

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA
FACULTAD DE AGRONOMIA
PROGRAMA RECURSOS GENETICOS NICARAGUENSES**



TRABAJO DE DIPLOMA

**ESTABLECIMIENTO Y MICROPROPAGACION DE
GERMOPLASMA DE SAPOTE (*Pouteria sapota* Jacq. Merr)
COLECTADO EN NICARAGUA**

Autoras:

***Br. Demesia del Carmen Saézn Chamorro
Br. América del Carmen Sandoval Silva***

Asesores:

***Ing. Agr. MSc. Guillermo Reyes Castro
Ing. Agr. Marbell Aguilar Maradiaga***

**MANAGUA, NICARAGUA
AGOSTO, 1998**

DEDICATORIA

Dedico la culminación de esta etapa de mis estudios muy especialmente a :

Dios creador de todas las formas de vidas existentes.

Mi madre, **María de los Angeles Chamorro Ruiz**, por todo el cariño y apoyo que me ha dado durante toda mi vida.

A mi hermana, **Francisca Inés Chamorro Saénz**, con especial cariño, por todo el apoyo y confianza que me dió durante el período de mis estudios.

A mis hermanos: **Nora Isabel, Ligia del Socorro, Atanael, Jaime, Saénz Chamorro**, fijos en mi memoria por el imperecedero recuerdo de sus virtudes.

Demesia del Carmen Saénz Chamorro

DEDICATORIA

El presente trabajo está dedicado a:

Diospor haberme dado la vida e iluminado para culminar mis estudios.

Mis padres: Rosario Silva de Sandoval (qepd), y Sinforoso Sandoval Cuadra.

Mi hermana Adelina del Carmen Sandoval Silva.

Mi esposo Francisco José Jimenez Guerrero.

Mi hija América Jimenez Sandoval

Todas las personas que estuvieron involucradas para la realización del presente trabajo

América del Carmen Sandoval Silva

AGRADECIMIENTO

Manifestamos nuestros sinceros agradecimientos a todas las personas que de una u otra forma estuvieron involucradas, para la culminación de este trabajo y de forma especial a nuestros asesores por que estuvieron siempre dispuestos a brindarnos su excelente asesoría en el trabajo.

Ing. Agr. MSc. Guillermo Reyes Castro y el **Ing. Agr. Marbell Aguilar Maradiaga**, a la señora **Esmelda Bobadilla Bravo**, por habernos apoyado en la preparación de los medios de cultivos, al **Ing. Agr. Alvaro Benavides Gonzáles** por su ayuda en el análisis estadístico de los datos.

Al programa de **Recursos Genéticos Nicaragüenses**, que facilitó la realización de este estudio y por el apoyo brindado

A todos los docentes de la **Universidad Nacional Agraria**, por transmitir sus conocimientos y por su participación en nuestra formación como **Ingenieros Agrónomos**.

INDICE GENERAL

Contenido	Página
INDICE GENERAL	i
INDICE DE TABLAS	ii
INDICE DE FIGURAS	iii
RESUMEN	iv
I-INTRODUCCION	1
II- MATERIALES Y METODOS	5
1. Materiales, reactivos y equipos utilizados	5
2. Estudios de establecimiento <i>in vitro</i> de los embriones cigóticos	6
2.1 Material vegetal	6
2.2 Preparación de los explantes	6
2.3 Preparación de los medios de cultivo	6
2.4 Medios de cultivo	8
2.5 Siembra del material vegetal	9
2.6 Establecimiento de los embriones cigóticos	9
2.7.. Variables evaluadas	9
2.7.1 Porcentaje de contaminación	9
2.7.2 Estadíos de desarrollo	9
2.7.3 Longitud de raíces (cm)	10
2.7.4 Altura de la planta (cm)	10
2.8 Diseño experimental utilizado	10
3. Estudios de la micropropagación a partir de microestacas	10
3.1. Procedencia del material vegetal	10
3.2 Siembra de las microestacas	10

Contenido	Página
3.3 Medios de cultivo	10
3.4 Variables evaluadas	11
3.4.1 Porcentaje de contaminación	11
3.4.2 Porcentaje de sobrevivencia	11
3.4.3 Altura de la planta	11
III.- RESULTADOS Y DISCUSION	12
A Ensayo de establecimiento	12
B Ensayo de micropropagación	20
IV.- CONCLUSIONES	24
A Fase de establecimiento	24
B Fase de micropropagación	24
V.- RECOMENDACIONES	26
VI.- REFERENCIAS	27
VII.- ANEXOS	28

INDICE DE TABLAS

Contenido	Página
<p>Tabla 1. Constituyentes del medio de cultivo básico Murashige & Skoog (1962)</p>	7
<p>Tabla 2. Variantes de medio de cultivo MS (1962) empleados en los ensayos de establecimiento a condiciones <i>in vitro</i> de embriones cigóticos de sapote (<i>Platanus zapota</i> Jacq. Merr)</p>	8
<p>Tabla 3. Variantes del medio de cultivo MS (1962) empleadas en el estudio de micropropagación <i>in vitro</i> (<i>Platanus zapota</i> Jacq. Merr) a partir de microestacas</p>	11
<p>Tabla 4. Porcentaje de contaminación (hongos y bacterias) en 13 variantes del medio de cultivo MS (1962) utilizados en el establecimiento de embriones cigóticos de sapote (<i>Platanus zapota</i> Jacq. Merr) obtenidos de frutas maduras e inmaduras</p>	29
<p>Tabla 5. Promedios de altura de plantas y longitud de raíces (cm), de embriones cigóticos de sapotes (<i>Platanus zapota</i> Jacq. Merr) de frutos inmaduros (FI) y frutos maduros (FM) en 13 medios de cultivos <i>in vitro</i>.</p>	30
<p>Tabla 6. Estadios de desarrollo de plantas de sapote (<i>Platanus zapota</i> Jacq. Merr) obtenidos de embriones cigóticos de frutas maduras e inmaduras establecidos en 13 medios de cultivo <i>in vitro</i>.</p>	31
<p>Tabla 7. Porcentaje de contaminación y sobrevivencia, altura promedio de planta (cm), número total de hojas de los explantes de sapote (<i>Platanus zapota</i> Jacq. Merr) en 4 variantes del medio MS (1962) para la micropropagación a partir de microestacas</p>	32

INDICE DE FIGURAS

Contenido

Página

- Fig. 1. Contaminación fungosa y bacteriana (%) registradas en el establecimiento *in vitro* en 13 medios de cultivos de embriones cigóticos de sapotes (*Platonia sapota* Jacq Merr) en frutos maduros e inmaduros establecidos. 13
- Fig. 2. Altura de plantas y longitud promedio de raíces registradas en embriones cigóticos de sapote (*Platonia sapota* Jacq Merr) obtenidos de frutos maduros e inmaduros en trece medios de cultivos. 15
- Fig. 3. Estadíos de desarrollo (%) de plantas de sapote (*Platonia sapota* Jacq Merr) provenientes de embriones cigóticos de frutos maduros e inmaduros en 13 medios de cultivo *in vitro*. 19
- Fig. 4. Porcentaje de contaminación (fungosa y bacteriana) de embriones cigótico de sapote (*Platonia sapota* Jacq Merr) obtenidos de frutos maduros e inmaduros y desarrollados en 4 medios de cultivo, a las 12 y 20 semanas. 21
- Fig. 5. Altura inicial, altura final (cm) y número de hojas por plantas de sapote (*Platonia sapota* Jacq. Merr) obtenidos de embriones cigóticos de frutas maduras e inmaduras, que los embriones cigóticos de frutas madura. 23

