

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

TRABAJO DE DIPLOMA

**ESTABLECIMIENTO Y MICROPROPAGACION *IN VITRO* DE  
GERMOPLASMA DE NISPERO (*Manilkara zapota L.*) COLECTADO EN  
NICARAGUA**

**AUTOR**

***Br. Maribel Herrera Lira  
Br. Ena Hunter Montenegro***

**ASESOR**

***Ing. Agr. Msc. Guillermo Reyes C.  
Ing. Agr. Marbell Aguilar M.***

**Noviembre, 1997  
Managua, Nicaragua**

## **DEDICATORIA**

**A Dios por permitirme el don de la vida y la sabiduría para culminar mis estudios y darme mi gran tesoro, mi familia.**

**A mi mayor riqueza, mis padres Pedro Herrera y Mirtha Lira quienes me dieron el ser, quienes cultivaron la moral y la fe y que con su gran cariño y esfuerzo han hecho de mí lo que soy.**

**A mis hermanos Walter y Jennys Herrera la otra gran parte de vida por su apoyo y que sea en un mañana un ejemplo para ellos. Y a Elvis Sánchez por su cariño y gran apoyo durante mis años de estudio.**

**Al colectivo de trabajo del Laboratorio de Cultivo de Tejidos de la UNA quienes me brindaron la oportunidad de realizar este trabajo y su gran apoyo en transmitir los conocimientos adquiridos por su esfuerzo y desarrollo del estudio de la biotecnología.**

## **DEDICATORIA**

**A Dios por haberme permitido que acabara con bien mis estudios, por permitirme la vida y la salud.**

**A mis padres Juan Hunter y Cleotilde Montenegro que me han dado el ser, cultivando en mi la moral y buenas costumbres brindando su mejor cariño en estos años de estudio y su apoyo moral en mis momentos más difíciles.**

**A mis hermanos Yelba Hunter y Juan Hunter por brindarme su cariño, afecto y su apoyo. A la Lic. Mayra Victor una amiga, madre y gran consejera en mis gratos momentos. Con igual magnitud a mi tía Juana María Montenegro.**

**A todos aquellos que con su cariño me brindaron el apoyo durante todo este tiempo.**

## **AGRADECIMIENTO**

**A nuestro asesor Ing.MSc. Guillermo Reyes Castro por transmitir paso a paso cada uno de sus conocimientos en el estudio del establecimiento in vitro de plantas, por el gran apoyo moral e intelectual, por su amistad y empeño en nuestro trabajo. De igual magnitud al Ing. Marbell Aguilar por su gran participación en nuestro trabajo y a la sra. Esmelda Bobadilla técnica del laboratorio por su gran colaboración.**

**Al programa de Recursos Genéticos y al CATIE que facilitaron la realización de este estudio y por el apoyo brindado.**

**Al Ing. Civil Victor Valdivia y su esposa Lic. Catalina Jiménez quienes también ayudaron en la culminación de nuestro trabajo al facilitarnos su computadora.**

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

# **ÍNDICE GENERAL**

	<b><u>CONTENIDO</u></b>	<b><u>Pág.</u></b>
	Dedicatoria	i
	Agradecimiento	ii
	Índice General	iii
	Índice de Tablas	iv
	Índice de Gráficos	v
	Resumen	vi
I.	Introducción	1
II.	Materiales y Métodos	5
	A. Materiales y equipos	5
	B. Establecimiento de los ensayos preliminares	6
	B 1. Germinabilidad de la semilla de níspero con cubierta (testa) ubicadas en platos petri sobre papel filtro y agua destilada estéril.	7
	B 2. Germinabilidad de la semilla de níspero con cubierta en un medio de cultivo MS (1962) sin reguladores de crecimiento.	8
	B 3. Germinabilidad de la semilla de níspero con cubierta en un medio de cultivo MS (1962) líquido con y sin tela de venda como nodriza.	8
	C. Ensayo definitivo.	9
	C 1. Establecimiento <u>in vitro</u> de embriones cigóticos.	9

C 2.	Micropropagación <u>in vitro</u> de los explantes.	11
III.	Resultados y Discusión.	13
A.	Experimentos preliminares.	13
B.	Ensayo definitivo.	19
B 1.	Establecimiento de embriones cigóticos.	19
B 2.	Micropropagación <u>in vitro</u> de los explantes.	28
C.	Discusión General.	30
C 1.	Sobre establecimiento <u>in vitro</u> .	30
C 2.	Sobre la micropropagación <u>in vitro</u> .	32
IV.	Conclusiones.	33
V.	Recomendaciones.	35
VI	Referencias Bibliográficas.	36

