un medio de cultivo (WPM), donde se agregaron tres compuestos: Ácido benzoico (AB), Ácido ascórbico (AA) y Caseína (CH).....	62
4.10	Efecto del tidiazuron sobre el porcentaje de brotación en explantes nodales de nogal.....	63
4.11	Efecto del ácido giberélico sobre la cantidad de nudos formados (a) y la longitud de tallos en nogal (b), a los 60 días de cultivo.....	66
4.12	Apariencia de los brotes de nogal a los 60 días de cultivo en frascos con tapas perforadas (a) y sin perforar (b).....	68
4.13	Efecto de la posición del explante nodal en la planta, con respecto al ápice sobre la longitud de tallos a los 60 días de cultivo <i>in vitro</i> .....	69
4.14	Raíces formadas en plántulas derivadas de nogal juvenil, observadas en los tratamientos con ácido indolbutírico a dos concentraciones 0.8 y 1.6 mg l <sup>-1</sup> a los 60 días de cultivo.....	71
4.15	Callo formado en plantas de nogal juvenil obtenido <i>in vitro</i> con dos dosificaciones de AIB.....	72
4.16	Callo formado en planta de nogal cultivada <i>in vitro</i> agregando una dosis de 100 mg l <sup>-1</sup> de AIB al medio de cultivo.....	73

## INTRODUCCIÓN

El nogal, es en algunas regiones del país y del mundo una importante fuente de recursos económicos, tanto por la riqueza energética de la nuez como alimento, así como por el valor agregado que adquiere en los diversos procesos desarrollados en la industria alimentaría.

En algunas regiones del norte de México y sur de los Estados Unidos, su cultivo se ha generalizado y tiende a incrementarse rápidamente, sin embargo se han detectados algunos problemas que afectan su desarrollo y limitan su producción; estos pueden ser divididos en dos tipos: Bióticos como la pudrición texana (*Phymatotrichum omnivorum*), ruzno pegado (*Desorden fisiológico*), tizón del extremo del pedúnculo (*Alternaria sp.*), muerte regresiva (*Phymatotrichum omnivorum*, en suelos problemáticos), cáncer del tallo (*Caratocystis sp.*) (Herrera, 1994), (Aguilar, Herrera y Garza, 2002), y abióticos como el daño por déficit de humedad y exceso de sales.

Las variedades que normalmente se establecen, son injertadas sobre patrones obtenidos de semillas que promueven un buen vigor y que permite realizar los injertos a los dos años de crecimiento de la plántula (Arreola y Lagarda 1994), sin embargo estos no garantizan uniformidad de los árboles,

por lo que es difícil conservar características agronómicas deseables que los árboles muestren cuando están recién establecidos.

Por esta razón es necesario generar tecnologías que permitan propagar vegetativamente a los portainjertos deseables, conservando así sus características originales y facilitando el establecimiento de huertos con características más uniformes para un mejor manejo de los huertos.

Brown y Sommer (1982) citan que la propagación vegetativa de leñosas dicotiledóneas es una de de las características genéticas más ventajosas que ha sido practicada por el hombre durante cientos de años; sin embargo en algunas especies es difícil conseguir enraizamiento y propagarlas comercialmente, aún mediante la técnica de cultivo de tejidos, donde sólo se han obtenido algunos progresos en el cultivo de callo, cultivo de cotiledones y cultivo de embriones, pero no se han logrado obtener metodologías que permitan garantizar una propagación comercial exitosa vía cultivo de tejidos.

Al respecto el cultivo de tejidos vegetales es una técnica que facilita la multiplicación de algunas especies y permite conservar su uniformidad genética.

En el caso del nogalero, solamente se han logrado plantas derivadas de embriones somáticos y brotes desarrollados a partir de ápices y yemas axilares, ambas con escaso o nulo enraizamiento, por lo cual resulta muy conveniente realizar estudios que tiendan a desarrollar las metodologías de

micropropagación lo que permitirá incrementar la tasa de multiplicación y obtener plantas genéticamente homogéneas para utilizar como patrón en plantaciones comerciales.

McGranahan y Leslie (1988) señalan que el nogal persa es una especie recalcitrante para propagar vía cultivo de tejidos y además muy susceptible a contaminación, no obstante ellas reportan una técnica exitosa para micropropagar tejidos tomados de árboles de 15 años de edad, mismos que habían sido asperjados con BA ( $100 \text{ mg l}^{-1}$ ) y AG<sub>3</sub> ( $50 \text{ mg l}^{-1}$ ), para inducir crecimiento vigoroso. Al respecto trabajaron con el medio DKW, suplementado con BA y AIB y obtuvieron un 48 por ciento de material introducido libre de patógenos, del que un 69 por ciento produjo brotes.

Bourrain y Navatel (1994) mencionan que el cultivo de yemas laterales de nogal requiere por una parte el uso de patrones vigorosos, con buen sistema radicular y por otra un programa de selección entre semillas de nogal y una investigación conducida a definir las varias fases de producción involucradas en la multiplicación *in vitro* de clones seleccionados. Cuatro factores afectan fuertemente la multiplicación: Medio de cultivo, agente solidificante, temperatura y genotipo. El medio de Driver y Kuniyuky dio mejor calidad de plantas que el medio de MS. El agar Kobe No. 1 y la temperatura de 26 a 28 °C dan las mejores tasas de multiplicación.

## **Objetivos e Hipótesis**

### **Objetivos**

Determinar la forma de reducir o eliminar la oxidación de los explantes, tanto provenientes de tejido adulto como juvenil.

Determinar los compuestos que agregados al medio de cultivo estimulen más la brotación y enraizamiento del nogal *in vitro*.

### **Hipótesis**

La oxidación de los explantes del nogal se puede reducir o eliminar mediante la incorporación al medio de cultivo de materiales "controladores de la oxidación".

El desarrollo de brotes en explantes de nogal y el enraizamiento de estos se puede estimular mediante la incorporación al medio de cultivo con citocininas, giberelinas y auxinas.

## REVISION DE LITERATURA

### Importancia del Cultivo de Tejidos Vegetales

En la actualidad se requiere disponer de material vegetal de alta calidad para establecer cultivos, por lo que se hace uso en la agricultura moderna de paquetes tecnológicos, mismos que contienen una serie de componentes básicos que tienden hacia el manejo de sistemas expertos, los que inciden significativamente en la producción y en el costo de los cultivos.

La Biotecnología es considerada como un conjunto de técnicas que emplean organismos vivos para modificar un producto o servicio. En particular, el Cultivo de Tejidos Vegetales ofrece importantes aplicaciones en la agricultura; tal es caso de la micropropagación de cultivares, la preservación del germoplasma y el mejoramiento genético (Robert y Loyola, 1985).

Esta técnica permite además, hacer estudios básicos en otras disciplinas como: Fisiología, Bioquímica, Morfogénesis y Anatomía vegetal, que por otros medios sería imposible realizar (Villalobos-Arámbula, 1985; Hurtado y Merino, 1987).

## Importancia y propagación del nogal

Juárez (2002) citó que en La Laguna se tiene una superficie plantada de nogal de 5,932 ha, con una producción de 5,789 t de nuez, además de 1,112 ha de nogal en desarrollo.

Arreola y Lagarda (1994) consideran que el nogal es una planta difícil de enraizar, por lo que su propagación se hace mediante el germinado de nuez, para al cabo de dos años injertar la plántula con la variedad deseada, indicando además que dentro de las opciones de nuez para portainjertos en el área de la Laguna se tienen las selecciones: Frutoso, Bola conchos, Una punta, Larga conchos, Western Conchos, Dos puntas y Riverside, destacando de entre estas a las dos primeras.

En el caso del cultivo de tejidos, Wood (1982) señaló que la investigación a la fecha era escasa y por lo general se había trabajado sobre la forma de obtener callo, pero no respecto a la manera de desarrollar brote y raíz.

Yates y Reilly (1990) al determinar la influencia del estado de desarrollo del fruto, reguladores del crecimiento y relación del cultivar, sobre embriogénesis somática en nogal, encontraron que el estado del fruto que más favorece la formación de embriones es cuando el endospermo está líquido, mientras que la mejor combinación hormonal se dio al combinar auxinas y

citocininas, señalando además que se registraron marcadas diferencias en la formación de embriones de acuerdo al tipo de cultivar.

Pijut (1997) señala que el cultivo *in vitro* de *Juglans* ha sido exitosa de 10 años a la fecha, habiéndose reportado multiplicación de la especie a partir de cultivo de callos, yemas axilares, cotiledones, cotiledones inmaduros, ápices, etc. Sin embargo los exudados que emiten los explantes frescos y que causan oxidación ha sido el problema común en muchos de los trabajos con esta especie y una de las formas como se ha ido solucionando es pre-lavando los explantes y transfiriéndolos frecuentemente a medio fresco.

### Cultivo *in vitro* de nogal

En un trabajo de investigación para micropropagar nogal, Sambeek *et al.* (1997) utilizaron árboles de invernadero y técnicas de laboratorio para producir brotes a partir de tejido adulto de *Juglans nigra* (11 cultivares), empleando tres técnicas. La primera con explantes de árboles adultos. La segunda con forzamiento de ramas quecientos de 40 cm, en medio al 50 por ciento de DKW (Driver y kuniyuky) o LP (Lloyd y McCown) suplementado con 1 mM de 8-HQC (8-hidroxiquinoleina citrato) y varios reguladores del crecimiento para producir brotes de 1 a 2 cm de longitud. La tercera involucró ramas de 3 a 7 cm de longitud y yemas latentes de 3 a 10 cm de diámetro, cortando los segmentos de la base de las yemas; encontrando que aunque es más fácil para mantener *in vitro* plántulas provenientes de tejido juvenil, estas fueron

menos exitosas y produjeron menos brotación que el explante tomado de los tallos maduros. Usando el medio LP, menos del 30 por ciento de los explantes produjo exudados visibles durante su establecimiento *in vitro*. Con transferencia cada semana o cada dos semanas de las yemas a medio fresco, la yema terminal de muchos explantes se logra elongar en un período de dos a cuatro meses, tiempo antes a que los brotes axilares hayan proliferado.

Gruselle *et al.* (1995) indican que establecieron un sistema de proliferación *in vitro* de *Juglans regia* trabajando con diferentes fuentes de carbono (sacarosa, glucosa y fructosa) a dos dosificaciones (15 y 30 g l<sup>-1</sup>) cada una. La influencia de la adición de NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> al medio basal (MB) conteniendo los macronutrientes del medio original G-6. El mejor resultado fue obtenido con 3 % de fructosa; mientras que en donde se dio la menor concentración de cada tipo de azúcar apareció la vitrificación de los explantes. Concluyendo que la adición de 100 mg l<sup>-1</sup> de NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> al medio basal combinado con 3 % de fructosa mejoró grandemente la proliferación de *juglans*.

Ponchia y Tonon (1993) mencionaron que los explantes de *Juglans* fueron mejor colectándolos durante los períodos con flujos de crecimiento activo. PVP agregado al medio fue mejor que el glutatión en la reducción de la mortalidad de los explantes debido a los fenoles. El mejor crecimiento y proliferación de brotes se dio en el medio DKW. Este fue importante para reducir la concentración de nitrógeno y evitar la vitrificación. La multiplicación de brotes fue superior con 1 mg l<sup>-1</sup> de BA y 0.01 mg l<sup>-1</sup> de ANA. Microcortes

pueden ser enraizados fuera del sistema *in vitro*, pero solo escaso porcentaje de enraizamiento es logrado.

Hoza *et al.* (1993) estudiaron la proliferación por cultivo de tejidos y el subsecuente enraizamiento, usando medios MS y DKW, enraizados con AG-3, ANA, BA y/o AIB más sacarosa, agar y/o sulfato de adenina en diferentes combinaciones. La mejor proliferación fue obtenida con el medio DKW solidificado con 7 por ciento de agar y conteniendo AIB a  $0.01 \text{ mg l}^{-1}$ , BA a  $1.0 \text{ mg l}^{-1}$  y sulfato de adenina a  $3.0 \text{ mg l}^{-1}$ . El medio MS dio pobres resultados. Generalmente no se obtuvo enraizamiento y fueron recomendados estudios posteriores.

Tarrazo *et al.* (1993) estudiaron la influencia del estado de desarrollo de yemas y los requerimientos del medio nutritivo, sobre la sobrevivencia de explantes cultivados *in vitro* de árboles viejos (50 – 70 años) de *Juglans*. Los resultados mostraron que el estado óptimo fenológico de las yemas del nogal para el cultivo *in vitro*, fue aquel entre la iniciación de la brotación y el inicio de la floración. El tamaño de yema aumentó junto con la emergencia de las primeras hojas de los explantes y esto fue observado solo cuando las yemas del nogal se encontraban en los estados DF y DF2 (hojas completamente abiertas), las que fueron cultivadas en un medio MS modificado. Concluyendo al respecto que el material vegetal cultivado *in vitro* es más eficiente para producir estructuras cuando es tomado en un estado óptimo fenológico de desarrollo de

yemas, por lo que considerando lo anterior, es posible mejorar el sistema de micropropagación de nogal adulto.

Felaliyev (1990) menciona que yemas laterales y ápicales de brotes verdes y maderables de plantas de 1 a 3 años de edad y pruebas de varias variedades y formas mostraron una capacidad de morfogénesis durante el cultivo *in vitro*. Brotes accesorios fueron formados en la base del explante después de 12 semanas cultivadas en medio MS. De cinco medios probados para regeneración de brote, el B5 fue el mejor para la formación del mismo y el DKW para su crecimiento. Incrementando la concentración de BA en el medio MS a 25 mg l<sup>-1</sup> fue inhibida la formación de brote por callo.

Driver y Kuniyuky (1984) trabajando con explantes nodales de nogal de castilla (*Juglans hindis x J. regia*), determinaron que el DKW es un medio específico para la micropropagación de esta planta, mediante el cual obtuvieron brotes múltiples combinando 4.5 µM de BA con 5.0 nM de AIB, reportando además enraizamiento exitoso en un 70 por ciento de los brotes obtenidos.

Hansen y Lazarte (1984) reportan una técnica de micropropagación exitosa en plántulas de nogal de dos meses de edad, utilizando explantes nodales y medio WPM, suplementado con glucosa 2 % y BA en tres dosis, observando que indujo brotación y elongación de los brotes, sin importar la posición de la yema axilar de donde fue tomado el explante; sin embargo, las

mejores tasas de brotación se dieron en la dosis de  $3.0 \text{ mg l}^{-1}$ , y de acuerdo a como la dosis se redujo, la tasa de brotación disminuyó también, similares efectos se dieron en la longitud de brote y el número de hojas.