RESUMEN

Con la finalidad de determinar la metodología más adecuada, para el establecimiento y micropropagación *in vitro* de embriones cigóticos de sapote. (*Pouteria sapota* Jacq. Mer), procedentes de dos estados fenológicos del fruto, (inmaduros y maduros), se estudió el efecto de trece variantes del medio de cultivo básico Murashige & Skoog (MS) (1962), sobre el desarrollo de las plantas. En la fase de establecimiento se utilizaron veinte repeticiones por tratamientos, los cuales difieren en cuanto a las concentraciones y combinaciones de reguladores de crecimiento (ANA, IBA, GA₃ y CA). En el estudio de micropropagación se determinó el efecto que tendrían cuatro variantes del medio básico MS, suplementado con diferentes concentraciones de reguladores de crecimiento sobre la micropropagación de sapote a partir de microestacas obtenidas de las plantas establecidas en la fase anterior. En el establecimiento de los embriones cigóticos los provenientes de frutas inmaduras presentan menor porcentaje de contaminación causados por hongos que los embriones cigóticos de frutas maduras. La contaminación bacteriana fue similar en ambos estadios de madurez, las plántulas provenientes de embriones cigóticos obtenidas de frutas inmaduras lograron estadios de desarrollo II y III (emergencia del hipocotilo y separación de las hojas cotiledonales y plántulas con hojas primarias y radícula desarrollada) mas rápidamente y en mayor cantidad que las plantas provenientes de embriones cigóticos de frutas maduras. Los embriones cigóticos provenientes de frutas maduras presentaron una dinámica de crecimiento variada pues registran plantas en los 3 estadios de desarrollo al mismo tiempo. La altura de planta fue mayor en las plantas provenientes de frutas inmaduras, al contrario las mayores longitudes de raíces se reportaron en las plantas provenientes de frutos maduros. En la fase de micropropagación no fue posible inducir el enraizamiento de las microestacas, por lo que en el periodo de 5 meses el porcentaje de sobrevivencia se redujo drásticamente. Se reportó relativamente altos porcentajes de contaminación causada por hongos y bacterias debido a microorganismos sistémicos que pueden permanecer en los explantes y que no se manifiestan en el momento del establecimiento, sino que se expresan una vez inoculados en el nuevo medio fresco. Las microestacas presentaron crecimiento de hojas, sobrevivieron por 8 semanas. A los 5 meses presentaron igual cantidad de hojas con una sobrevivencia mínima. Similares resultados se obtuvo en altura de microestacas, no se logró el crecimiento de esta variable.

INTRODUCCION.

El Sapote (*Pouteria sapota* Jacq. Merr), pertenece a la familia Sapotácea del orden Ebenales, es un árbol netamente tropical, su fruto presenta un alto valor nutritivo, ignorado por la mayoría de los consumidores (Morera, 1992)

El sapote es originario de las partes bajas de América Central, es un árbol de polinización libre, multiplicado generalmente por semilla, con grandes posibilidades económicas, crecen de preferencia de forma silvestre desde el nivel del mar hasta más o menos 1000 m de altura con temperaturas que oscilan entre los 22 y 32 °C (Morera, 1992).

En América Central, América del Norte y las Antillas el interés por este cultivo es reciente; solo existen algunas pequeñas plantaciones comerciales y árboles en predios que pueden permitir su promoción tanto a nivel local como para la exportación. Además, América Central posee características climáticas, topográficas, edáficas y sociales que podrían permitir un desarrollo y aprovechamiento más integral de este recurso genético.

El cultivo de esta especie tiene un mercado externo aún no satisfecho y puede jugar un papel importante como fuente de ingresos, a la vez, de que puede contribuir a una adecuada composición de la dieta.

En Costa Rica y Nicaragua producen alta calidad de fruto, pero no existen patrones específicos de control de calidad para la exportación del sapote; a excepción del contenido de fibras, sabor dulce y pulpa de color rojo (Morera, 1992).

La variabilidad genética del género *Avutera* se encuentra en las áreas forestales tropicales donde aún falta exploración. Estas regiones son poco accesibles lo que dificulta la recolección de genotipos que pueden estar en proceso de erosión genética debido al abandono. Por otro lado, el desarrollo urbanístico acelera la pérdida de diversidad genética de esta especie. Por lo general muchos de los países con gran diversidad genética son países en desarrollo por lo que no pueden permitir sufragar por sí solo la protección *in situ* de recursos genéticos.

La intensificación de la agricultura ha provocado la reducción de la variabilidad genética de esta especie tropical al sustituirse los cultivares silvestres de sapote por otras especies exóticas de mayor aprovechamiento.

El establecimiento del cultivo del sapote puede ser un proceso lento ya que requiere investigación, tiempo e inversión. Se debe tener en cuenta que la investigación, la producción comercial y comercialización son los factores claves para establecer con éxito los cultivos no tradicionales.

Las formas más comunes de propagación de las Sapotáceas son: a) propagación sexual (por semilla) y b) propagación asexual (injertación)

En la propagación por semilla existe el problema de la gran heterogeneidad y variación genética. Los árboles propagados por este método por lo general tardan en producir de 7 a 8 años. El sapote propagado por semilla puede resultar diferente a los padres en cuanto a peso, forma y calidad de frutas. Para utilizar este método de propagación deben seleccionarse las semillas de mayor tamaño procedentes de árboles que muestran características deseables para su multiplicación como son: Color y calidad de pulpa, capacidad de producción, estructura de la planta, grado de resistencia a plagas y enfermedades (Morera, 1992).

Actualmente el método de propagación vegetativa más utilizado del sapote es el injerto. Este sistema mejora la característica de productividad y producen a la mitad del tiempo que cuando se propaga por semilla. Los métodos de injerto preferidos son los de enchape lateral y hendiduras, para este propósito solo deben usarse varetas vigorosas de aproximadamente el mismo diámetro del patrón.

La reciente utilización del cultivo de tejidos, como una de las técnicas más modernas en la agricultura, permite obtener elevados volúmenes de material vegetal de buena calidad para la siembra en numerosos cultivos imputando directamente en el incremento de la calidad y rendimiento de las cosechas (Morera, 1992).

El cultivo de tejidos vegetales es una solución viable para resolver algunos problemas de incidencia de plagas y enfermedades. En los últimos años el desarrollo de la técnica de micropropagación ha tenido éxito y permite obtener grandes volúmenes de plantas libres de enfermedades las cuales poseen mayor vigor y homogeneidad genética (Hurtado & Merino, 1987).

La micropropagación *in vitro* se basa en la multiplicación de material vegetal a partir de tejidos u órganos de la planta. Esta ventaja se fundamenta en el principio de la totipotencia que posee cada célula (facultad que tienen las células vegetales individuales de reproducir a un individuo similar a la planta madre siempre que se encuentren en condiciones adecuadas de luz, humedad, nutrientes, temperatura etc.), su objetivo fundamental es la obtención de un gran número de plantas clonales en un período corto. Las ventajas mencionadas han sido empleadas en cultivos perennes, forestales y frutales con buenos resultados, por lo que su aplicación en las sapotáceas afectaría positivamente la proyección del cultivo.

En Nicaragua, el laboratorio de cultivo de tejidos del Programa de Recursos Genéticos Nicaragüenses (REGEN) procedió a realizar una serie de experimentos con especies sapotáceas (sapote y nispero) con cuyos resultados se contribuirá al establecimiento y desarrollo general del cultivo en nuestro país.

Con la ejecución del presente estudio se pretende cumplir con los siguientes objetivos:

- 1 - Determinar la metodología adecuada para lograr el más rápido establecimiento de los embriones cigóticos de sapote (*Platanus sapota* Jacq. Merr) obtenidos a partir de frutos maduros e inmaduros.
- 2 - Determinar la metodología adecuada para la micropropagación *in vitro* de sapote (*Platanus sapota* Jacq Merr) a partir de embriones cigóticos extraídos de frutos maduros e inmaduros.

II- MATERIALES Y METODOS

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos del Programa Recursos Genéticos Nicaragüenses (REGEN), de la Universidad Nacional Agraria (UNA), ubicada en el Km. 12 1/2 carretera norte, Managua, Nicaragua. La investigación se efectuó en el período comprendido entre noviembre de 1995 a septiembre de 1996.