Corte-Olivares *et al.* (1990) utilizaron un medio de cultivo basal de Dunstan y Short (1977) suplementado con  $0.5 \text{ mM}$  de ácido ascórbico,  $0.044 \text{ }\mu\text{M}$  de picloram,  $4.4 \text{ }\mu\text{M}$  de BA y  $0.8 \%$  de agar; fueron subcultivados a medio fresco los explantes cada 30 días, con lo que reportan una media de un brote por yema, mismos que fueron enraizados exitosamente en un medio basal (BDS), suplementado con  $14.8 \text{ }\mu\text{M}$  de AIB, por cuatro semanas, lográndose un 40 por ciento de enraizamiento.

George (1996) menciona que es difícil micropropagar exitosamente nogal a partir de planta adulta, pero es factible hacerlo a partir de planta en estado juvenil usando medio líquido de WPM y removiendo el explante a medio fresco diariamente durante los primeros cuatro días, además de colocar el cultivo en oscuridad por dos semanas y posteriormente incubándolos en luz. No obstante que el nogal tenga más de una yema por nudo, ha sido difícil obtener más de un brote por nudo, indicando también que en ocasiones es conveniente agregar antibiótico al medio para evitar la contaminación; además se reporta enraizamiento exitoso utilizando  $3 \text{ mg l}^{-1}$  de AIB. Por otra parte señala que la superficie donde se hizo el corte inicia con un ennegrecimiento, mismo que puede continuar aún después de introducido el explante al medio de cultivo;

este daño asociado con la aparición de compuestos fenólicos es usualmente más severo durante el estadio inicial de cultivo y el problema cesa una vez que los explantes inician su crecimiento. El ennegrecimiento de los tejidos es usualmente provocado por una mezcla de compuestos fenólicos y su toxicidad ocurre cuando los fenoles son unidos a proteínas por enlaces de hidrógeno y por su oxidación provocando elevada actividad de las quinonas, las cuales llegan a ser cíclicas o polimerizadas y proteínas oxidadas para formar grandes cantidades de compuestos melánicos, llamados polifenóles; las quinonas pueden también ser producidas por fenoles a través de la acción de enzima peróxidasa la que puede catalizar su oxidación en presencia de peróxido. Este y otros radicales libres son los producidos durante el proceso de disección del explante.

### **Oxidación y su control**

Una vez que se ha realizado un corte en el tejido de una planta que se va a propagar asexualmente, la herida que se produce deja células en diferentes condiciones; unas intactas, otras con ligeros daños y otras más con daños graves o muertas.

En las células que sobreviven, se inician grandes cambios, tendientes a proteger el tejido de la desecación e infecciones con patógenos, así como para buscar estrategias de sobrevivencia.

Por otra parte las células muertas o seriamente dañadas tienden a necrosarse debido a la síntesis y liberación de fenoles, los que son útiles para evitar la infección del tejido herido, y la desecación de células más internas al corte.

Tran (1981) menciona que una de las mayores dificultades encontradas en plantas maderables, orquídeas y otras especies es la excreción de polifenoles y productos de la oxidación como las melaninas, lo que genera un incremento en la cantidad de lignina, suberina y cutina; mientras que por otra parte se inicia la formación de callo alrededor de la superficie del corte; dichos procesos pueden alterar la composición del medio de cultivo y la absorción de metabolitos.

Salisbury y Ross (1994) consideran que algunos fenoles simples al oxidarse y formar quinonas, pueden generar actividad fungistática, bacteriológica e incluso alelopática, para protección del tejido herido. Dentro de los fenoles simples más comunes derivados de la ruta del ácido Shiquímico están el ácido cinámico, p-cumárico, cafeico, ferúlico, clorogénico, protocatecuico y gálico.

Zieslin y Abolitz (1994) estudiaron el efecto del pH sobre la excreción de compuestos fenólicos de raíces o segmentos de estas de rosa, fríjol y lilies africanas incubadas en una solución buffer de fosfato de potasio a varias

concentraciones con pH de 6.2 ó 7.6. La excreción de fenoles fue afectada por la concentración del buffer y el tiempo de incubación de la raíz dentro del mismo; observando que a pH de 6.2 fue marcadamente menor que a 7.6. Por otra parte la excreción fue suprimida por adición de calcio a la solución buffer, siendo más eficiente a pH de 6.2 que a 7.6. Sin embargo la excreción de fenoles inducida por sal fue reducida en un 50 por ciento, cuando el pH de la solución 100 mM fue ajustado a 6.2 con 20 mM de buffer. Mientras que la excreción de electrolitos de segmentos de raíz de rosa expuestos a fosfato de sodio a pH 6.0 fue menor que los expuestos a pH de 7.6.

Raskin (1992) indicó que algunas plantas resistentes a enfermedades, restringen el daño causado por hongos, bacterias o virus fitopatógenos a una pequeña área alrededor del punto de penetración inicial donde la lesión necrótica aparece. Este efecto suicida protectorio de las células es referida como reacción hipersensitiva (RH).

Por otra parte indica que la ruta más importante para la formación de ácido benzoico en plantas es el lado de la cadena correspondiente a la degradación del ácido cinámico, los que son importantes intermediarios en la cadena del ácido shiquímico.

Frinkle y Runeckles (1967) señalaron que algunos fenoles son sintetizados sólo en algunas etapas del crecimiento de las plantas o durante la diferenciación de un tejido particular, cuando existe una concentración

adecuada de precursores en la célula, la que determinará la proporción de biosíntesis en situaciones de estrés, donde además la vacuola es útil como almacén y proveedor de estos y otros compuestos (iones, nutrimentos y metabolitos secundarios), útiles para la adaptación de la planta.

Schwans y Polle (2001) mencionan que el sistema antioxidativo, provee protección contra los efectos tóxicos de especies de oxígeno activadas, indicando que importantes componentes de este sistema protector son defensas enzimáticas como la superóxido dismutasa (SODs), catalasa y peroxidasa, que encuentran al  $O_2^-$  y  $H_2O_2$ , respectivamente; además otros metabolitos como ascorbato, glutatión y tocoferol contribuyen a controlar el nivel de actividad del oxígeno en las plantas.

Raskin (1992) considera al ácido salicílico como un agente señalizador que induce el funcionamiento de mecanismos de defensa contra situaciones de estrés, Por su parte Nawrath y Métraux (1999) mencionan que la acumulación de ácido salicílico en las plantas es provocado por varios tipos de estrés abiótico, lo que a la vez confiere en los vegetales resistencia a patógenos.

### **Formación de raicillas**

Mediante divisiones sucesivas de las células se dan origen a las nuevas raicillas con todas sus estructuras (bandas de Caspary, periciclo, cofia, etc.),

para funcionar como órganos especializados de absorción y soporte y son también conectadas sus estructuras internas con los haces vasculares del tallo.

Salisbury y Ross (1994) indicaron que el crecimiento y desarrollo celulares implica dos cuestiones diferentes; por una parte la división de células meristemáticas y por otra su crecimiento y desarrollo en diferentes planos; estos son determinados por la necesidad de la planta de desarrollar órganos especializados "en este caso raíces", situación regida por las auxinas, lo anterior hace que la orientación de la placa celular, sea de forma perpendicular al sentido de la elongación (división periclinal), para engrosamiento y de forma paralela (división anticlinal), cuando el propósito es elongación, así divisiones sucesivas tanto anticlinales como periclinales dan por resultado la formación de pequeñas raicillas que nacen del periciclo, habiéndose conectado previamente los haces vasculares de estas con los del tejido madre, formando así una nueva planta.

Furuya (1984) indicó que células de parénquima de *pino* tardan entre 10 y 13 días en realizar sus fases de inicio de expansión y disposición de organelos para la multiplicación, la de divisiones sucesivas de células de la periferia y la de diferenciación del meristemoide para formar un primordio de raíz.

Hartman y Kester (1987) mencionan que una vez que se ha realizado un corte en un tejido, en el proceso de cicatrización se inicia la formación de

suberina en la superficie del corte para evitar la desecación, luego una masa callosa y posteriormente el inicio de un incipiente sistema radical, conectado directamente con los haces vasculares del tallo principal. En vegetales de madera dura, las raicillas se inician a formar de capas muy cercanas a la parte externa del cambium.

La formación de raicillas ocurre bajo la influencia de ciertos factores, tales como: formación previa de callo, pH adecuado, escasa lignificación, presencia de auxinas, balance adecuado auxina-citocinina, buena condición fisiológica de la planta madre, edad adecuada y buen estado de sanidad de la misma; además de condiciones ambientales como luz, temperatura y medio físico de enraizamiento.

### **Desarrollo de planta completa**

Cuando las raíces se han formado y están listas para trabajar como órganos especializados de absorción y soporte, se ha completado así el ciclo de eventos necesarios para la formación de una nueva planta completa de manera asexual, ya sea mediante la inducción a enraizado de estacas o plántulas en el sistema *in vitro*.

Salisbury y Ross (1994) mencionan que dentro de las fases de desarrollo de las plantas existen etapas en donde es más fácil lograr el enraizamiento,

sobre todo en especies recalcitrantes, como el nogal, además se indica que con ciertas combinaciones hormonales aunadas a condiciones específicas de ambiente de cultivo en el sistema *in vitro*, es factible lograr enraizamiento de plántulas.

Por otra parte la práctica indica que ésta es una de las especies más difíciles, cuando se trabaja con tejido adulto, sin embargo en la etapa juvenil es más fácil llegar a obtener brotes y raíces, quizás porque los tejidos aún no son altamente especializados.

Chenevard *et al.* (1998) estudiaron características morfológicas y fisiológicas de plantas híbridas de nogal durante su aclimatación en cámara de crecimiento. El estudio fue conducido en dos clones M 41 y D 151, al final de la fase *in vitro*, D 151 produjo más raíces adventicias pero menos hojas que M 41, la que a su vez acumuló más azúcares solubles y almidones. Durante la aclimatación se observó que el crecimiento de raíces en ambas fue bueno, sin embargo el contenido de carbono y materia seca fueron siempre superiores en M 41. Durante los primeros siete días de aclimatación, el balance diario de CO<sub>2</sub> intercambiable fue negativo (respiración fue dominante), durante este período los carbohidratos acumulados fueron utilizados en crecimiento y mantenimiento de procesos. No obstante el balance diario de CO<sub>2</sub> intercambiable llegó a ser positivo después de esta fase heterotrófica. Las nuevas hojas formadas durante la aclimatación parecen ser activamente involucradas en la adquisición de autotrofia. Al final de la fase de aclimatación el contenido de carbohidratos de

todos los órganos fue muy bajo y las plantas fueron dependientes de su fotosíntesis.

## **MATERIALES Y METODOS**

La investigación fue realizada en el laboratorio de Biotecnología del Departamento de Horticultura de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Unidad Saltillo.

### **Material de estudio**

El material vegetativo utilizado en este trabajo fue nogal adulto (20 a 25 años) var. Western, procedentes de la nogalera de la misma Universidad, además de plantas jóvenes de tres meses de edad provenientes de semilla criolla.

### **Pruebas con nogal adulto**

#### **Árboles sin podar**

#### **Prueba de desinfestación del material vegetal**

La determinación del protocolo de desinfestación se realizó exponiendo segmentos de tallo que contenían ápices y varias yemas axilares

(Figura 3.1) a dos compuestos desinfectantes durante cuatro períodos de tiempo (Cuadro 3.1), para determinar en el que menor incidencia de patógenos registrara, así como el que menos daño causara al material.

Primeramente los segmentos de tallo fueron tratados con el fungicida Benonil®: Clorotalonil, 2787 W-75 por ciento (Clorotalonil: Tetracloroisoftalonitrilo 75 por ciento, ingredientes inertes 25 por ciento), a una concentración de 3575 ppm, para luego transferirlos a cámara de flujo laminar donde fueron tratados con Hipoclorito de Sodio al 1 por ciento, más una pizca de detergente Roma <sup>MR</sup>, manejado este como surfactante.

Cuadro 3.1. Tratamientos para la desinfección de los explantes, variando los tiempos de exposición.

Tratamiento	Compuestos desinfectantes y tiempos de exposición	
	Benonil (min)	Hipoclorito de sodio (min)
1	7	7
2	10	10
3	15	15
4	30	20

Posteriormente se dieron cuatro enjuagues con agua destilada esterilizada y fueron disectados los explantes (ápice y segmento nodal) en una caja de petri para luego ser sembrados cuatro por frasco (gerber) y seis

repeticiones (frascos) por tratamiento, en el medio (30 ml) de cultivo (Lloyd y McCown 1981) sólido WPM, sin reguladores del crecimiento.

La incubación de los cultivos se realizó en una incubadora con 25 °C y 16 horas luz.

La evaluación del proceso se realizó cuantificando el porcentaje de explantes que sobrevivieron y el porcentaje de contaminación.

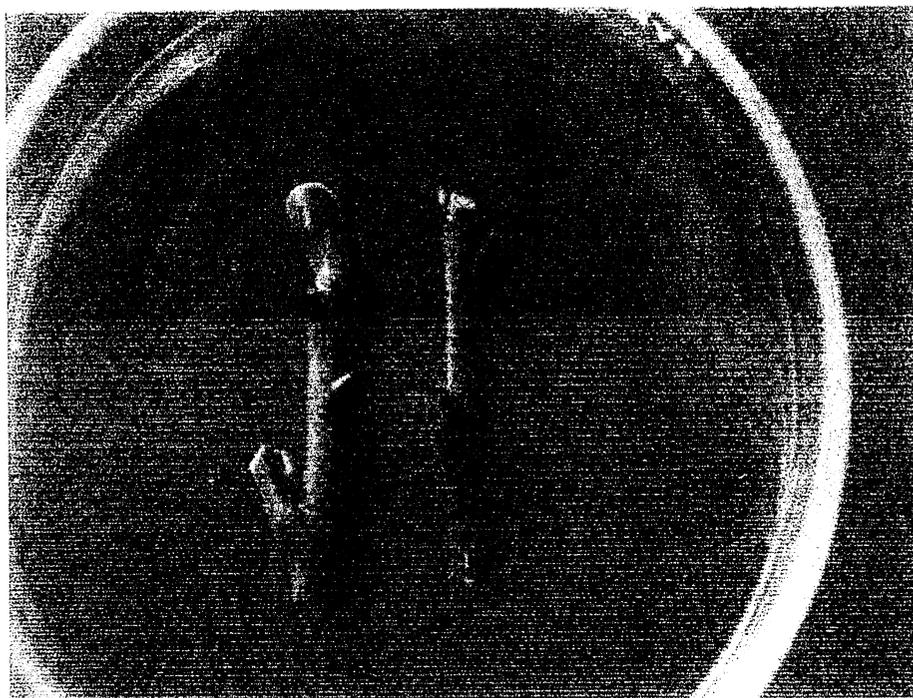


Figura 3.1. Segmentos tomados de árboles adultos de la nogalera de la UAAAN, con ápices y yemas axilares.

### Árboles podados (Figura 3.2)



Figura 3.2. Árboles podados en la nogalera de la UAAAN de donde fueron tomados los explantes.

### **Pruebas para evitar la oxidación del explante**

#### **Experimento 1**

Se probaron varios compuestos disueltos en agua al 0.02 por ciento, donde se sumergieron segmentos de tallo (sin previa desinfestación) con ápices y yemas axilares, lo que haría factible observar el grado y avance de

la oxidación, durante un período de cinco horas, bajo condiciones normales de laboratorio.

### Compuestos probados

- \* Sulfato de cobre
- \* EDTA
- \* Carbón activado
- \* Ácido ascórbico

## Experimento 2

Otra prueba que se realizó fue utilizando un medio de cultivo WPM líquido, suplementado con los componentes orgánicos del medio (Murashige y Skoog, 1962) MS, más BA 3.6 mg l<sup>-1</sup>, AIB 0.01 mg l<sup>-1</sup>, AG<sub>3</sub> 1.9 mg l<sup>-1</sup>, sacarosa 30 g l<sup>-1</sup>, pH ajustado a 5.8 y dos materiales "controladores de la oxidación", ácido ascórbico (500 mg l<sup>-1</sup>) ó carbón activado (500 mg l<sup>-1</sup>); los explantes (segmentos nodales tomados de tallos, desinfectados de acuerdo al tratamiento dos, con árboles sin podar) fueron colocados en puentes de papel filtro, teniendo un explante por frasco y seis frascos por tratamiento. La incubación se realizó como se mencionó anteriormente.

### **Experimento 3**

Este experimento se hizo con el fin de detectar la influencia de aplicar dos compuestos en polvo al corte del explante (nudo con yema axilar disectados de tallos desinfectados como anteriormente se menciona), antes de ser sembrados en un medio WPM sólido con reguladores del crecimiento, sobre el nivel de afectación del tejido por la oxidación.

Compuestos probados

Ácido ascórbico

Carbón activado

Se tuvieron cuatro explantes por frasco y seis frascos (repeticiones) por tratamiento; la incubación fue similar al experimento anterior.

### **Experimento 4**

#### **Segmentos de tallos**

Fueron desinfectados y posteriormente disectados los explantes (meristemas, ápices y segmentos nodales) bajo una condición especial, que consistió en realizar los cortes manteniendo el tejido inmerso en una solución con ácido cítrico ( $75 \text{ mg l}^{-1}$ ) y ácido ascórbico ( $50 \text{ mg l}^{-1}$ ) y posteriormente

sembrándolos en un medio WPM sólido con reguladores del crecimiento al que le fue agregado carbón activado ( $0.5 \text{ g l}^{-1}$ ) y ácido benzoico  $10^{-6} \text{ M}$ . Se tuvieron cuatro explantes por frasco y seis frascos (repeticiones) por tratamiento o tipo de explante; la incubación fue similar a las anteriores.

### **Prueba para estimular brotación**

Segmentos nodales tomados de tallos desinfectados como anteriormente se menciona, fueron sembrados en un medio WPM sólido con reguladores del crecimiento y suplementado con dos concentraciones de ácido benzoico ( $10^{-4}$  y  $10^{-6} \text{ M}$ ), se tuvieron cuatro explantes por frasco y seis repeticiones (frascos) por tratamiento, incubándose bajo las condiciones ya mencionadas. Después de dos meses se evaluó el porcentaje de brotación, la longitud de tallos y el número de nudos.

### **Pruebas con plantas jóvenes**

Las plantas de donde se tomaron los explantes (segmentos nodales), para esta etapa se muestran en la Figura 3.3. Dichos tejidos para su siembra *in vitro*, fueron desinfectados y disectados bajo condiciones semejantes a las descritas en los ensayos anteriores con material adulto, considerando que dicho protocolo había dado buenos resultados.

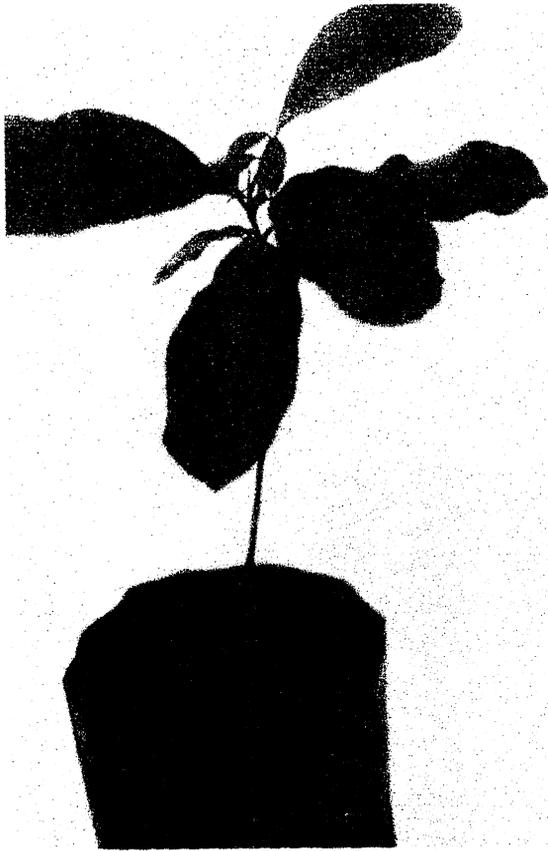


Figura 3.3. Planta de tres meses de edad, de donde fueron tomados explantes.

### Inducción de la brotación

#### **Efecto de tres medios de cultivo**

Se probaron los componentes inorgánicos de tres medios de cultivo (Cuadro 3.2), reportados como adecuados para el cultivo del nogal: MS (Murashige y Skoog, 1962), WPM (Lloyd y McCown, 1981) y DKW (Driver y Kuniyuky, 1984). Los componentes orgánicos fueron los del medio MS, suplementados con BA  $3.6 \text{ mg l}^{-1}$ , AIB  $0.01 \text{ mg l}^{-1}$ , AG<sub>3</sub>  $1.9 \text{ mg l}^{-1}$ , agar a razón de  $6 \text{ g l}^{-1}$ , sacarosa  $30 \text{ g l}^{-1}$ , carbón activado  $0.5 \text{ g l}^{-1}$  y un pH de 5.8; en

este y los subsecuentes experimentos se tuvieron cuatro explantes por frasco y seis frascos (repeticiones) por tratamiento, incubándose como ya se ha

Cuadro 3.2. Componentes inorgánicos de los medios de cultivo utilizados para la micropropagación del nogal.

Sales	Medios básicos		
	MS (mg l <sup>-1</sup> )	WPM (mg l <sup>-1</sup> )	DKW
<b>I. Nitratos</b>			
KNO <sub>3</sub>	1900		
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650	400	17.7 mMolar
Ca (NO <sub>3</sub> ).4H <sub>2</sub> O			8.3 mMolar
Zn (NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O			57.2 μMolar
<b>II. Sulfatos</b>			
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	370	370	3.0 mMolar
MnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O	22.3		
MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O			200.0 μMolar
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	8.6	8.6	
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0.025	0.25	1 μMolar
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>		990	
KH <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>			8.95 mMolar
<b>III. Halógenos</b>			
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	440	96	1 mMolar
KI	0.83		
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0.025		
<b>IV. Fosfatos, Boratos y Molibdatos</b>			
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170	170	1.9 mMolar
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6.2	6.2	77.6 μMolar
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0.25	0.25	1.6 μMolar
<b>V. Na, Fe, EDTA</b>			
Na <sub>2</sub> EDTA.2H <sub>2</sub> O	37.3	37.3	
Na <sub>2</sub> EDTA			0.12 mMolar
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	27.8	27.8	0.12 mMolar

mencionado anteriormente. Así mismo la evaluación del porcentaje de brotación, longitud de tallos y número de nudos se realizó a los dos meses de cultivo.

### Efecto del carbón activado, ácido benzoico y ácido salicílico

La prueba con los ácidos benzoico y salicílico a dos concentraciones, el primero a  $1 \times 10^{-4}$  M y  $1 \times 10^{-6}$  M y el segundo a  $1 \times 10^{-4}$  M y  $1 \times 10^{-5}$  M, ambos con y sin carbón activado ( $0.5 \text{ mg l}^{-1}$ ) en un medio WPM (con los mismos reguladores del crecimiento utilizados en el experimento anterior), generó un total de 10 tratamientos, descritos en el Cuadro 3.3.

Cuadro 3.3. Tratamientos con ácidos benzoico y salicílico con y sin carbón activado.

Tratamiento	Medio de cultivo	Agregado especial	Concentración
1	WPM - CA (Testigo)	----	
2	WPM + CA (Testigo)	----	
3	WPM + CA	Ácido benzoico	$10^{-4}$ M
4	WPM + CA	Ácido benzoico	$10^{-6}$ M
5	WPM - CA	Ácido benzoico	$10^{-4}$ M
6	WPM - CA	Ácido benzoico	$10^{-6}$ M
7	WPM + CA	Ácido salicílico	$10^{-4}$ M
8	WPM + CA	Ácido salicílico	$10^{-5}$ M
9	WPM - CA	Ácido salicílico	$10^{-4}$ M
10	WPM - CA	Ácido salicílico	$10^{-5}$ M

## **Efecto de un extracto de raíz, ácido benzoico y una mayor dosis de benciladenina**

Los explantes nodales fueron sembrados en un medio sólido WPM, con los mismos reguladores del crecimiento mencionados anteriormente, más carbón activado ( $0.5 \text{ g l}^{-1}$ ), agregándoseles extracto de raíz, ácido benzoico y una mayor dosis de benciladenina.

### **Medios de cultivo**

1. Medio + CA (Testigo)
2. Medio + CA + Extracto de raíz (liquido extraído en mortero de:  $0.1344 \text{ g}$ )
3. Medio + CA + Ácido benzoico ( $1 \times 10^{-6} \text{ M}$ )
4. Medio + CA + Ácido benzoico ( $1 \times 10^{-6} \text{ M}$ ) + Extracto de raíz
5. Medio + CA + Ácido benzoico ( $1 \times 10^{-6} \text{ M}$ ) + BA( $7 \text{ mg l}^{-1}$ )

### **Transferencia constante de explantes a medios frescos**

Por otra parte se estableció un trabajo en donde se realizaron transferencias constantes de los explantes a medio WPM fresco, con reguladores del crecimiento más carbón activado y ácido benzoico, siendo estos utilizados en todos los subsecuentes experimentos. Los cambios se efectuaron cada siete días y los efectos fueron comparados con un testigo que no estuvo sujeto a cambios constantes.

## Prueba con Calcio y Fósforo para corregir deficiencias nutricionales

Durante el desarrollo de los trabajos fue observado en hojas de brotes inducidos *in vitro*, una coloración café rojiza, típica de deficiencia de fósforo y además un necrosamiento y muerte del ápice, situación que se atribuyó a una probable deficiencia de calcio, razón por la cual se diseñó un experimento donde la dosis de ambos elementos se duplicó o triplicó (Cuadro 3.4), en relación a la dosis normal contenida en el medio WPM.

Cuadro 3.4. Tratamientos para corregir deficiencias nutrimentales observadas en brotes de nogales inducidos *in vitro*.

Tratamientos	Proporción aumentada de Ca, respecto a la normal del medio	Proporción aumentada de P, respecto a la normal del medio
1	1 X	1 X
2	1 X	2 X
3	1 X	3 X
4	2 X	1 X
5	2 X	2 X
6	2 X	3 X

## Efectos del ácido ascórbico, caseína y ácido benzoico

En esta prueba se manejaron dos compuestos (ácido ascórbico y caseína), para comparar con el ácido benzoico respecto a la eficiencia en la inducción de brotes (Cuadro 3.5).

Cuadro 3.5. Tratamientos para inducir brotación en nogal de tres meses de edad.

Tratamiento	Compuesto probado	Dosis
1	Ácido benzoico	$1 \times 10^{-6}$ M
2	Ácido ascórbico	100 mg l <sup>-1</sup>
3	Caseína	2 mg l <sup>-1</sup>

### Efecto del Tidiazuron (TDZ)

Se realizó un experimento que permitiera evaluar el efecto del TDZ, sobre la brotación del explante, teniéndose cinco tratamientos (0.1, 0.2, 0.4, 0.8 y 1.6 mg l<sup>-1</sup>) y un testigo sin TDZ, pero que sin embargo si contenía la dosis que normalmente fue utilizada de benciladenina (3.5 mg l<sup>-1</sup>).

### Efecto del ácido giberélico (GA<sub>3</sub>)

Se diseñó un experimento para evaluar el efecto del AG<sub>3</sub> (0, 2, 4 y 8 mg l<sup>-1</sup>), sobre la inducción de brotación, teniendo el medio nutritivo BA y AIB a las mismas dosis utilizadas anteriormente pero sin AG<sub>3</sub>.

### Prueba con tapas que permiten mayor intercambio gaseoso

Considerando la posibilidad de incrementar el intercambio gaseoso entre el explante y su ambiente de incubación, algunos frascos fueron manejados utilizando tapas con un orificio, mismo que fue cubierto con

algodón, mientras que en otros la tapa fue la normal de polipropileno sin ninguna perforación. Este trabajo permitió comparar el desarrollo de las plántulas en ambos sistemas y determinar la condición más conveniente de la tapa para cubrir e incubar el material.

### **Influencia de la posición de la yema sobre el potencial de brotación**

Para determinar la influencia de la posición de la yema en la planta, sobre su capacidad de brotación *in vitro*, se utilizaron explantes nodales provenientes de tres posiciones respecto al ápice (primer nudo, segundo nudo y tercer nudo).

### **Iniciación del enraizamiento**

### **Efecto del ácido indolbutírico (AIB), con y sin carbón activado (CA)**

Con la finalidad de inducir enraizamiento en brotes de explantes inducidos *in vitro*, fueron manejadas varias dosis de AIB (Cuadro 3.6), con y sin carbón activado, utilizándose el medio sólido WPM, sin los otros reguladores del crecimiento (BA y GA<sub>3</sub>), pero conteniendo ácido benzoico (1X10<sup>-6</sup>M)

Cuadro 3.6. Prueba de 10 tratamientos a base de AIB con y sin CA, para inducir enraizamiento en brotes obtenidos *in vitro*.

Tratamiento	CA	AIB (mg l <sup>-1</sup> )
1	+	0.0
2	+	0.2
3	+	0.4
4	+	0.8
5	+	1.6
6	-	0.0
7	-	0.2
8	-	0.4
9	-	0.8
10	-	1.6

### **Prueba con tres medios de cultivo**

Una vez determinada la dosificación del AIB más próxima a inducir enraizamiento, se procedió a determinar la influencia de los componentes inorgánicos de tres medios de cultivo (MS, WPM Y DKW), suplementados con los mismos componentes de los medios para inducción de brotación a excepción de los reguladores del crecimiento (BA y AG<sub>3</sub>) y el carbón activado, considerando solamente las dosificaciones de ácido indolbutírico, como se puede ver en el Cuadro 3.7.