1.- Materiales, reactivos y equipos utilizados

Pinzas

Bisturries

Placas petri

Tubos de ensayo

Agitadores y calentadores electromagnéticos

Balanza analítica

Mechero bunsen

Horno para la esterilización de los instrumentos de trabajo

Autoclave

Alcohol al 90%

Destilador de agua

Beakers

Pipetas

Cámara de flujo laminar

Papel de aluminio

Papel filtro

pHmetro

Quebra-nueces

Gradillas

Desionizador de agua

Cinta adhesiva (maskingtape)

2.- Estudio de establecimiento *in vitro* de los embriones cigóticos.

2.1.- Material vegetal. Para la ejecución del presente estudio se utilizaron frutos maduros e inmaduros de sapote. El material vegetal fue adquirido en el Mercado Mayoreo en Managua, en fincas y patios de las ciudades de Managua, Rivas, y Diriomo .

2.2.- Preparación de los explantes. Después de colectado el material se procedió a su desinfección. Para tal efecto los frutos de sapote fueron lavados con jabón líquido y luego removidas las capas de lenticelas con un papel para lijar madera. A continuación se enjuagaron con agua del grifo

2.3.- Preparación del medio de cultivo. Los tubos de ensayo se esterilizaron en el autoclave a temperatura de 120 °C durante 30 minutos. Las placas petri, pinzas y escalpelo se esterilizaron en hornos a 170 °C durante una hora. Antes de transferir el material vegetal al medio de cultivo se esterilizó la cámara de flujo con rayos ultravioleta durante 30 minutos y se desinfectó con alcohol al 90 %. Los medios de cultivo se esterilizaron a temperatura de 121 °C durante 30 minutos.

Las variantes de medios de cultivo se prepararon en frascos aforados diluyendo todos los constituyentes en agua destilada y desionizada, luego las soluciones se homogeneizaron con el agitador magnético. Los medios de cultivo empleados en el presente estudio se prepararon utilizando el medio básico Murashige & Skoog (1962) (Tabla 1).

Tabla 1. Constituyentes del medio de cultivo básico Murashige & Skoog(1962)

Solución	Constituyentes	Concentración final(mg/l)	Vol/solución madre/litro
1	NH ₄ NO ₃	1650.000 mg	20.0 ml
2	KNO ₃	1900.000 mg	20.0 ml
3	MgSO ₄ 7H ₂ O	370.000 mg	20.0 ml
4	KH ₂ PO ₄	170.000 mg	20.0 ml
5	H ₃ BO	6200 mg	1.0 ml
6	MnSO ₄ H ₂ O	22.300 mg	1.0 ml
7	ZnSO ₄ 7 H ₂ O	8.600 mg	1.0 ml
8	Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ O	0.250 mg	1.0 ml
9	CuSO ₄ 5H ₂ O	0.025 mg	1.0 ml
10	CoCl ₂ 6H ₂ O	0.025 mg	1.0 ml
11	KL	0.830 mg	1.0 ml
12	CaCl ₂ 2H ₂ O	440.000 mg	2.9 ml
13	Na ₂ EDTA	37.300 mg	5.0 ml

El pH se ajustó a 6.1 como producto gelificante se utilizó, Agar Difco -Agar, el cual se adicionó después de aforar el medio de cultivo. El Agar se disolvió mediante calentamiento. Se procedió a distribuir 10 ml de las variantes del medio de cultivo estudiado (medio básico, semi sólido; Murashige & Skoog, 1962), suplementado con sacarosa, agar y reguladores de crecimiento, en tubos de ensayo de 14 x 2.5 cm.

2.4- Medio de cultivo. Se utilizó el medio básico MS (1962) como esencial y se suplió con reguladores de crecimiento y carbón activado (Tabla 2).

Tabla 2.- Variantes de medio de cultivo MS (1962) empleados en los ensayos de establecimiento a condiciones *in vitro* de embriones cigóticos de sapote (*Pouteriasapota* Jacq. Merr), en frutos inmaduros y maduros

Medios	Reguladores de crecimiento
1	0.5 ANA*
2	1.0 ANA
3	2.0 ANA
4	0.5 IBA**
5	1.0 IBA
6	2.0 IBA
7	0.5 IBA + 1.0 ANA
8	0.5 ANA + 1.0 IBA
9	50 mg/l CA***
10	0.5 mg/l CA + 1.0 IBA
11	50 mg/l CA + 0.5 ANA
12	50 mg/l CA + 1.0 GA ₃
13	1 ml GA ₃ ****

* ANA: Acido Naftalenacético

** IBA: Acido Indolbutírico

*** CA: Carbón Activado

**** GA: Acido Giberélico.

2.5.- Siembra del material vegetal. Los sapotes fueron llevados a la cámara de flujo laminar, donde el fruto fue flameado con alcohol al 90 por ciento, para luego extraer la semilla. Igualmente se procedió con la semilla, la testa de la semilla, fue quebrada con un quebrador de nueces.

En placas petri, previamente esterilizadas se colocó la semilla sin cubierta y con la ayuda de pinzas y escalpelos esterilizados se cortó el embrión, el cual fue inoculado en los tubos de ensayos. Los embriones permanecieron por espacio de ocho semanas en estas condiciones hasta la obtención del material necesario para los diferentes experimentos.

2.6.- Establecimiento de los embriones cigóticos. Se procedió a establecer un experimento en el que se evaluó dos estados de madurez de la semilla (semilla proveniente de frutos maduros e inmaduros) en 13 variantes del medio de cultivo. El objetivo fue determinar la influencia del estado de madurez de la semilla y los reguladores de crecimiento en el medio de cultivo, sobre la velocidad de establecimiento *in vitro* de los explantes.

2.7.- Variables evaluadas. Cumplidos dos meses de haberse realizado la inoculación en el medio de establecimiento se realizaron las siguientes evaluaciones:

2.7.1.- Porcentajes de contaminación.

- a) Hongos
- b) Bacterias.

2.7.2.- Estadíos de desarrollo.

- a) Embriones sin desarrollar.
- b) Embriones con el hipocotilo emergido y con las hojas cotiledonales separadas.
- c) Plántulas con hojas primarias y radículas desarrolladas.

2.7.3.- Longitud de raíces (cm). Esta se midió utilizando reglas milimétricas desde la base de los embriones conteniendo pequeños trozos de cotiledones hasta el ápice por ciento de la raíz.

2.7.4.- Altura de la planta (cm) Se calculó considerando la base de unión de los embriones con el medio de cultivo hasta el ápice terminal de la misma.

2.8.- Diseño experimental utilizado. El experimento se estableció en el esquema del diseño experimental diseño completamente al azar (DCA). Se utilizaron 20 repeticiones por tratamiento (20 tubos de ensayo). A los datos de las variables cuantitativas altura de plantas y longitud de raíces se les realizó análisis de varianza (ANDEVA). Se utilizó la prueba de DUNCAN al 5 % de probabilidad para lograr categorizar las medias de los tratamientos, cuando se reportaron diferencias estadísticas significativas entre ellos.

3.- Estudio de la micropropagación a partir de microestacas.

3.1. Procedencia del material vegetal. Para la ejecución de esta fase se utilizaron trozos de tallos de las plantas establecidas en la fase anterior, conteniendo primordios foliares, que en su base mantenían una yema lateral de crecimiento. Las plantas establecidas tenían una altura promedio de 8 cm, y contaban con alrededor de 6-8 hojas. Cada microestaca tenía una altura promedio de 1-1.5 cm.

3.2.- Siembra de las microestacas. Una vez seleccionada las mejores plantas desarrolladas en la fase anterior, se procedió a cortar y seleccionar los mejores trozos de tallos conteniendo sus respectivas yemas axilares. Luego se procedió, con ayuda de pinzas y escalpelos, a la inoculación en el tubo de ensayo conteniendo 10 ml del medio de cultivo en estudio.