Cuadro 3.7. Prueba de tres medios de cultivo (MS, WPM y DKW), suplementado en cada caso con dos niveles de AIB (0.8 y 1.6 mg l<sup>-1</sup>), para enraizamiento de brotes de nogal inducidos *in vitro*.

Medio de cultivo	AIB (mg l <sup>-1</sup> )
DKW	0.8
DKW	1.6
WPM	0.8
WPM	1.6
MS	0.8
MS	1.6

### Prueba con dosis elevadas de ácido indolbutírico (AIB)

Además de las pruebas anteriores donde fueron considerados componentes inorgánicos de tres medios de cultivo, diferentes niveles de AIB y carbón agregado al medio, fue necesario realizar un trabajo donde fueran manejadas dosificaciones elevadas de AIB (0.0, 0.8, 1.6, 3.2, 10, 50 y 100 mg l<sup>-1</sup>), para determinar su efecto en el enraizamiento de brotes.

### Modelo Estadístico

Así los datos de las diferentes variables evaluadas fueron analizados bajo el siguiente modelo estadístico.

Modelo:

$$Y_i = \mu + T_i + E_i$$

Donde:  $Y_i$  = Variable sujeta a evaluación

$\mu$  = Media general

$T_i$  = Efecto del  $i$  – ésimo tratamiento

$E_i$  = Error experimental

### **Parámetros evaluados**

Los parámetros evaluados fueron de acuerdo al estudio realizado

Brotación

Longitud de tallos

Número de nudos

Oxidación del explante

### **Análisis Estadístico**

Los cultivos fueron establecidos en un diseño completamente al azar y los resultados fueron analizados mediante el ANAVA al 1 y 5 por ciento de significancia, la prueba de comparación de medias de Tukey, además de estimaciones cualitativas, porcentuales y análisis gráficos.

El paquete estadístico utilizado para el análisis de datos fue el de la Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Agronomía (Olivares, 1994).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Pruebas con nogal adulto

#### Árboles sin podar

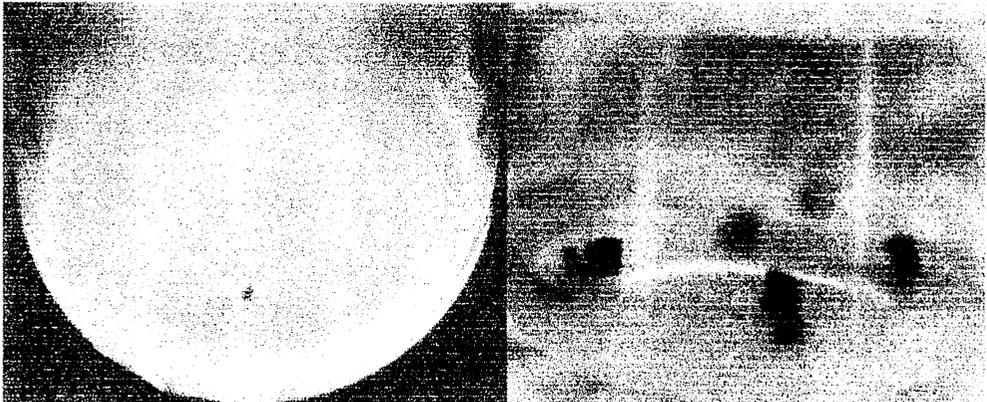
#### Prueba de desinfestación del material vegetal

Los resultados de la prueba indicaron que el mejor tratamiento fue el dos que consistió en la inmersión del explante a una solución de Fungicida Benonil durante 10 min., posteriormente se recibió en la cámara de Flujo Laminar en una solución de Hipoclorito de sodio al 1 por ciento más una pizca de detergente Roma <sup>MR</sup>, durante 10 min., finalmente se dieron cuatro enjuagues y se sembraron los explantes; observándose un índice de sobrevivencia del 91 por ciento y un porcentaje de contaminación del 17 por ciento. En el caso del primer tratamiento registró el mejor porcentaje sobrevivencia pero también el mayor grado de contaminación, no así los tratamientos tres y cuatro donde se registraron los menores índices de contaminación y supervivencia, lo que se debió a la intensidad del proceso de desinfestación a que fueron sometidos, como se puede ver en el Cuadro 4.1.

**Cuadro 4.1. Resultados del proceso de desinfestación de yemas axilares de acuerdo al tratamiento aplicado a los 8 días de cultivo.**

Tratamiento	Supervivencia (%)	Contaminación (%)
1. Benonil 7 min+ NaOCl 7 min	95	45
2. Benonil 10 min+ NaOCl 10 min	91	17
3. Benonil 15 min+ NaOCl 15 min	47	6
4. Benonil 30 min+ NaOCl 20 min	10	4

Además se encontró que el grado de oxidación del explante ocurrió de acuerdo a su tamaño observándose que explantes nodales de un cm compuestos por una varetta con su yema sufrieron menos oxidación que ápices (Figura 4.1).



**Meristemo**

**Segmento nodal**

**Figura 4.1. Diferentes tamaños de explante derivados de árboles de nogal adulto, donde se exhibe, el grado de oxidación resultante a los cinco días de cultivo.**

## Árboles podados

### **Pruebas para evitar la oxidación del explante**

#### **Experimento 1**

El experimento fue diseñado buscando conocer la velocidad con que se oxidaba un tejido (tallo con yema axilar), al ser expuesto a la acción de diferentes tipos de soluciones formuladas por compuestos que incrementaban el potencial oxidativo de los tejidos, así como por componentes controladores de la oxidación.

Como se observa en el Cuadro 4.2, la solución a base de sulfato de cobre fue la que más rápidamente indujo la formación de polifenoles, observándose rápidamente obscurecimiento de los tejidos; este compuesto provocó el grado de oxidación más rápida, incluso que el testigo, efecto que probablemente fue debido a la acción del cobre que es un elemento que estimula fuertemente la actividad de la enzima catecol oxidaza y ésta a su vez la ruta de síntesis de fenólicos (George, 1996), considerando que este es un metal de transición que aumenta la velocidad de reacciones Fenton que producen radicales libres con alto poder oxidante (comunicación personal Benavides, 2003).

Por su parte con el EDTA fue el tercero en oxidarse, considerando que su efecto como molécula quelante que pudiese atrapar a los fenoles no es muy efectiva sobre éstos.

En cambio tanto el carbón activado (capturador de fenólicos), como el ácido ascórbico (antioxidante), evitaron visiblemente la oxidación del tejido, por lo que para este trabajo fueron considerados como los mejores materiales factibles de utilizar en las pruebas con tejido del nogal.

Torres (1989) señaló que el carbón activado en el medio puede ser muy útil absorbiendo compuestos inhibidores del crecimiento, aunque también puede retener algunos reguladores del crecimiento.

Foyer (1993) menciona que el ascorbato funciona como un reductor de radicales libres, minimizando el daño por oxidación y que además es el compuesto antioxidante que más rápida y eficientemente reacciona con el oxígeno activado.

Cuadro 4.2. Orden en que se fueron oxidando los tejidos de nogal, al ser sumergidos en diferentes soluciones.

Tratamiento aplicado	Orden de oxidación
3. Agua + Sulfato de Cobre	Primero
1. Testigo (Agua destilada)	Segundo
4. Agua + EDTA	Tercero
5. Agua + CA	No se oxidó
2. Agua + Ácido Ascórbico	No se oxidó

## Experimento 2

En la prueba con un medio líquido suplementado con dos materiales “controladores de la oxidación”, ácido ascórbico y carbón activado, los explantes (yema axilar), fueron colocados sobre un puente de papel filtro. Resultando el explante completamente oxidado 24 horas después, lo que muy posiblemente se debió al manejo a que estuvo sometido durante las primeras etapas, donde todavía no había sido determinada con precisión una metodología de recolección, desinfectación y disección del mismo, causando que el material sufriera serios daños lo que generó una rápida aparición de polifenóles.

Torres (1989) mencionó algunas bondades de utilizar medios de cultivo líquidos sobre todo para el cultivo de callos; sin embargo en esta prueba se trató de inducir crecimiento de brote directamente de la yema, lo que pudo haber sido una razón para no lograr éxito en este caso.

## Experimento 3

En la prueba con dos compuestos “controladores de la oxidación” (carbón activado y ácido ascórbico), que fueron aplicados al corte del explante más un testigo al que no se le agregó ningún material que pudiera controlar la oxidación, resultó ser una de las más interesantes (Figura 4.2).

Las observaciones fueron realizadas en períodos de tiempo variables y mostraron que el material vegetal tuvo un grado similar de oscurecimiento exterior, mismo que fue iniciado en la vareta. Este registro se obtuvo a las 8 h, posteriormente a las 24 h presentaron una ligera oxidación en la base de la yema y a los cinco días la mitad aproximadamente estaba oxidada, sin embargo al hacer cortes se pudo ver que el interior permanecía verde, lo que derivó en la siguiente propuesta de manejar el explante al realizar la disección y siembra del mismo.

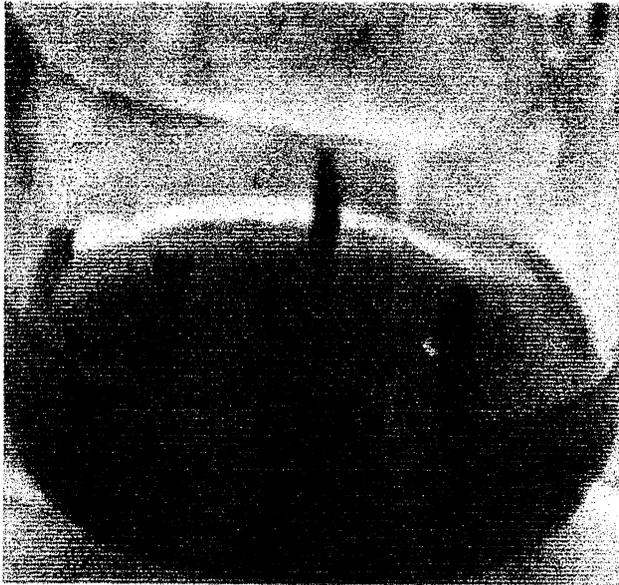


Figura 4.2. Apariencia del tejido con un elevado grado de oxidación cuando no fue aplicado ningún tratamiento para cubrir el corte.

## Experimento 4

### Segmentos de tallos

La disección del explante se llevó a cabo haciendo los cortes al mismo dentro de una solución antioxidante a base de ácido ascórbico ( $50 \text{ mg l}^{-1}$ ) y ácido cítrico ( $75 \text{ mg l}^{-1}$ ), con la cual se logró establecer exitosamente el cultivo de explantes tomados de árboles adultos podados.

Esta metodología también resultó ser efectiva para el establecimiento y desarrollo de yemas axilares de nogal en etapa juvenil (tres meses de edad).

Durante el desarrollo de este trabajo también se pudo observar el efecto de algunos factores y procedimientos que inciden en la introducción exitosa del material vegetal al cultivo *in vitro*; especialmente sobre el grado de oxidación.

Al respecto se encontró, que el explante entre más sea maltratado, más cortes tenga, más se sumerja al medio de cultivo y cuanto más pequeño sea, mayor será el grado de oxidación que sufra. En función de lo anterior es posible considerar que las yemas de nogal pueden ser establecidas exitosamente, siempre que sea seguido el protocolo descrito anteriormente.

En este experimento fueron introducidos tres tipos de explantes (meristemas, ápices y segmentos nodales), los resultados mostraron para el caso del ápice y nudo con yema axilar una severa oxidación del tejido, la cual pudo haberse debido por una parte al estrés generado por el déficit de humedad a que los árboles estuvieron sometidos hasta el momento de su recolección e introducción, y por otra al estricto proceso de desinfestación a que fueron sometidos. Bowler *et al.* (1992) indicaron que el estrés oxidativo es un fenómeno que degrada los sistemas biológicos y se presenta cuando los tejidos son sometidos a algún tipo de estrés.

George (1996) señaló que el daño resultante de la producción de pigmentos oscuros es más severo durante el estadio inicial del cultivo y deja de ser un problema una vez que el explante inicia su crecimiento, este efecto es muy dependiente del genotipo, sobre todo en géneros que tienen contenidos naturales elevados de taninos y otros hidroxifenoles.

Estos resultados contrastan con los reportados en la micropropagación de *Juglans* por Tarrazo *et al.* (1993), en un estudio para determinar la influencia del estado de desarrollo de las yemas y los requerimientos del medio nutritivo, en la sobrevivencia de explantes derivados de árboles viejos (50 – 70 años) de *Juglans*; donde reportaron micropropagación exitosa, indicando entre otras cosas que el momento idóneo para recolectar yemas y cultivarlas *in vitro*, es desde el inicio de la brotación hasta el inicio de floración, pero que los árboles no estén

sometidos a ningún tipo de estrés y se encuentren en un buen estado de sanidad.

Los meristemas en cambio, permanecieron verdes, lo que pudo haberse debido a las características de las células que componen el tejido las que son pequeñas, escasamente vacuoladas y están programadas para realizar divisiones constantes (Bidwell, 1979), lo que no permitió la síntesis y almacenamiento de fenólicos, sino de aminoácidos y proteínas lo que indujo a la formación de pequeños brotes que aunque no alcanzaron a desarrollar (Figura 4.3), su aparición permite suponer que es factible buscar una forma de elongarlos, mediante pruebas en otras condiciones de cultivo e incubación.

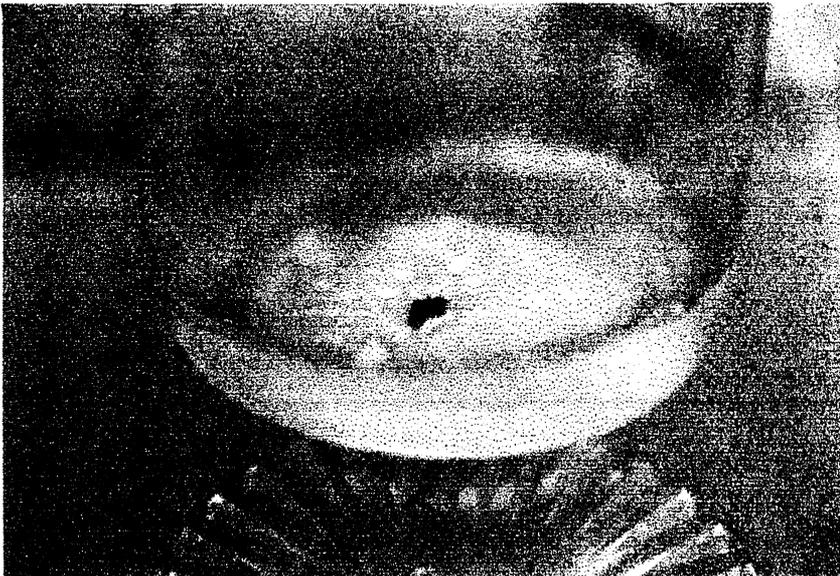


Figura 4.3. Pequeños brotes obtenidos a partir de tejido meristemático de nogal adulto a los 45 días de cultivo, en un medio WPM.