3.3. Medios de cultivo. Los medios de cultivo empleados en esta fase aparecen en la Tabla 3. Se utilizaron 20 repeticiones por tratamiento.

Tabla 3.- Variantes del medio de cultivo MS (1962) empleadas en el estudio de micropropagación *in vitro* de sapote (*Forsteriasapota* Jacq. Merr), a partir de microestacas

Medios de cultivos	Carbón activado (mg/l)
1	0.00
2	0.50
3	1.00
4	1.50

3.4. Variables evaluadas.

3.4.1.- Porcentaje de contaminación. (%)

- a) Hongos
- b) Bacterias

3.4.2. Porcentaje de sobrevivencia (%). Este se obtuvo a los tres y cinco meses después de inoculadas las microestacas

3.4.3.- Altura de planta (cm). Se realizó una comparación de la altura reportada por las plantas a los tres y cinco meses.

III- RESULTADOS Y DISCUSION

A- Ensayo de Establecimiento

En las Tablas 4, 5 y 6 de los anexos se presentan los datos de porcentaje de contaminación, promedios de altura de plantas, longitud de raíces, estadios de desarrollo obtenidos en el ensayo de establecimiento de los embriones cigóticos de sapote.

La contaminación bacteriana fue mayor que la causada por hongos en los medios de cultivo conteniendo embriones cigóticos provenientes de frutos inmaduros con un promedio 38.8 y 15 por ciento respectivamente, por el contrario la contaminación causada por hongos fue mayor que las causadas por bacterias en los medios de cultivo conteniendo embriones cigóticos provenientes de frutos maduros, con un promedio de 43 y 36 por ciento respectivamente.

En la contaminación bacteriana se reportaron datos similares tanto en frutos inmaduros como con frutos maduros con 38.8 y 36 por ciento respectivamente (ver Tabla 4 en Anexos). Estos resultados pueden estar inducidos por el hecho que las frutas maduras ablandan la cubierta y la carnosidad del fruto llegando hasta cuartarse en la base, provocando la posible entrada de elementos contaminantes que luego se establecen en el medio de cultivo. Los frutos de sapote tienen mayor tendencia a que la cubierta del fruto se rompa, debido a la rápida emergencia de la radícula en la semilla, estando aún dentro del fruto.

Los medios de cultivos 1 y 3 reportaron el 60 por ciento de contaminación bacteriana en los embriones cigótico de frutos inmaduros, seguidos de los medios de cultivo 2, 4, 6, y 8 con un 50 por ciento de contaminación. La contaminación fungosa en el medio de cultivo número 13 obtuvo el mayor porcentaje con 35 por ciento en los embriones cigóticos de frutos inmaduros seguido de los medio de cultivos 5 y 7 con un 25 por ciento de contaminación respectivamente.

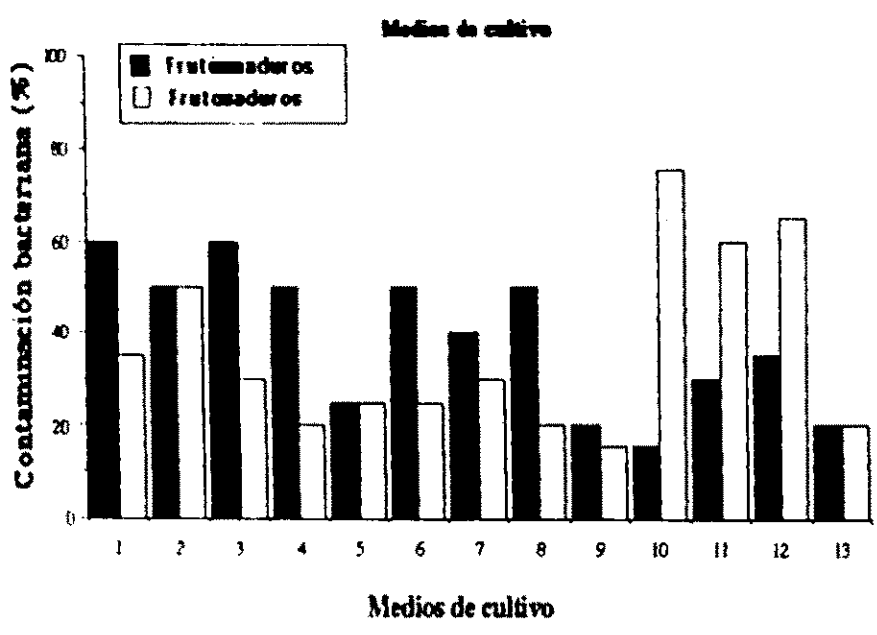
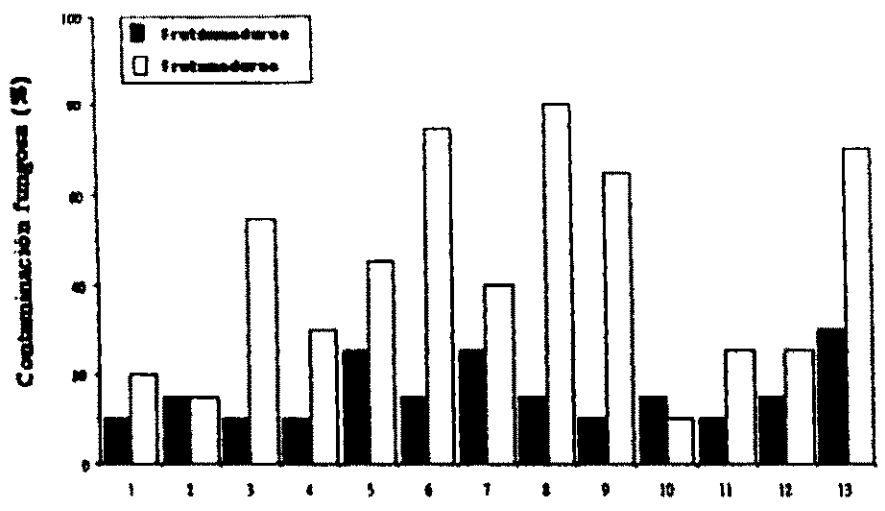


Figura 1. Contaminación fungosa y bacteriana (%) registrada en el establecimiento *in vitro* en trece medios de cultivo de embriones cigóticos de sapote (*Pouteriasapota* Jaq. Merr.) de frutos maduros e inmaduros

En cuanto a embriones cigótico de frutos maduros, el medio de cultivo 10 registró el 75 por ciento de contaminación bacteriana seguido del medio de cultivo 12 con un 65 por ciento de contaminación. La contaminación fungosa por su parte reportó el medio de cultivo número 8 con 80 por ciento, seguido del medio de cultivo número 6 con un 75 por ciento de contaminación.

Al analizar la variable altura de planta se observan que existen diferencias estadísticas significativas entre los medios de cultivo así también entre estadíos de madurez, tal como se deduce de los datos presentados en la Tabla 5 en anexos. De manera general se encontró mayor altura promedio en plántulas desarrolladas a partir de embriones cigóticos obtenidos a partir de frutos inmaduros. El medio de cultivo número 9 reportó la máxima altura de 4.771 cm, estadísticamente superior al resto, seguido de los medios de cultivo número 4 y 9 conteniendo embriones cigóticos de frutos maduros con un promedio de 3.83 cm y 3.72 cm respectivamente. De igual manera los medios de cultivo número 7 y 1 con un promedio de 3.57 cm y 3.55 cm provenientes de frutos inmaduros y maduros respectivamente.

El análisis de la variable longitud de raíces indica que las plantas obtenidas de embriones de semillas de frutas maduras desarrollan mayor longitud promedio de raíces. El medio de cultivo número 2 fue estadísticamente superior al resto con un promedio de 7.01 cm seguido de los medios de cultivo 10, 11 y 1.

En la Figura 2 se observa que hubo influencia del medio de cultivo sobre la variable altura de planta. En el medio de cultivo 9 se obtuvo la altura máxima de plantas con 4.77 cm seguido del medio 7 con una altura de 3.58 cm para frutos inmaduros. Para frutos maduros el medio de cultivo 4 y 9 obtuvieron 3.83 cm de altura para ambos seguido del medio 1 con una altura de 3.55 cm.

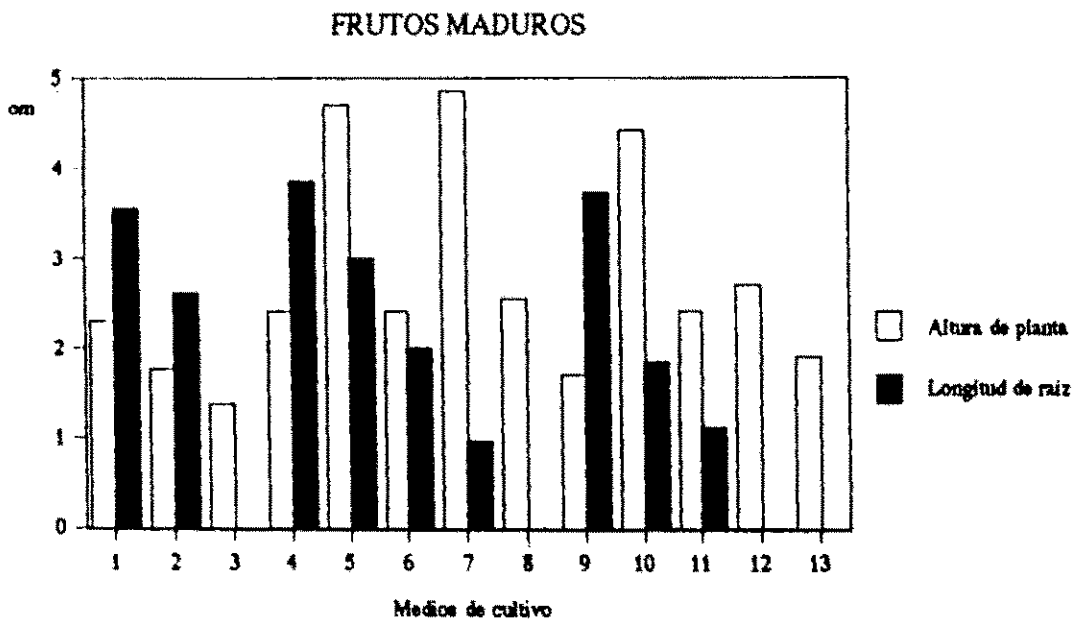
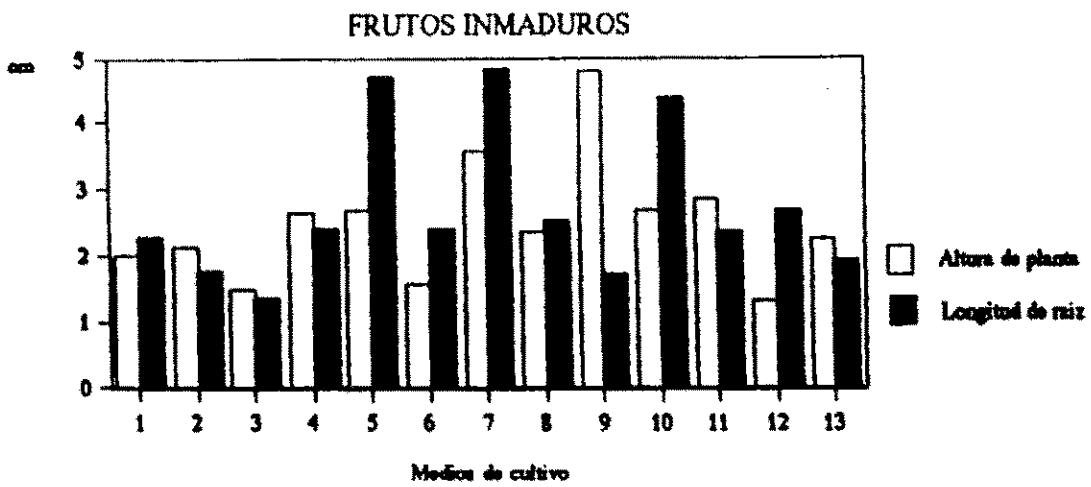


Figura 2.- Altura de planta y longitud promedio de raíces registradas en embriones cigóticos de sapote (*Banania sapota* Jacq. Mex.) obtenidos de frutos maduros e inmaduros en trece medios de cultivo

En cuanto a longitud de raíces para frutos inmaduros el medio 7 obtuvo 4.8 cm seguido del medio 5 con 4.27 cm. En cambio en los frutos maduros el medio 2 reportó una longitud de 7 cm seguido del medio 10 con una longitud de 6.3 cm con mejores resultados que en los frutos inmaduros.

Los embriones cigóticos establecidos *in vitro* desarrollan más rápidamente sus raíces tanto en frutos maduros como inmaduros ya que éstas le servirán de anclaje y asimilación de nutrientes y por último el epicotilo que se transforma en parte aérea de la planta.

Al comparar las variables altura de planta y longitud de raíces de los explantes se observa que en frutos maduros se obtuvo mayor longitud de raíces. En las plantas de sapote se reporta el fenómeno de viviparidad, por lo que es frecuente encontrar en las frutas maduras embriones cigóticos germinados y con la radícula fuera de la semilla. En las frutas inmaduras se encuentra este fenómeno pero con menor frecuencia.

Al comparar las variables altura promedio y longitud promedio de raíces de plantas provenientes de frutos maduros e inmaduros del medio de cultivo se encontró que existe una relación inversa entre ellas. Los medios de cultivo que inducen a una mayor altura de planta son las que reportan las menores longitudes de raíces, por el contrario los medios de cultivo que inducen a una mayor longitud promedio de raíces reportan las menores alturas de plantas.

La mayor altura de planta encontrada en los medios de cultivo conteniendo plántulas provenientes de frutas inmaduras, podría explicarse por el hecho de que a los explantes el medio de cultivo les abastece de la cantidad de nutrientes requeridos por lo que no es necesario invertir los asimilatos en desarrollar un sistema radicular grande, pero sí en desarrollar la parte aérea de la planta.

Al analizar los medios de cultivo utilizados para el establecimiento de embriones cigóticos se encontró que el medio de cultivo 9 reportó la mayor altura promedio de plántulas desarrolladas a partir de embriones cigóticos de ambos estados de madurez. A la constitución de este medio de cultivo se le adicionó 50 mg de carbón activado. El carbón activado favorece el alargamiento de los tallos, además evita la oxidación fenólica y ayuda a absorber sustancias que se forman como desecho en algunos medios de cultivo, lo cual incide de manera positiva en el establecimiento y desarrollo de los explantes (Dublin, 1991).

Los resultados obtenidos en nuestro experimento coinciden de alguna manera con los obtenidos por Astorga y Escalante (1995) (a y b) quienes lograron establecer plántulas de sapote y nispero en un medio básico MS suplementado con 0.5 y 1 mg/l de 6-BAP respectivamente. Aunque estos autores utilizan otros reguladores de crecimiento y otros genotipos, emplean como medio básico el mismo empleado en el presente ensayo. El medio de cultivo número 2 fue el que reportó la mayor longitud promedio de raíces provenientes de embriones cigóticos obtenidos a partir de frutas maduras siendo beneficioso para el desarrollo radicular del explante. A este medio de cultivo se le adicionó 1 mg/l de ANA (ácido naftalenacético) la cual es una auxina que induce el crecimiento radicular.