El meristemo y el nudo con yema axilar que fueron disectados inmersos en una solución de ácido cítrico y ácido ascórbico y sembrados en medio con carbón activado y ácido benzoico  $10^{-6}$  M, ambos sobrevivieron sin problemas de oxidación, el primero formó pequeños brotes, al igual que los meristemas tomados de árboles sin podar, sin embargo el segundo mostró brotes de mucho mayor tamaño (Figura 4.4), aunque solo uno por explante, que no desarrollaron nudos. Su aparición durante los primeros 15 días, es una señal de que mediante la búsqueda de otras alternativas de cultivo estos lleguen a desarrollar. Al respecto, George (1996), indicó que tejidos provenientes de árboles maduros previamente podados de forma drástica, son frecuentemente menos dañados por la aparición de fenólicos que aquellos tomados de árboles adultos que no hayan sido sometidos a ninguna poda.



Figura 4.4. Brotes obtenidos a los 60 días de cultivo *in vitro*, de nudos con yemas axilares de nogal adulto podado drásticamente.

## Prueba para estimular brotación

La evaluación de la eficiencia del ácido benzoico a dosis de  $10^{-4}$  y  $10^{-6}$  M sobre el desarrollo de explantes nodales de nogal adulto cultivadas *in vitro*, reflejó que es posible obtener brotaciones hasta de un 92 y 83 por ciento, como se puede observar en la Figura 4.5; donde además los brotes elongaron 7 y 5 mm respectivamente; sin embargo, en ninguno de los casos se lograron desarrollar nudos. No obstante, estos resultados pueden considerarse como un buen precedente, para trabajos posteriores donde se busque exclusivamente alargar los brotes y procurar que se formen nudos.

Raskin (1992) indicó que muchos compuestos fenólicos juegan un rol esencial en la regulación del crecimiento de las plantas, en la biosíntesis de lignina (importante componente estructural de la pared celular), en la germinación, formación de ahustorios y activación de mecanismos de defensa de las plantas. Por otra parte consignó que el ácido benzoico además de estimular el funcionamiento de la cadena de transporte de electrones, tiene una influencia notable en la formación de estructuras florales en *lemna paucicostata*.

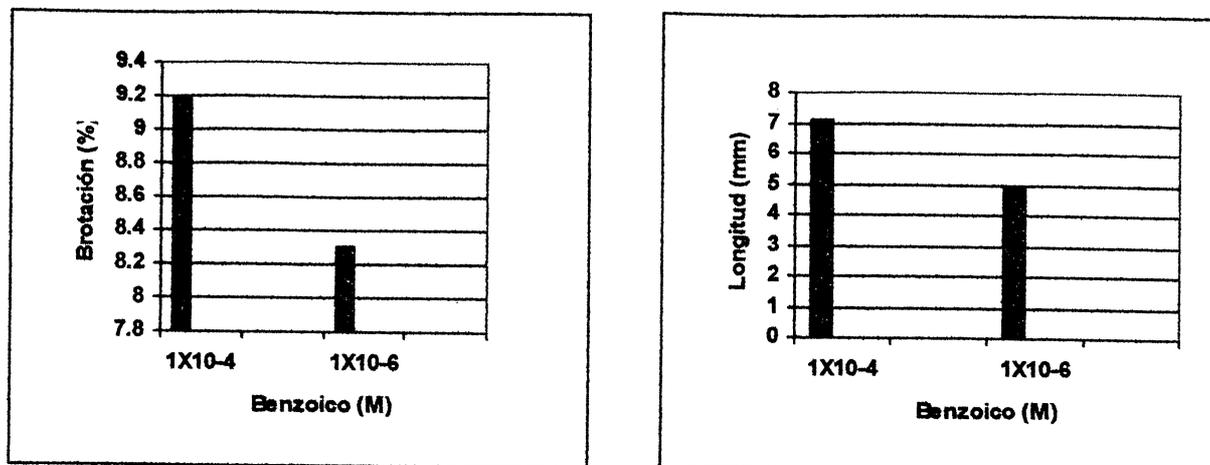


Figura 4.5. Efecto del ácido benzoico (B) a dos concentraciones ( $10^{-4}$  y  $10^{-6}$  M), sobre el por ciento de (B) brotación y la (LT): Longitud de tallos (mm).

### Pruebas con plantas jóvenes

#### Inducción a brotación

En los explantes tomados de segmentos nodales, se obtuvieron tasas de brotación del 92 por ciento, utilizando la metodología ya descrita. Wood (1982) trabajando con plántula de cuatro a doce semanas de edad, reportó brotación exitosa.

En función de estos resultados, se decidió manejar los nudos con yemas axilares como explante en los siguientes experimentos, de este modo fueron aprovechadas la mayoría de las yemas de las plantas jóvenes, lo que incrementó considerablemente la disponibilidad de material vegetal, mientras que de utilizarse el ápice o meristemo, sólo se dispondría de uno por planta,

además en el caso del meristemo su manejo es complicado y el desarrollo que alcanzó fue muy raquítico, lo que posiblemente se debió al pequeño tamaño del explante.

### Efecto de tres medios de cultivo

En esta prueba donde se manejaron tres medios de cultivo, el porcentaje de brotación registró un comportamiento similar en los tratamientos dos (WPM) y tres (DKW), siendo ligeramente superior el WPM. No así el MS donde se obtuvo la menor respuesta (89 por ciento) y fue estadísticamente diferente a los anteriores (Cuadro 4.3). Por otra parte la cantidad de nudos formados y la longitud de tallos, manifestaron diferencia significativa en sus respuestas, donde además se observa que fue superior el WPM con siete entrenudos y 17.9 mm de longitud, mientras que el medio con respuesta menor fue el MS.

Cuadro 4.3. Respuesta de la prueba de tres medios de cultivo al índice de brotación y formación de entrenudos en la multiplicación *in vitro* del nogal, a los 60 días de cultivo.

Medio de cultivo	Brotación (%)	No. Entrenudos	Altura de tallos (mm)
MS	89 B <sup>+</sup>	5 A B	11.22 C
WPM	92 A	7 A	17.89 A
DKW	91 A	4 B	13.54 B

<sup>+</sup>Prueba de comparación de medias de Tukey al 5 % de significancia estadística.

Driver y Kuniyuky (1984) reportaron múltiple formación de brotes en un medio WPM, suplementado con BA  $4.5 \mu\text{M}$  y AIB  $5.0 \text{ nM}$  mientras que McGranahan y Leslie (1988) utilizando el medio de cultivo DKW, suplementado con  $1 \text{ mg l}^{-1}$  de BA y  $0.01 \text{ mg l}^{-1}$  de AIB, obtuvieron brotación exitosa; además mencionaron que dando mayor cantidad de enjuagues (más de tres), al explante después de su desinfestación, la tasa de sobrevivencia del mismo se incrementaba del 13 a 48 por ciento.

Wood (1982) obtuvo buenos resultados trabajando con explantes provenientes de plantas en estado juvenil y utilizando el medio WPM, adicionado con BA  $4 \text{ mg l}^{-1}$  y AIB  $1 \text{ mg l}^{-1}$ ; indicando que este tratamiento fue más eficiente en la formación y crecimiento de brotes que los formulados a base de 2iP y AIA; este efecto reflejó el hecho de que los reguladores sintéticos BA y AIB son más activos biológicamente que los compuestos nativos 2iP y AIA.

### **Efecto del carbón activado, ácido benzoico y ácido salicílico**

Los resultados de las pruebas en donde fueron agregados al medio ácido benzoico y salicílico con y sin carbón activado, sobre el porciento de explantes con brotes no mostraron diferencia significativa entre tratamientos, sin embargo se observó (Cuadro 4.4) que en los medios con carbón activado la respuesta fue de un 50 por ciento de explantes con brotes tanto en el

testigo, como en los que contenían ácido benzoico  $10^{-4}$  y  $10^{-6}$  M; mientras que los medios sin carbón activado produjeron solamente un 25 por ciento de brotación a excepción del medio con salicílico  $10^{-4}$  M con un 50 por ciento, el resto de los tratamientos con salicílico, presentaron solamente un 25 por ciento independientemente de si contenían o no carbón activado.

Respecto a la longitud de tallos (Figura 4.6), los mejores tratamientos fueron también los que contenían ácido benzoico y carbón activado, alcanzando valores de 11 y 11.5 mm en los tratamientos tres y cuatro respectivamente. Estos tratamientos superaron también a los que contenían ácido salicílico y al testigo. Es importante indicar que los tratamientos sin carbón activado registraron longitudes menores de tallo, lo que sugiere que es un componente imprescindible para estimular el crecimiento en el cultivo *in vitro* del nogal.

El parámetro número de nudos manifestó diferencia significativa (al 5 por ciento), entre tratamientos, siendo superior el correspondiente a la dosis de  $10^{-4}$  M de ácido benzoico con seis, seguido del  $10^{-6}$  M, con 5.5, ambos con carbón activado; por otra parte los valores menores se registraron en los tratamientos sin carbón activado, independientemente del contenido de ácido benzoico o salicílico (Figura 4.7).

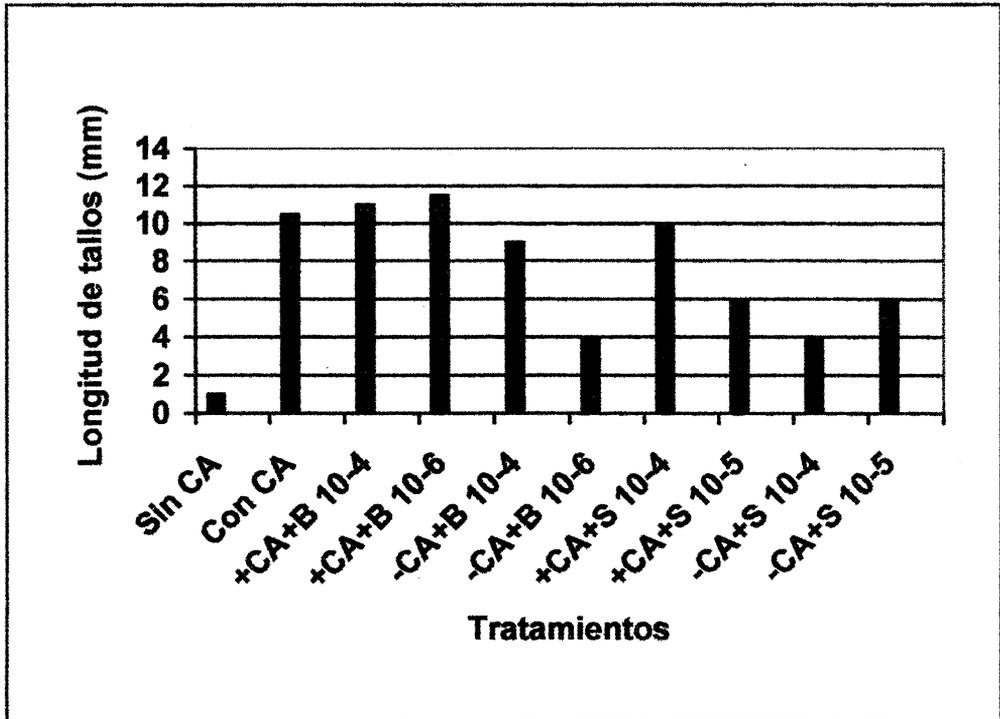
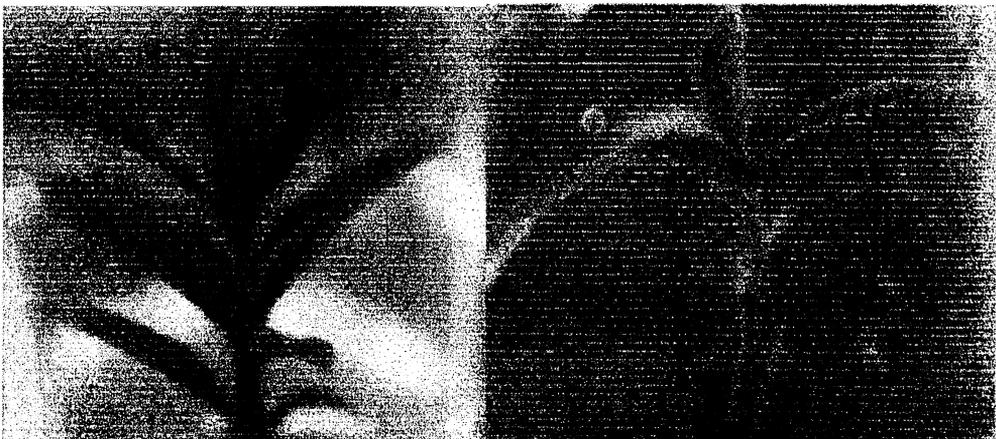


Figura 4.6. Longitud de brotes de nogal inducidos en explantes nodales de plantas de tres meses de edad, cultivados *in vitro*.



3. Con CA + B 10<sup>-4</sup> M

4. Con CA + B 10<sup>-6</sup> M

Figura 4.7. Apariencia de brotes formados en explantes nodales de nogal de tres meses de edad a los 60 días de cultivo, con carbón activado más ácido benzoico a dos concentraciones.

Cuadro 4.4. Efecto del ácido benzoico y ácido salicílico con y sin carbón activado sobre el porcentaje de brotación y número de nudos formados en explantes nodales de nogal de tres meses de edad cultivados *in vitro*, durante 60 días.

Tratamientos	Brotación (%)	No. Nudos	
1. Sin CA	50	1.35	B
2. Con CA	50	4.2	A
3. Con CA + B $10^{-4}$	50	6	A
4. Con CA + B $10^{-6}$	50	5.5	A
5. Sin CA + B $10^{-4}$	25	1	B
6. Sin CA + B $10^{-6}$	25	1	B
7. Con CA + S $10^{-4}$	25	5	A
8. Con CA + S $10^{-5}$	25	2	B
9. Sin CA + S $10^{-4}$	50	1	B
10. Sin CA + S $10^{-5}$	25	2	B

<sup>†</sup>Prueba de comparación de medias de Tukey al 5 % de significancia estadística.

Es importante señalar que en todos los parámetros evaluados en esta prueba, los mejores tratamientos fueron los que contenía carbón activado y ácido benzoico, lo que evidencia un probable efecto sinérgico entre ambos compuestos, mismo que influye favorablemente en la micropropagación de la especie, sin embargo es necesario realizar mayor cantidad de estudios sobre estos componentes manejando otras variedades y especies de *Carya*. Raskin (1992) mencionó que el ácido benzoico y salicílico, son dos compuestos que las plantas sintetizan y tienen efecto sinérgico con el ácido giberélico influyendo sobre la formación de yemas florales e incrementando la cantidad de compuestos tales como: RNA,

fosfatasa y algunos tipos de proteínas; por lo que en base a los resultados obtenidos es factible suponer un efecto parecido que resultó en una formación de nudos y crecimiento de plántulas del nogal. George (1996) por su parte menciona que las ventajas de utilizar el carbón activado en el medio de cultivo son entre otras las siguientes: absorbe compuestos secretados por el tejido o presentes en el agar que pudiesen inhibir el crecimiento, previenen el crecimiento de callo no deseado, estimulan la morfogénesis y formación de raíces.

### **Efecto de un extracto de raíz, ácido benzoico y una mayor dosis de benciladenina**

En este experimento se observó (Cuadro 4.5) una diferencia significativa en el parámetro por ciento de explantes con brotes en los tratamientos probados, manifestándose como superiores el testigo, el suplementado con ácido benzoico y el que contenía extracto de savia de raíz, mientras que en el caso del número de nudos no se manifestó diferencia estadística entre tratamientos, aunque se mostró como ligeramente superior el testigo con cinco nudos formados, seguido del tratamiento que contenía ácido benzoico con 4.2.

Cuadro 4.5. Efecto de extracto de raíz, ácido benzoico y una mayor dosis de benciladenina sobre el porcentaje de explantes con brotes, número de nudos y altura de tallos a los 60 días de cultivo.

Medio de cultivo	% Explantes con brote		Número de Nudos	Longitud de tallos (mm)
1. + CA (Testigo)	50	A	5	12.33 A <sup>+</sup> B
2. + CA + Extracto	50	A	4	11.25 A B
3. + CA + A. Benzoico $1 \times 10^{-6} \text{M}$	50	A	4.2	16.40 A
4. +CA +B $1 \times 10^{-6} \text{M}$ + EXT.	25	B	3.4	11.60 A B
5. +CA+B $1 \times 10^{-6} \text{M}$ +Extracto+2X(BA)	25	B	3.3	10.40 B

<sup>+</sup>Prueba de comparación de medias de Tukey al 5 % de significancia estadística.

El parámetro longitud de tallos registró diferencia significativa (5 por ciento), entre tratamientos, manifestándose como ligeramente superior el tratamiento que contenía ácido benzoico a una concentración de  $10^{-6} \text{M}$  (16.40 mm de longitud), seguido del testigo (12.33 mm), mientras el tratamiento que menor altura alcanzó fue el suplementado con doble dosis de Benciladenina, aunque éste fue estadísticamente similar a los tratamientos donde se probó extracto de savia de radícula y al testigo.

Wood (1982) por su parte determinó que la dosificación donde el logró inducir una mayor brotación fue la de  $8 \text{ mg l}^{-1}$  de BA con tres brotes, sin embargo se observó que las plantas mostraron un crecimiento raquítrico,

mientras que en la dosis de  $32 \text{ mg l}^{-1}$  los explantes murieron y cuando utilizó 2iP no obtuvo resultados satisfactorios. En el caso de longitud de tallos, el autor reporta que ésta no fue afectada significativamente por niveles de BA mayores a  $2 \text{ mg l}^{-1}$  combinado con  $1 \text{ mg l}^{-1}$  de 2iP, aunque a concentraciones superiores se pudo observar una reducción del tamaño, por lo que recomienda  $4 \text{ mg l}^{-1}$  de BA como la mejor dosis, para micropropagación de nogal. De acuerdo a los resultados descritos es factible considerar que los mejores tratamientos para el este experimento fueron el testigo y el que contenía ácido benzoico.

Por otra parte, Hansen y Lazarte (1984) probando tres dosis de Benciladenina ( $0.3$ ,  $1.0$  y  $3.0 \text{ mg l}^{-1}$ ), indicaron que con  $3.0 \text{ mg l}^{-1}$  se obtuvieron 1.5 brotes de 25.1 mm de longitud y 5.3 hojas contra un brote de 15 mm y 2.9 hojas en la dosis de  $0.3 \text{ mg l}^{-1}$  de BA.

### **Transferencia constante de explantes a medios frescos**

El resultado de realizar transferencias constantes del explante (cada 7 días), a medio nuevo, fue similar al testigo (donde la plántula no fue transferida ninguna vez); así a los 35 días de cultivo, el desarrollo de brote, número de nudos y longitud de tallos fue muy similar, incluso presentando la misma apariencia en porte y coloración de la hoja (Figura 4.8). Estos resultados coinciden con los reportados por Wood (1982), quien obtuvo brotes utilizando dos medios, uno de iniciación y otro de crecimiento cada uno

durante cuatro semanas. El observo que al incubar el explante en el mismo medio por cuatro semanas o más resultó detrimental en el vigor del mismo.



Con cambios sucesivos  
(cada siete días)

Sin cambios

Figura 4.8. Brotes derivados de segmentos nodales de nogal en etapa juvenil.

McGranahan y Leslie (1988) observaron clorosis, abscisión de hojas y escaso crecimiento, cuando se realizó transferencia de plántulas cada tres o seis días. Corte *et al.* (1990) mencionaron que lograron microrpropagación exitosa de árboles de tres a cuatro años de edad, haciendo cambios cada 30 días a medio fresco. Por su parte Driver y Kuniyuki (1984) reportaron resultados favorables en la microrpropagación de un híbrido de nogal, haciendo cambios a medio fresco cada semana.

## **Prueba con Calcio y Fósforo, para corregir deficiencias nutricionales**

En este trabajo diseñado para buscar controlar deficiencias nutrimentales y necrosis apical de las plántulas, los resultados (Cuadro 4.6) no mostraron una tendencia clara mediante la cual se pudiese seguir algún criterio para resolver el problema observando que la apariencia de las plantas no se modificó sustancialmente con relación a la inicialmente observada, por lo que es factible pensar que los daños fueron irreversibles debido probablemente a que no se hizo el cambio de los explantes a medio nuevo antes de que los síntomas fueran manifiestos. Lo anterior sugiere la conveniencia de estudiar el hecho de hacer subcultivos cada 15 días. Al respecto McGranahan y Leslie (1988) señalan que en un trabajo para micropropagar nogal, observaron una lenta pérdida del vigor de las plantas (clorosis, abscisión de hojas y escaso crecimiento), de acuerdo a como se realizaban las transferencias (cada tres o seis días durante los primeros dos meses), posiblemente porque implicaba movimiento y cortes basales de los explantes. Asimismo después de tres o cuatro meses de cultivo se observó un cambio en la morfología de los explantes, consistente en una reducción del tamaño de la hoja, pero una mejor adaptación al sistema, llegando a obtener plántula floreada en un período de 10 a 24 meses de edad. Similar comportamiento había sido descrito por Wood (1982), donde además determinó que cuando se incrementaron los niveles de BA los brotes exhibieron un color rojizo.

Cuadro 4.6. Tendencias resultantes en el experimento donde fueron probadas diferentes dosificaciones de Calcio y Fósforo para evitar muerte regresiva de plántula de nogal *in vitro*.

Concentración de elemento con respecto a la normal		Ápice seco (%)	Ápice verde (%)
Ca	P		
1X	1X	22	78
1X	2X	22	78
1X	3X	37.5	62.5
2X	1X	25	75
2X	2X	14.3	85.7
2X	3X	16.6	83.4

En base a lo anterior es factible pensar que de acuerdo al tiempo de cultivo la planta reduce su vigor, pero que además la cantidad de reguladores que se aplican al medio también suele influir en el desarrollo, reflejando algunos síntomas de deficiencias nutricionales, por lo que es factible considerar que una forma de tener éxito en este tipo de pruebas es buscando realizarla tomando explantes de brotes que ya han sido micropropagados exitosamente.

Al respecto Singha *et al.* (1990) cultivando ápices de *Cydonia oblonga*. Mill, en un medio MS suplementado con BA 5  $\mu$ M y phytagar 0.6 por ciento, observaron la aparición de necrosis apical y vitrificación de los

explantes, atribuyendo el problema a una interacción entre los niveles de calcio y el grado de solidez del medio; para lo que probaron tres dosis de calcio y tres de phytagar, encontrando que cuando los niveles de calcio se incrementaron de 3 a 9 mM el problema de necrosis se redujo considerablemente, mientras que cuando los niveles de phytagar se incrementaron de 0.6 a 0.9 por ciento se redujo sensiblemente el grado de vitrificación de las plántulas; por lo que la combinación más apropiada para solucionar ambos problemas resultó ser de 9 mM de calcio con 0.9 por ciento de phytagar.

George (1996) por su parte indicó que la necrosis apical que generalmente se presenta en el cultivo *in vitro* de especies maderables obedece a una deficiencia de calcio en el ápice del brote ya sea debido a que el ión no es absorbido en forma adecuada del medio o bien a fallas en la traslocación del mismo en el tejido.

Al respecto fue observable que aún con doble dosis de Ca y P o doble Ca y Triple P no se evitó el secamiento del ápice.

### **Efectos del ácido ascórbico, caseína y ácido benzoico**

La evaluación realizada a los 60 días de cultivo mostró que tanto el ácido benzoico como el ácido ascórbico se comportaron de una manera muy similar respecto al porcentaje de explantes con brotes, ambos con 91 por

ciento, como se puede ver en el Cuadro 4.7; no así en el caso de la caseína, donde el porcentaje de brotación fue menor.

Por otra parte la cantidad de nudos formados en los brotes derivados de estos tratamientos fueron estadísticamente diferentes, siendo superiores los que contenían ácido benzoico y caseína, mientras que donde se agregó al medio de cultivo ácido ascórbico se obtuvo la menor cantidad de entrenudos formados.

La longitud de tallos se manifestó con una tendencia similar a la observada para el número de nudos; así los tratamientos a base de ácido benzoico y caseína, se mostraron como ligeramente superiores a los que contenían ácido ascórbico (Figura 4.9).

De acuerdo al desarrollo del trabajo alcanzado hasta este punto, es factible manejar como una opción viable para desarrollar la etapa de multiplicación *in vitro* del nogal, el agregar al medio de cultivo ácido benzoico a una concentración de  $10^{-6}$  si se pretende elongar los brotes o bien  $10^{-4}$  M si se busca estimular la brotación o favorecer el desarrollo de nudos, considerando que estas respuestas pueden deberse al probable efecto del compuesto como molécula señalizadora que estimula la formación de biomasa en los tejidos (Raskin, 1992).

Cuadro 4.7 Efectos del ácido benzoico, ácido ascórbico y caseína sobre brotación y cantidad de nudos, en explantes nodales de nogal a los 60 días de cultivo.

Tratamiento	Brotación (%)	No. de Nudos
Ác. Benzoico $10^{-6}M$	91.5 A <sup>+</sup>	5.8 A
Ác. Ascórbico $100 \text{ mg l}^{-1}$	91.1 A	4.5 B
Caseína $2 \text{ mg l}^{-1}$	77 B	5.7 A

<sup>+</sup>Prueba de comparación de medias de Tukey al 5 % de significancia estadística.

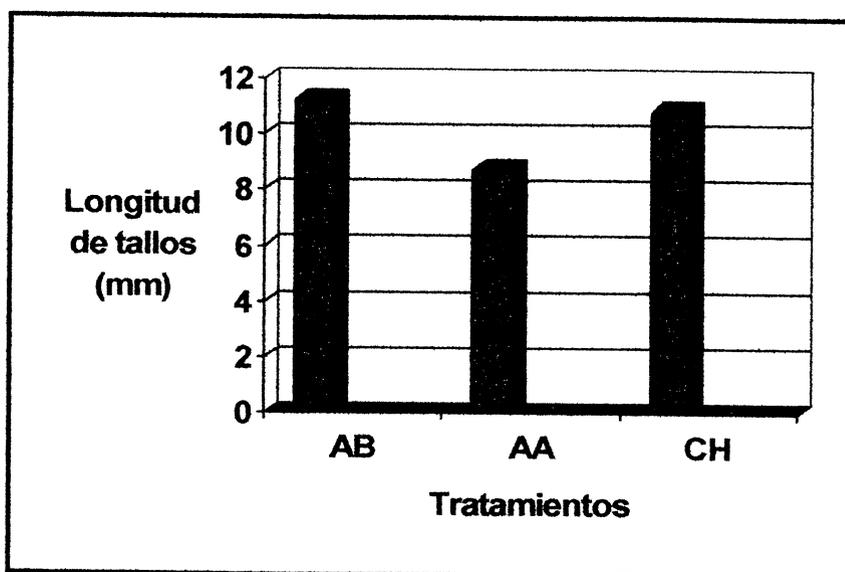


Figura 4.9. Longitud de tallos de nogal alcanzada a los 60 días de cultivo *in vitro*, en un medio de cultivo (WPM), donde se agregaron tres compuestos: Ácido benzoico (AB), Ácido ascórbico (AA) y Caseína (CH).

### Efecto del Tidiazuron (TDZ)

En el experimento donde fueron probadas varias dosificaciones de TDZ, se encontró (Figura 4.10) que el porcentaje de brotación fue superior en el testigo con un 90 %, mostrando luego una tendencia a decrecer cuando la

cantidad del TDZ fue incrementada hasta  $0.8 \text{ mg l}^{-1}$ , donde registró su nivel mínimo, aunque se observó incremento nuevamente a dosificaciones de  $1.6 \text{ mg l}^{-1}$ . Como se puede ver, la respuesta no fue “consistente” a la dosis máxima probada, por lo que es conveniente realizar mayor investigación con las cantidades agregadas de este compuesto al medio.

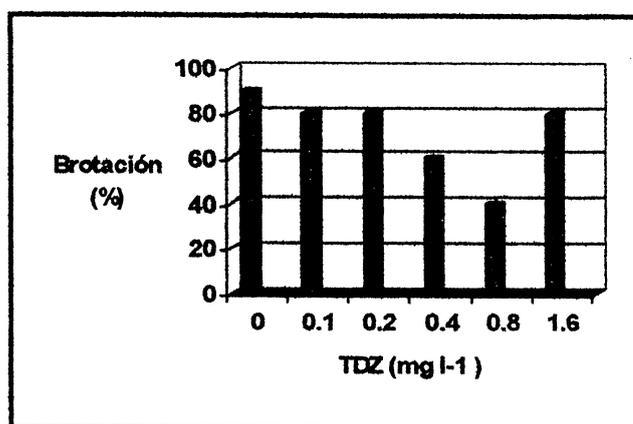


Figura 4.10. Efecto del tidiazuron sobre el porcentaje de brotación en explantes nodales de nogal.

En el caso de la cantidad de nudos que se formaron, con la incorporación al medio de cultivo del TDZ, se manifestó una diferencia altamente significativa entre tratamientos al 0.05 de significancia, donde los mejores fueron  $0.4$ ,  $0.0$  y  $0.8 \text{ mg l}^{-1}$  con 7.5, 6.7 y 6.3 nudos (Cuadro 4.8), no así con  $0.2$ ,  $0.1$  y  $1.6 \text{ mg l}^{-1}$  que fue donde se registraron las menores cantidades.