Al analizar el estadio de desarrollo en que se encuentran los explantes de sapote a las 8 semanas de establecido el ensayo, se encontró que el mayor porcentaje de plantas se obtuvo en el estadio de desarrollo II (emergencia del hipocotilo y separación de hojas cotiledonales) para ambos estados de madurez del fruto independientemente del medio de cultivo (ver en anexos Tabla 6).

Las plantas provenientes de frutos inmaduros llegan al estadio II más rápidamente que las plantas provenientes de frutos maduros, seguido del estadio III (plántulas con hojas primarias y radícula desarrollada) con el menor porcentaje de plantas desarrolladas.

El medio de cultivo que presentó mayor porcentaje de embriones desarrollados es el número 6 con un 50 por ciento de plántulas seguido del medio número 11 con un 45 por ciento en el estadio II de frutos inmaduros. En cambio en los medios de cultivo 9 y 10 presentan los mayores porcentajes con un 45 y 35 por ciento de plantas completas en el estadio número III.

En la Figura 3 se pueden observar los estadios de desarrollo que los embriones provenientes de frutos maduros obtuvieron en los medios de cultivo. Los medios de cultivo que presentan porcentajes más altos son el 2, 4 y 7 con el 30 por ciento respectivamente, seguido del medio número 1 con un 20 por ciento de plántulas en el estadio II. Así mismo el medio de cultivo número 1 reporta el máximo porcentaje de plantas en el estadio número III con un 25 por ciento.

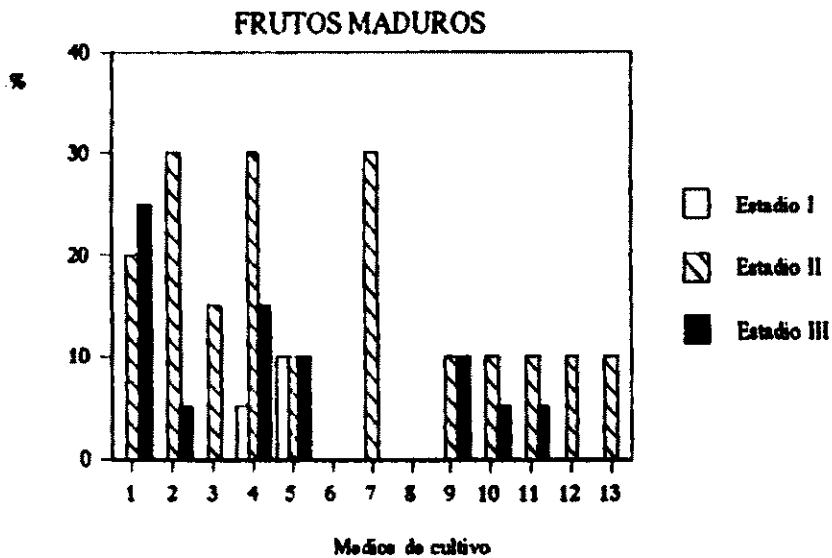
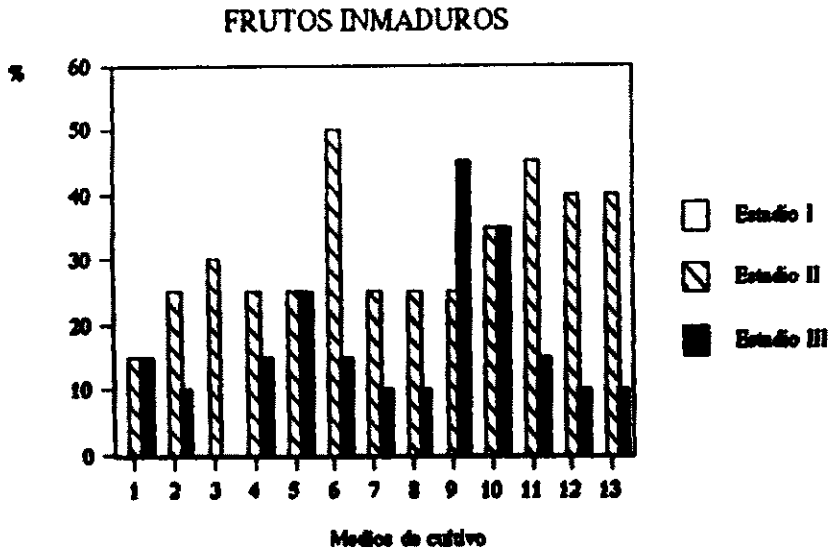


Figura 3.- Estadios de desarrollo (%) de plantas de sapote (*Porteria sapota* Jacq. Merr) provenientes de embriones cigóticos de frutos maduros e inmaduros en 13 medios de cultivo *in vitro*

B.- Ensayo de micropropagación.

En la Tabla 7 de los anexos se presentan los datos de porcentaje de contaminación, altura promedio de planta (cm) y porcentaje de sobrevivencia de los explantes establecidos en 4 variantes del medio MS para micropropagación a partir de microestacas. Los resultados obtenidos no fueron satisfactorios, el objetivo propuesto no se cumplió.

La contaminación fungosa y bacteriana fue baja, 5 y 30 por ciento respectivamente en el medio 1. En los medios 2 y 3 únicamente se reportó contaminación fungosa con un 30 y 5 por ciento respectivamente. En el medio 4 se obtuvo un 5 y 10 por ciento de contaminación fungosa y bacteriana respectivamente, además un 100 por ciento de sobrevivencia de las plantas establecida en los cuatro medios de cultivo. Los explantes en general presentan una coloración verde - amarillenta.

Las infecciones se ven favorecidas por la constitución del medio de cultivo y por las condiciones físicas en que se encubran los explantes, se crea un ambiente propicio para la proliferación de bacterias y hongos, los cuales compiten con el explante por los nutrientes del medio de cultivo. Además existen microorganismos que pueden permanecer de manera sistémica en los explantes y que no se manifiestan en el medio de cultivo al momento del establecimiento, si no que lo hacen cierto tiempo después contaminando el nuevo medio de cultivo.

A los 5 meses de haber sido establecido el experimento la contaminación causada por hongos y bacteria fue de 5 y 35 por ciento respectivamente para el medio 1; mientras que en el medio 2 fue de 50 por ciento de contaminación fungosa y no se presentó infección bacteriana. En el medio de cultivo número 3 se reportó 10 por ciento de contaminación causada por hongos y 5 por ciento por bacterias, mientras que en el medio de cultivo 4 un 10 por ciento de contaminación fungosa y 10 por ciento de contaminación bacteriana (Ver la Figura 4).

De manera general se reportó mayor contaminación por hongos que por bacterias en el segundo momento de evaluación. Estas infecciones son causadas por microorganismos que no pueden ser eliminados mediante la desinfección de bacterias sistémicas.

Los explantes contaminados por bacterias presentaron un halo rosado en la superficie del medio de cultivo, justo en la base de la unión del medio de cultivo con los explantes, lo que provocó la muerte del explante y el cambio de coloración del medio de cultivo. Por otro lado, los medios de cultivo contaminados por hongos presentaban la vellosidad típica de los hongos. Los medios de cultivo que no presentaron contaminación fungosa y bacteriana permanecieron con el color característico del carbón activado.

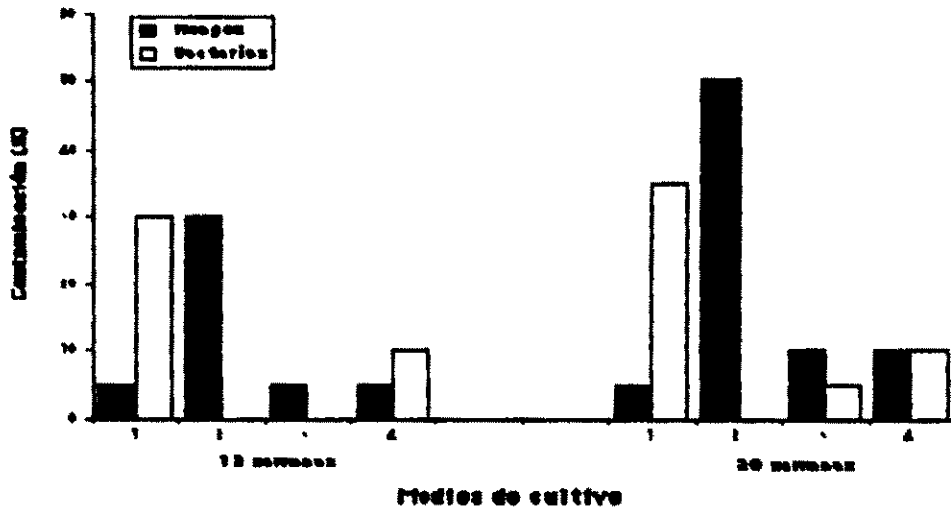


Figura 4. Porcentaje de contaminación (fungosa y bacteriana) de embriones cigóticos de *Pouteriasapota* Jacq. Merr.) obtenidos de frutos maduros e inmaduros en 4 medios de cultivo a las 12 y 20 semanas.

Respecto al porcentaje de sobrevivencia, a los 5 meses después de establecer el experimento, la cantidad de plantas vivas se redujo drásticamente, hasta prácticamente no tener plantas sobrevivientes. En los medios de cultivo 1, 2 y 3 no se encontraron plantas vivas y solo se encontró el 15 por ciento de sobrevivencia en el medio de cultivo número 4 (ver Tabla 7 en Anexos).

Las plantas pueden sobrevivir por un período determinado trasladando los asimilatos y nutrimentos del medio de cultivo hacia las partes más aéreas hasta agotarlos, pero cuando se da la desecación del tallo de abajo hacia arriba se produce la muerte de los mismos. El cambio de coloración comienza desde la parte basal de manera lenta hasta que se da la muerte completa de la planta.

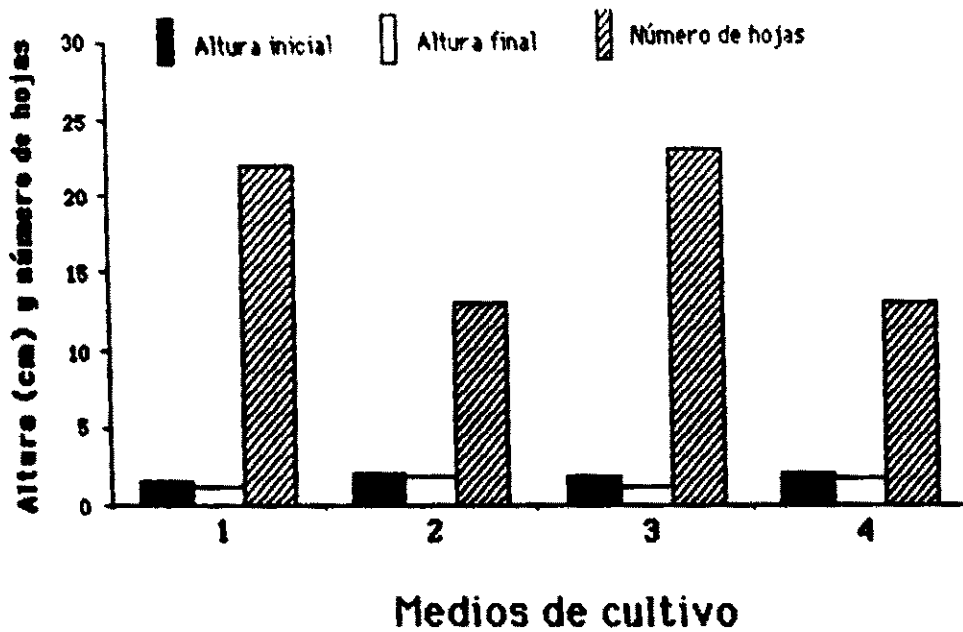


Figura 5. Altura inicial y final y número de hojas totales en plantas de sapote (*Psuteria sapota* Jacq. Merr) desarrolladas en 4 medios de cultivo para su micropropagación, obtenidas de embriones cigóticos de frutas maduras e inmaduras.

Al analizar la altura promedio de las plantas, se observó que en los cuatro medios de cultivo evaluados disminuyó la altura de las plantas respecto a la primera evaluación realizada (3 meses después del establecimiento del ensayo), posiblemente debido al fenómeno señalado anteriormente

IV - CONCLUSIONES

A- Fase de establecimiento.

- 1.-El estado de madurez del fruto ejerce un efecto significativo sobre la contaminación de los medios de cultivo. En los embriones cigóticos de frutas inmaduras se reportó menor porcentaje de contaminación a la causada por bacterias. En el establecimiento de embriones cigóticos provenientes de frutos maduros e inmaduros el porcentaje de contaminación causada por hongos fue inferior a la causada por bacterias.
- 2.- Los medios de cultivo MS + 0.5 mg/l IBA + 1.0 mg/l ANA y MS + 50.0 mg/l CA resultaron ser los mejores en cuanto a la inducción de la altura de planta en los frutos inmaduros; y los medios de cultivo MS + 0.5 mg/l IBA + 1.0 mg/l ANA y MS + 1.0 mg/l IBA con respecto a la longitud de raíces en los embriones cigóticos de frutos inmaduros.
- 3.- Las plántulas provenientes de embriones cigóticos de frutas inmaduras lograron más rápidamente y en mayor cantidad los estadios de desarrollo II (emergencia del epicotilo y separación de las hojas cotiledonales) y III (plántulas primarias y radícula desarrollada) que las plantas provenientes de embriones cigóticos de frutos maduros.

B- Fase de micropropagación

- 4.- El mayor porcentaje de contaminación de los medios de cultivo fue la causada por hongos, las bacterias que se encuentran de manera sistémica en los tejidos vegetales, no son detectadas en su momento, y provoca su proliferación en los medios de cultivo frescos.

- 5.- No fue posible inducir el desarrollo de las variables altura de planta, número de hojas y longitud de raíces en los 4 medios de cultivo utilizados

- 6.- La evaluación del experimento a los 5 meses de haber sido montado, mostró un porcentaje de sobrevivencia de los explantes nulo, únicamente el medio de cultivo número 4 reportó un 15 por ciento de sobrevivencia de las plantas.

V. - RECOMENDACIONES

- 1.- Utilizar embriones cigóticos provenientes de frutos inmaduros para el establecimiento de los explantes en los medios de cultivo, ya que lograron mayor desarrollo tanto radicular como aéreo.
- 2.- Estudiar otros métodos de desinfección en la fase de establecimiento como en la fase de micropropagación para evitar la proliferación de microorganismos contaminantes de los medios de cultivo.
3. Utilizar diferentes concentraciones y combinaciones de reguladores de crecimiento que ayuden a inducir el crecimiento radicular en la fase de micropropagación.
- 4.- Emplear la técnica de inmersión temporal para estudiar las posibilidades de establecer y micropropagar más eficientemente las sapotáceas, con esta técnica se pueden realizar ensayos de micropropagación a partir de embriones somáticos de plantas elites seleccionadas en el campo.