Cuadro 4.8. Efecto del TDZ sobre la cantidad de nudos formados y la longitud de tallos a los 60 días de cultivo en explantes de nogal.

TDZ (mg l <sup>-1</sup> )	No. De Nudos	Longitud de Tallos (mm)
0.0	6.7 A <sup>+</sup> B	16.9 A B
0.1	5.0 B C	12.7 B C
0.2	4.3 C	12.1 C
0.4	7.5 A	20.6 A
0.8	6.3 A B	13.0 B C
1.6	5.4 B C	14.4 B C

<sup>+</sup>Prueba de comparación de medias de Tukey al 5 % de significancia estadística.

La longitud de tallo mostró una tendencia muy parecida a la observada en el parámetro anterior, manifestándose también como superiores los tratamientos con 0.4, 0.0 y 0.8 mg l<sup>-1</sup> mientras que con 0.2 mg l<sup>-1</sup>, fue donde se registró la menor longitud.

De acuerdo a los resultados obtenidos, es factible considerar que para estimular brotación, elongar tallos o incrementar cantidad de nudos desarrollados no es necesario aplicar TDZ, puesto que en todas sus dosificaciones se observaron resultados inferiores al testigo, por lo que pudiera considerarse que no influye determinadamente en la formación de estas estructuras en nogal, sin embargo puede ser útil en inducir otros tipos de crecimiento morfológicos.

Al respecto Obeidy y Smith (1993), buscando inducir organogenesis a partir de cotiledones de nogal, y utilizando el compuesto TDZ agregado al medio a dosis de 25  $\mu\text{M}$ , encontraron que se estimuló considerablemente la formación de callo.

### Efecto del ácido giberélico ( $\text{AG}_3$ )

Las dosis de  $\text{AG}_3$  aplicadas al medio de cultivo no favorecieron las tasas de brotación como se aprecia en el Cuadro 4.9, donde el testigo registró el mayor porcentaje (90 por ciento), mientras que los tratamientos con AG tendieron a reducir considerablemente la formación de brotes.

Cuadro 4.9. Efecto del ácido giberélico sobre la brotación en explantes de nogal a los 60 días de cultivo.

$\text{AG}_3$ ( $\text{mg l}^{-1}$ )	Brotación (%)	
0.0	90	A <sup>+</sup>
0.2	75	B
0.4	50	C
0.8	70	B

<sup>+</sup>Prueba de comparación de medias de Tukey al 5 % de significancia estadística.

En lo que respecta al número de nudos y longitud de tallos (Figura 4.11), se dio un efecto diferente, observándose incremento en sus valores de acuerdo al aumento de la dosis del  $\text{AG}_3$ , donde el efecto fue más constante

sobre la longitud de tallos, que sobre el número de nudos. La mayor formación de nudos se registró en el tratamiento con  $0.2 \text{ mg l}^{-1}$  y la mayor longitud de tallos con  $0.8 \text{ mg l}^{-1}$ , mientras que los valores mas bajos se manifestaron en el testigo; lo cual indica que el AG<sub>3</sub> influye de una manera positiva sobre estos.

Wood (1982) reportó obtención de brotes utilizando un medio de iniciación con BA y AIB, y posteriormente pasados a un medio de crecimiento con  $0.1 \text{ mg l}^{-1}$  de BA y  $3 \text{ mg l}^{-1}$  de AG<sub>3</sub>, durante cuatro semanas, mencionando que manejados de esta manera incrementaron su crecimiento, con respecto al tratamiento que contenía solamente BA y AIB.

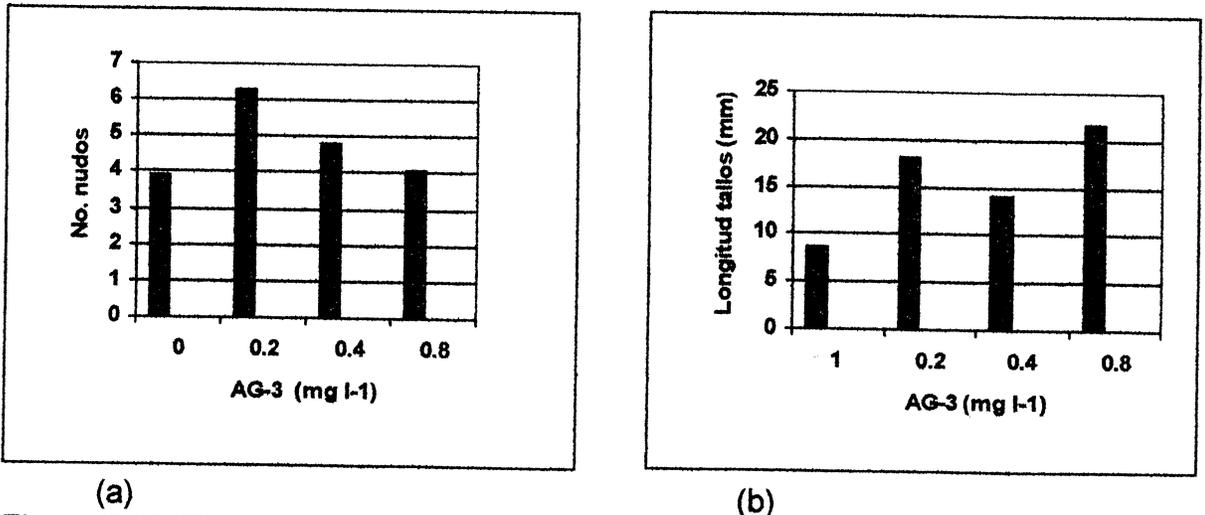


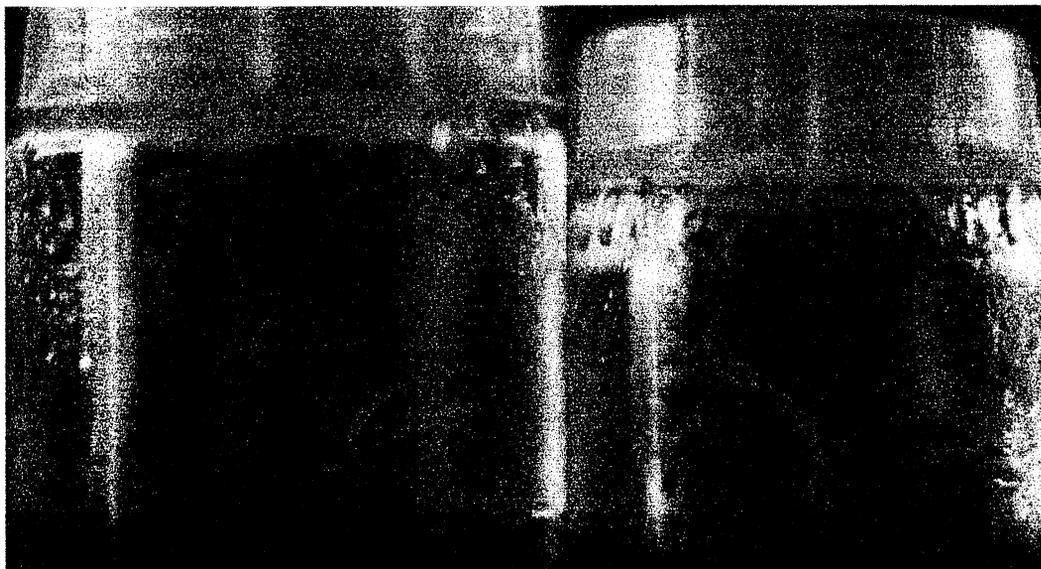
Figura 4.11. Efecto del ácido giberélico sobre la cantidad de nudos formados (a) y la longitud de tallos en nogal (b), a los 60 días de cultivo.

### Prueba con tapas que permiten mayor intercambio gaseoso

En el trabajo donde fueron probadas tapas (adaptadas mediante una perforación, misma que fue cubierta con algodón), que generaran un mayor intercambio de gases del sistema frasco-planta y su medio ambiente donde fue incubada, el explante se comportó de manera similar a las que crecieron en frascos sin orificio (testigo), donde se suponía que no tenían la misma facilidad para realizar intercambio gaseoso. Así los tratamientos registraron valores de los parámetros evaluados muy parecidos, con tasas de brotación del orden de un 92 por ciento, la longitud de tallos de 14 a 16 mm y el número de nudos entre cuatro y seis, como se puede ver en la Figura 4.12.

Por lo que se asume que no es necesario utilizar frascos con un mayor intercambio gaseoso, al menos durante los primeros 30 días de cultivo, en el caso del cultivo de yemas axilares de nogal juvenil *in vitro*; sin embargo esta aseveración debe ser considerada puesto que no fue evaluado el intercambio de gases entre el interior y el exterior del frasco.

Al respecto, Niu *et al.* (1998) mencionan que el sistema fotosintético de las plantas *in vitro*, es lo suficientemente desarrollado para proveer un balance adecuado de carbono a la planta, pero que sin embargo puede evaluarse su habilidad fotosintética haciendo variar la cantidad de azúcar (que es considerada como la principal fuente de carbono de que una planta dispone) agregada al medio de cultivo.



a) b)  
 Figura 4.12. Apariencia de los brotes de nogal a los 60 días de cultivo en frascos con tapas perforadas (a) y sin perforar (b),

#### **Influencia de la posición de la yema sobre el potencial de brotación**

El Cuadro 4.10 muestra la influencia de la posición de la yema en el tallo de nogal sobre la capacidad de brotación y número de nudos generados, observándose que en la brotación no se manifestó diferencia significativa entre tratamientos, lo que indica que la posición de la yema no es determinante en el potencial de brotación de las mismas, sin embargo fue visible una mayor brotación en la tercera yema.

Esta tendencia observada en el parámetro anterior fue similar para el caso del número de nudos, en el que se obtuvo diferencia significativa entre tratamientos, siendo superior la tercera yema con 5.3 nudos, seguida de la

segunda con 3.0 y la primera con 2.5; lo que permite concluir que la tercera yema axilar manifestó una mayor aptitud a formar brotes y nudos.

Por otra parte la longitud de tallos alcanzada corrobora las aseveraciones anteriores, mostrando los brotes de la tercera yema axilar el mayor tamaño (Figura 4.13), seguidos por los de la segunda y primera respectivamente.

Cuadro 4.10. Efecto de la posición del explante nodal en la planta, con respecto al ápice, sobre la brotación y el número de nudos a los 60 días de cultivo *in vitro*.

Posición de la yema	Brotación (%)	Número de nudos
1°	86	2.5 B <sup>+</sup>
2°	86	3.0 B
3°	92	5.3 A

<sup>+</sup>Prueba de comparación de medias de Tukey al 5 % de significancia estadística.

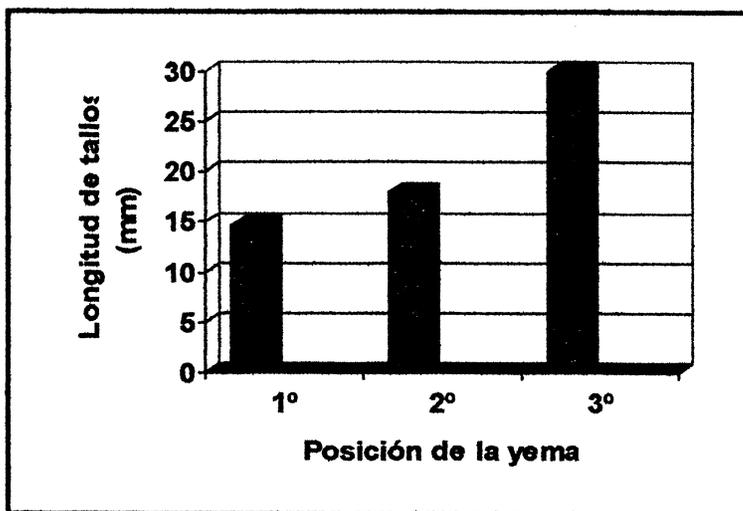


Figura 4.13. Efecto de la posición del explante nodal en la planta, con respecto al ápice sobre la longitud de tallos a los 60 días de cultivo *in vitro*.

Lo anterior permite concluir que para futuros experimentos en donde se pretenda evaluar específicamente el potencial de las yemas a formar entrenudos y elongación será conveniente trabajar con yemas ubicadas en la misma posición de la vareta.

### **Iniciación del enraizamiento**

#### **Efecto del ácido indolbutírico (AIB), con y sin carbón activado (CA)**

En esta prueba se observó formación de raíces solamente en dos plantas, una del tratamiento con  $0.8 \text{ mg l}^{-1}$  y otra con  $1.6 \text{ mg l}^{-1}$  de AIB, (Cuadro 4.11), ambas con estructuras muy robustas como se puede apreciar en la Figura 4.14.

McGranahan y Leslie (1988) reportaron un rango de enraizamiento de entre 5 y 75 por ciento, después de 4 a 12 semanas de cultivo; lo que refleja un amplio rango de enraizamiento, en un período muy variable de tiempo, por lo que se puede considerar que este es un evento difícil de generar.

Cuadro 4.11. Efecto del AIB con y sin carbón activado, sobre el enraizamiento de brotes de nogal inducidos *in vitro* a los 60 días de cultivo.

AIB (mg l <sup>-1</sup> )	Raíces formadas
0.0 + CA	0
0.2 + CA	0
0.4 + CA	0
0.8 + CA	0
1.6 + CA	0
0.0 - CA	0
0.2 - CA	0
0.4 - CA	0
0.8 - CA	2 Robustas
1.6 - CA	9 Robustas

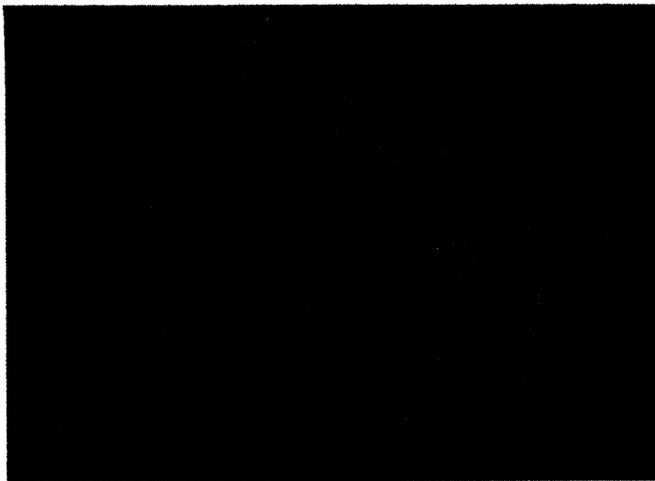


Figura 4.14. Raíces formadas en plántulas derivadas de nogal juvenil, observadas en los tratamientos con ácido indolbutírico a dos concentraciones 0.8 y 1.6 mg l<sup>-1</sup> a los 60 días de cultivo.

### Prueba con tres medios de cultivo

En esta segunda prueba considerando tres medios de cultivo (MS, WPM y DKW), con dos dosificaciones de AIB ( $0.8$  y  $1.6 \text{ mg l}^{-1}$ ), no se logró la formación de raíces a los 60 días de cultivo, obteniendo solamente ligera formación de callo en la base del explante de algunos tratamientos y en algunas unidades experimentales, sin que esta tendencia fuera regular, como se puede apreciar en la Figura 4.15.



WPM + AIB  $1.6 \text{ mg l}^{-1}$

WPM + AIB  $0.8 \text{ mg l}^{-1}$

Figura 4.15. Callo formado en plantas de nogal juvenil obtenido *in vitro* con dos dosificaciones de AIB.

Estos resultados manifestaron una tendencia diferente a los reportados por Hansen y Lazarte (1984) donde probando dos niveles de AIB ( $1$  y  $3 \text{ mg l}^{-1}$ ), obtuvieron resultados satisfactorios, formando un 90 por ciento de raíz en la dosis de  $1 \text{ mg l}^{-1}$  y un 86 por ciento en la dosis de  $3 \text{ mg l}^{-1}$ , a los 33 días de cultivo.

Por otra parte Ripetti *et al.* (1994) reportaron un 100 por ciento de enraizamiento utilizando dos medios de cultivo en forma secuencial; uno el MS, suplementado con  $3 \text{ mg l}^{-1}$  de AIB y agar como solidificante, incubado durante 7 días en oscuridad; seguido por otro con nutrientes del DKW, y como solidificante una mezcla de vermiculita y gelrite, sin hormonas e incubado en presencia de luz.

#### **Prueba con dosis elevadas de ácido indolbutírico (AIB)**

En este experimento donde fueron manejadas dosificaciones elevadas de AIB (0 a  $100 \text{ mg l}^{-1}$ ), se encontró que éstas incidieron en una abundante formación de callo en los tratamientos seis y siete (Figura 4.16), observándose que en el resto de los tratamientos no se obtuvo formación de estas estructuras.



Figura 4.16. Callo formado en planta de nogal cultivada *in vitro* agregando una dosis de  $100 \text{ mg l}^{-1}$  de AIB al medio de cultivo.

Por su parte Driver y Kuniyuki (1984) encontraron resultados similares, mencionando que a dosificaciones superiores a  $30 \mu\text{M}$  ( $6.1 \text{ mg l}^{-1}$ ), solamente observaron formación de callo. Por otra parte McGranahan y Leslie (1988), mencionaron que los explantes sin hojas a los dos meses de cultivo tendieron a formar callo. En función de lo anterior puede considerarse que la formación de callo en tejidos del nogal para otros fines de mejoramiento genético es factible mediante varios procedimientos, tanto de manejo de reguladores como de manejo de la planta.

## CONCLUSIONES

- En el proceso de desinfestación se debe reducir en lo posible la exposición del tejido a los desinfestantes.
- Es factible lograr desarrollo de brotes *in vitro* a partir de planta de tres meses proveniente de nuez criolla.
- La tercera yema axilar es más eficiente en la brotación, desarrollo de nudos y elongación de brote a partir de explantes de plantas de tres meses cultivadas *in vitro*.
- El medio de cultivo (sales inorgánicas), que mejores resultados da para el cultivo de nogal juvenil *in vitro* es el WPM.
- El ácido benzoico combinado con carbón activado es una fórmula que estimula la elongación de brote en nogal adulto podado.
- El ácido benzoico combinado con carbón activado fue la mejor forma de controlar la oxidación y favorecer la formación de entrenudos y elongación de tallos a partir de explantes de tejido juvenil, provenientes de plantas de tres meses, germinadas de nuez criolla.
- El extracto de raíz de plántula de nogal, no resultó favorable para el desarrollo de brote de nogal juvenil.
- El ácido benzoico y ácido ascórbico estimulan la brotación de tejido juvenil de forma muy similar.
- No fue significativo utilizar TDZ ni AG<sub>3</sub>, en las dosis utilizadas en la micropropagación de nogal juvenil, proveniente de semilla criolla.
- El uso de tapas perforadas para estimular intercambio gaseoso de explantes de nogal juvenil no beneficia significativamente su desarrollo, aunque no se determinó si realmente existe un mayor intercambio gaseoso en explantes con tapas perforadas.

- En explantes provenientes de nogal juvenil; ni los cambios frecuentes a medio nuevo ni la aplicación de cantidades adicionales de Ca y P, mostraron efectos benéficos en la corrección de deficiencias nutrimentales en brote.
- El enraizamiento de nogal *in vitro* es un proceso que requiere mayor estudio con otros tipos y dosis de auxinas solas y en combinación con algunas citocininas.

## RESUMEN

El nogal, es una especie que en los últimos años ha adquirido gran importancia, debido a la creciente utilización de la nuez en la industria alimentaria y en la industria mueblera, sin embargo su propagación asexual es difícil aunque esta permitiría establecer huertos más homogéneos.

Al respecto fueron establecidos una serie de experimentos para estudiar factores que influyen en su micropropagación manejando tipos de explante, controladores de oxidación, inductores de brotación y enraizamiento, además de corrección de deficiencias aparentes de P y Ca.

Los explantes se desinfestaron con Fungicida Benonil e Hipoclorito de sodio. El mejor tipo de explante fue yema axilar, tanto para nogal adulto como juvenil, aunque en el primero no se logró desarrollo de nudos, en los brotes inducidos.

Fueron probadas las sales inorgánicas de tres medios de cultivo (MS, WPM y DKW) en nogal juvenil; obteniendo para WPM 96 % en brotación, 7 entrenudos y 17.89 mm de longitud de tallos, seguido por el DKW con 94 %, 4 entrenudos y 13.5 mm de longitud. De los compuestos agregados al medio el mejor fue el ácido benzoico. Por otra parte tanto el extracto de raíz de plántula como la doble dosis de BA resultaron muy similares en brotación y desarrollo de entrenudos.

En el trabajo donde fueron probadas dosis extras de Ca y P, para corregir aparentes deficiencias, se encontró que en ningún caso estas fueron corregidas de forma contundente.

Al utilizar TDZ y AG<sub>3</sub>, se encontró que la proporción de brotes emitidos por explante en ambos casos fue superior en el testigo con un 90 %. En el trabajo donde se utilizaron tapas perforadas para favorecer el intercambio gaseoso entre el frasco y su ambiente no se manifestó diferencia respecto al testigo.

La ubicación de la yema en la bareta no afectó su potencial de brotación, pero si el número de nudos produciendo 5.3 en la tercera yema, 3 y 2.5 en la segunda y primera respectivamente. La prueba agregando compuestos para estudiar el grado de oxidación del explante, indicó que el carbón activado y el ácido ascórbico redujeron drásticamente la oxidación del tejido.

En el enraizamiento, se observaron solamente dos plantas con raíces una con 1.6 y otra con 0.8 mg l<sup>-1</sup> de AIB, sin embargo esto no se volvió a repetir.

## LITERATURA CITADA

- Aguilar, P.H., T. Herrera y J.G. Garza. 2002. Enfermedades del nogal pecadero en el norte de Coahuila. INIFAP, CAEZ. México. 12:1-18.
- Arreola, A. J. G. y A. Lagarda. 1994. El nogal pecanero. Métodos de propagación, INIFAP, CAELALA. México. pp. 23-26.
- Bidwell, R. G. S. 1979. Fisiología vegetal. AGT Editor, México. pp. 78-86, 461-463.
- Bowler, Ch., M. Van Montagu and D. Inzé. 1992. Superoxide dismutase and stress tolerance. Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 43:83-116.
- Bourrain, L. and J.C. Navatel. 1994. Micropropagation of the walnut tree *Juglans regia* L. Part 1. In vitro production. Infos-Paris. 98. 40-46.
- Brown, C.L. and H.E. Sommer. 1982. Vegetative propagation of dicotyledonous trees. Ed. J.M. Bonga and D.J. Durzan. Netherlands. pp. 109-127.
- Corte-Olivares, J., G.C. Phillips and S.A. Butler-Nance. 1990. Micropropagation of pecan. HortScience. 25: 1308.
- Chenevard, D., F. Jean-Sylvain and Ch. Jay-Allemand. 1998. Carbohydrate reserves and CO<sub>2</sub> balance of hybrid walnut (*Juglans nigra* no. 23x*Juglans regia*) plantlets during acclimatisation. Scientia Horticulturae. 68:207-217.
- Driver, J.A. and A.H. Kuniyuky. 1984. *In vitro* propagation of paradox walnut rootstock. HortScience. 19: 507-509.
- Dunstan, D.I. and K.C. Short. 1977. Improved growth of tissue cultures of the onion, *Allium cepa*. Physiol. Plant. 41:70-72.
- Felaliyev, A.S. 1990. *In vitro* morphogenesis in *Juglans regia* L. Ukrainskii-Botanichnii-Zhurnal. 47: 3, 85-87.
- Finkle, B.J. and V.C. Runeckles. 1967. Phenolic compounds and metabolic regulation. Appleton-Century\_Crofts. New York. Meredith Publishing Company. USA. pp. 69-87.

- Foyer, C. 1993. Ascorbic acid. In: R.G. Alscher and J.L. Hess (Eds.). Antioxidants in higher plants. CRS Press. Inc. Boca. Raton, Fla. pp. 31-58.
- Furuya, M. 1984. Cell division patterns in multicellular plants. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 35:349-373.
- George, F.E. 1996. Plant propagation by tissue culture part 2. In practice. 2ª. Ed. Exegetics Limited. USA.
- Gruselle, R., C. Nicaise and P. Boxus. 1995. Regulation of *in vitro* shoot multiplication in Persian walnut by different carbon sources and ammonium phosphate. *Bulletin-des-Recherches-Agronomiques-de-Gembloux.* 30: 1-2, 47-53.
- Hansen, K.C. and J.E. Lazarte. 1984. *In vitro* propagation of pecan seedlings. *HortScience.* 19: 237-239.
- Hartman, T.H. y D.E. Kester. 1987. Propagación de Plantas. 2º Ed. Editorial. C.E.C.S.A. México.
- Herrera, P.T. 1994. El nogal pecanero. Enfermedades, INIFAP, CAELALA. México. pp. 131-155.
- Hoza, D., A. Standardi, F. Stanica and T.A.Tudor. 1993. Preliminary data on *in vitro* culture of walnut (*Juglans regia*). *Lucrari-Stiintifice,-Institutul\_Agronomic-'Nicolae-Balcescu',-Bucuresti,-Seria-B,-Horticulturra.* 35:1, 51-55.
- Hurtado, M.D. y M.E. Merino. 1987. Cultivo de tejidos vegetales. Ed. Trillas. México.
- Juárez, A. 2002. Resumen económico de la Comarca Lagunera, sector agropecuario. *El Siglo de Torreón.* México. p. 32.
- Lloyd, G. and B. McCown. 1981. Commercially feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture. *Combined Proc. Int. Plant Propagation Soc.* 30: 421-427.
- McGranahan and Ch. A. Leslie. 1988. *In vitro* propagation of mature persian walnut cultivars. *HortScience.* 23: 220.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-497.

- Nawrath, Ch. and J.P. Métraux. 1999. Salicylic acid induction-deficient mutants of arabidopsis express PR-2 and PR-5 and accumulate high levels of camalexin after pathogen inoculation. *Plant Cell*. 11: 1393-1404.
- Niu, G., T. Kozai and Ch. Kubota. 1998. A system for measuring the in situ CO<sub>2</sub> Exchange rates of in vitro plantlets. *HortScience*. 33: 1076-1078.
- Obeidy, A. and M.A.L. Smith. 1993. Organogenesis from mature pecan cotyledons and embrionic axes. *HortScience*. 28: 213-215.
- Olivares, S.E. 1994. Paquete de diseños experimentales FAUANL. Versión 2.5. Facultad de Agronomía UANL. Marín, N.L. México.
- Pijut, P.M. 1997. Micropropagation of *Juglans cinerea* L. (Butternut). *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, 39: pp. 347-351.
- Ponchia, G. and G. Tonon. 1993. Preliminary results of research on micropropagation of walnut. *Revista-di-Frutticoltura-e-di-Ortofloricoltura*. 55:1, 91-94; 3 col. Pl.
- Raskin, I. 1992. Role of salicylic acid in plants. *Annu. Rev. Plant physiol. Plant Mol. Biol.* 43: 439-463.
- Ripetti-V, C. Kevers and T. Gaspar. 1994. Two successive media for the rooting of walnut shoots *in vitro*. Changes in peroxidase activity and in ethylene production. *Advances in Horticultural Science*. 8: 1, 29-32.
- Robert, L. M. y V. M. Loyola. 1985. El cultivo de tejidos vegetales en México. CONACYT, México. pp. 21-26.
- Salisbury, B.F. y C.W. Ross. 1994. *Fisiología Vegetal*. 4° Ed. Editorial. Grupo Editorial Iberoamérica. S.A. de C.V. México.
- Sambeek, J.W.-van, J.L. Lambus, S.B. Khan, J.E. Preece, J.W. VanSambeek. 1997. *In vitro* establishment of tissue from adult black walnut. *Proceedings of the Fifth Black Walnut Symposium, Stockton, Missouri, USA* pp. 28-31.
- Schwans, P. and A. Polle. 2001. Differential stress responses of antioxidative systems to drought in pedunculate oak (*Quercus robur*), and maritime pine (*Pinus pinaster*) grown under high CO<sub>2</sub> concentrations. *Journal of Experimental Botany*. 52: 133-143.
- Singha, S.E., E.C. Townsend and G.H. Oberly. 1990. Relationship between calcium and agar on vitrification and shoot-tip necrosis of quince (*Cydonia oblonga* Mill.) Shoots *in vitro*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 23: 135-142.

- Tarrazo, A.R.; I.J. Sebastián and M.A. Revilla. 1993. Influence of the phenological state of field grown walnut buds on their *in vitro* establishment. Acta-Horticulturae. No. 311, 153-159; International walnut meeting, Tarragona, Spain, 21-25 oct., 1991.
- Torres, K.C. 1989. Tissue culture techniques for horticultural crops. Avi Book Publisher by Van Nostrand Reinhold. New York. pp. 74-75.
- Tran Thanh Van, K. 1981. Control of morphogenesis in vitro cultures. Ann. Rev. Plant Physiol. 32:291-311.
- Villalobos-Arambula, V.M. 1985. Fundamentos teórico-prácticos de cultivo de tejidos vegetales. Colegio de Postgraduados, Montecillos, Edo. de México.
- Wood, B.W. 1982. *In vitro* proliferation of pecan shoots. HortScience. 17: 890-891.
- Yates, I.E. and C.C. Reilly. 1990. Somatic embryogenesis and plant development in eight cultivars of pecan. HortScience. 25:573-576.
- Zieslin, N. And M. Abolitz. 1994. Leakage of phenolic compounds from plant roots: effects of pH, Ca<sup>+2</sup> and NaCl. Scientia Horticulturae. 58:303-314.