VI - REFERENCIAS

- Astorga, C, y J. V. Escalant. 1996a. Desarrollo de método de propagación *in vitro* de sapote (*Fruteria sapota* Jacq. Merr). En: Informe bianual 1994-1995. Unidad de Biotecnología, Area de Agricultura Tropical Sostenible, CATIE, Costa Rica. 42 pp
- Astorga, C, y J. V. Escalant. 1996b. Desarrollo de método de propagación *in vitro* de caimito (*Chrisophytum cainito* Jacq. Merr). En: Informe bianual 1994-1995. Unidad de Biotecnología, Area de Agricultura Tropical Sostenible, CATIE, Costa Rica. 39 pp
- Barbeau, G. 1990. Sapotáceas. En: Frutas Tropicales en Nicaragua. Dirección General de Técnicas Agropecuarias. MIDINRA 397 pp.
- Dublin, P. 1991. Multiplicación vegetativa de café, hevea y cacao. En: Cultivo de Tejidos en la Agricultura. Fundamentos y Aplicaciones. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali, Colombia. 609 pp.
- Hartmann, H, y D. Kester. 1991. Propagación de plantas. 760 pp.
- Merino, M, y M. Hurtado. 1994. Cultivo de Tejidos Vegetales. 232 pp.
- Morera, J, C. Astorga, C. Umaña, y V. Villalobos. 1990. Manual de recomendaciones sobre cultivos promisorios. CR; Centro Agronómico Tropical e Investigación y Enseñanza (CATIE). Serie Técnica número 53. 20 pp.
- Morera, J. A. 1992. El Sapote. Unidad de Recursos Genéticos, CATIE/ETZ, Turrialba, Costa Rica. Pp 9-12.
- Ochoa, S. 1990. Apuntes de Botánica sistemática. Universidad Autónoma de Chapingo, México. Pp 226-227.

VII. - ANEXOS

Tabla 4- Porcentaje de contaminación (hongos y bacterias) en 13 variantes del medio de cultivo MS (1962) utilizados en el establecimiento de embriones cigóticos de sapote (*Fourieriasapota* Jacq. Merr) obtenidos de frutas maduras e inmaduras.

Medios de cultivo	Hongos (FI)	Bacterias (FI)	Hongos (FM)	Bacterias (FM)
1	10.00	60.00	20.00	35.00
2	15.00	50.00	15.00	50.00
3	10.00	60.00	55.00	30.00
4	10.00	50.00	30.00	20.00
5	25.00	25.00	45.00	25.00
6	15.00	50.00	75.00	25.00
7	25.00	40.00	40.00	30.00
8	15.00	50.00	80.00	20.00
9	10.00	20.00	65.00	15.00
10	15.00	15.00	10.00	75.00
11	10.00	30.00	25.00	60.00
12	15.00	35.00	25.00	65.00
13	30.00	20.00	70.00	20.00
Promedio	15.76	38.80	42.69	36.15

Nota: (FI) Frutas inmaduras
(FM) Frutas maduras

Tabla 5.- Promedios de altura de plantas y longitud de raíces (cm), de embriones cigóticos de sapote (*Platanus zapota* Jacq. Merr) de frutos inmaduros (FI) y maduros (FM) en 13 medios de cultivo *in vitro*.

Altura de planta (cm)			Longitud de raíces (cm)		
Tratamientos	Promedio	Grupos	Tratamientos	Promedio	Grupos
FI (9)	4.771	a	FM (2)	7.012	a
FM (4)	3.831	b	FM (10)	6.300	a-b
FM (9)	3.725	b	FM (11)	5.931	a-c
FI (7)	3.571	b-c	FM (1)	5.753	a-c
FM (1)	3.550	b-c	FM (7)	4.831	b-d
FM (5)	3.000	b-d	FI (7)	4.829	b-d
FI (11)	2.853	c-e	FI (5)	4.692	b-d
FI (5)	2.685	d-f	FI (10)	4.392	c-d
FI (10)	2.670	d-f	FM (5)	4.025	d-e
FI (4)	2.662	d-f	FM (4)	4.000	d-e
FM (2)	2.600	d-f	FM (12)	3.461	d-f
FI (8)	2.380	d-g	FM (3)	3.412	d-f
FI (13)	2.250	d-h	FM (13)	3.300	d-f
FI (2)	2.131	d-i	FI (12)	2.680	e-g
FI (1)	2.020	e-i	FI (8)	2.541	e-g
FM (6)	2.000	e-i	FI (4)	2.411	e-g
FM (10)	1.839	f-g	FI (6)	2.401	e-g
FI (6)	1.574	g-k	FI (11)	2.385	e-g
FI (3)	1.500	h-k	FI (1)	2.281	e-g
FI (12)	1.300	i-k	FI (13)	1.908	f-g
FM (11)	1.100	k-j	FM (9)	1.825	f-g
FM (7)	0.961	k	FI (2)	1.750	f-g
FM (3)	0.000	i	FI (9)	1.707	f-g
FM (8)	0.000	i	FI (3)	1.371	g-h
FM (12)	0.000	i	FM (6)	1.371	g-h
FM (13)	0.000	i	FM (8)	0.000	h

Medias con las mismas letras, no tienen diferencias estadísticas significativas entre ellas, de acuerdo a la prueba de rangos múltiples de Duncan al 5 %.

Tabla 6.- Estadios de desarrollo de plantas de sapote (*Pouteria sapota* Jacq. Merr) obtenidos de embriones cigótico de frutas maduras e inmaduras establecidos en trece medios de cultivo *in vitro*.

Medios de Cultivo	Frutos inmaduros			Frutos maduros		
	Estadios de desarrollo			Estadios de desarrollo		
	I	II	III	I	II	III
1	-	15.00	15.00	-	20.00	25.00
2	-	25.00	10.00	-	30.00	5.00
3	-	30.00	-	-	15.00	-
4	-	25.00	15.00	5.00	30.00	15.00
5	-	25.00	25.00	10.00	10.00	10.00
6	-	50.00	15.00	-	-	-
7	-	25.00	10.00	-	30.00	-
8	-	25.00	10.00	-	-	-
9	-	25.00	45.00	-	10.00	10.00
10	-	35.00	35.00	-	10.00	5.00
11	-	45.00	15.00	-	10.00	5.00
12	-	40.00	10.00	-	10.00	-
13	-	40.00	10.00	-	10.00	-
Promedio	-	31.15	16.53	1.15	14.23	5.77

Tabla 7.- Porcentaje de contaminación y sobrevivencia, altura promedio de planta (cm), número total de hojas de los explantes de sapote (*Bouleria sapota* Jacq. Merr) en 4 variantes del medio MS para micropropagación a partir de microestacas.

12 semanas							
1	5	30	100	1.47	1.19	22	
2	30	0	100	2.06	1.81	19	
3	5	0	100	1.99	1.30	23	
4	5	10	100	2.06	1.69	18	
20 semanas							
1	5	35	0	-	-	-	
2	50	0	0	-	-	-	
3	10	5	0	-	-	-	
4	10	10	15	-	-	-	

GLOSARIO

Viviparidad

Es un proceso en el cual el embrión germina estando aún dentro del fruto.

Halo:

Colonia de bacterias contaminantes que cubre, el medio de cultivo y se manifiesta con tonalidad rosada.

Ventajas de las Técnicas de cultivo de tejidos:

1. Alto volumen de plantas clonales.
2. Plantas libres de virus.
3. Producen a la mitad del tiempo que cuando se propaga por semilla.
4. Son plantas excepcionales.

Micropropagación

Consiste en la multiplicación de un órgano o tejido de la planta, en condiciones adecuadas de temperatura, humedad, luz, nutrientes, obteniendo plantas clonales en un período corto.

Germoplasma:

Plantas de diferentes procedencia, con determinadas características genéticas.

Embriones cigóticos:

Son pequeños esporofitos parcialmente desarrollados, el cual es el resultado de la fertilización de la ovocélula, en el interior del saco embrionario, con un núcleo masculino.

Especies exóticas:

Son especies de mayor calidad mejorada genéticamente que han sustituido a especies silvestres de menor calidad.

Erosión genética:

Es la pérdida de la diversidad genética debido a la falta de penetración, a la zonas donde se encuentran estas especies.

Totipotencia:

Facultad que tienen la especies individuales vegetales, de reproducir a un individuo similar a la planta madre, siempre que se encuentren en condiciones edáficas y climáticas adecuadas.

Recursos genéticos:

Material genético necesario para realizar las actividades, que mejoren la diversidad genética de la especies.