## ÍNDICE DE TABLAS

<u>TABLA</u>	<u>CONTENIDO</u>	<u>Pág.</u>
1	Las variantes del medio básico de cultivo MS (1962) utilizado en estudios de establecimiento <u>in vitro</u> de plantas de níspero a partir de embriones cigóticos.	9
2	Las Variantes de los medios de cultivo básico MS (1962) utilizado en la micropropagación de níspero.	12
3	Porcentaje de contaminación y estadios de desarrollo de semilla de níspero ( <u>Manilkara zapota</u> ) ubicadas en platos petri sobre papel filtro y agua destilada estéril a los 21 días.	13
4	Porcentaje de contaminación y estadios de desarrollo de semilla de níspero ( <u>Manilkara zapota</u> ) provenientes de frutas maduras; establecidos en un medio de cultivo <u>in vitro</u> sin reguladores de crecimiento.	14
5	Porcentaje de contaminación y estadios de desarrollo de la semilla de níspero ( <u>Manilkara zapota</u> ) provenientes de frutos maduros cultivados en dos variantes líquidas del medio de cultivo MS.	18

- 6 Porcentaje de contaminación (fungosa y bacteriana) de embriones cigóticos provenientes de frutas maduras e inmaduras de níspero, cultivadas en 13 variantes del medio cultivo in vitro. 20
- 7 Longitud promedio y altura promedio de plantas de níspero (Manilkara zapota) provenientes de embriones cigóticos obtenidos de frutos maduros e inmaduros, cultivados en 13 variantes del medio de cultivo in vitro.
- 8 Estadio de desarrollo de plantas de níspero (Manilkara zapota) provenientes de embriones cigóticos obtenidos de frutas maduras e inmaduras establecidas en 13 variantes del medio de cultivo in vitro. 24
- 9 Contaminación, altura de planta (cm), longitud de raíces (cm), número de hojas/planta y sobrevivencia de plantas de níspero (Manilkara zapota) obtenidas en ensayos de micropropagación a partir de microestacas en 4 variantes del medio de cultivo MS (1962). 30

## ÍNDICE DE GRÁFICAS

<u>GRAFICO</u>	<u>CONTENIDO</u>	<u>Pág.</u>
1	Estadíos de desarrollo de la semilla de níspero ( <u>Manilkara zapota</u> ) ubicadas en placas petri en un medio de cultivo MS sin reguladores de crecimiento.	15
2	Porcentaje de contaminación con hongos y bacterias registrada en los ensayos de germinación de la semilla de níspero ( <u>Manilkara zapota</u> ) en placas petri y en un medio de cultivo MS sin reguladores de crecimiento.	17
3	Estadíos de desarrollo de la semilla de níspero ( <u>Manilkara zapota</u> ) en un medio de cultivo MS líquido con y sin tela de venda como nodriza.	18
4	Porcentaje de contaminación con hongos y bacterias registradas en ensayos de germinación de la semilla de níspero ( <u>Manilkara zapota</u> ) en un medio de cultivo MS líquido con y sin tela de venda como nodriza.	19
5	Porcentaje de contaminación bacteriana en 13 variantes del medio de cultivo conteniendo embriones cigóticos de semillas de níspero ( <u>Manilkara zapota</u> ) provenientes de frutas maduras e inmaduras.	21

- 6 Porcentaje de contaminación fungosa en 13 variantes del medio de cultivo conteniendo embriones cigóticos de semillas de níspero (Manilkara zapota) provenientes de frutas maduras e inmaduras. 22
  
- 7 Altura promedio de plantas (cm) de níspero (Manilkara zapota) provenientes de frutas maduras e inmaduras establecidas en 13 variantes del medio de cultivo. 25
  
- 8 Longitud promedio de raíces (cm) de níspero (Manilkara zapota) provenientes de frutas maduras e inmaduras establecidas en 13 variantes del medio de cultivo. 27

## RESUMEN.

Se establecieron una serie de ensayos preliminares y un ensayo definitivo con el propósito de lograr establecer en condiciones *in vitro* embriones cigóticos de semillas de frutas maduras e inmaduras de nispero (*Manilkara zapota*). En los ensayos preliminares se trató de lograr la germinación de la semilla y el desarrollo de plántulas en diferentes condiciones: platos petri con papel filtro y agua destilada estéril, medio de cultivo líquido con y sin reguladores de crecimiento; y con y sin tela de venda como nodriza. El ensayo definitivo constó de dos fases: A) Establecimiento *in vitro* de nispero a partir de embriones cigóticos de semillas de frutas en sus dos estados de madurez (inmaduros-maduros), en trece variantes del medio de cultivo básico MS (1962), suplementado con diversas concentraciones y combinaciones de los reguladores de crecimiento ANA (Ácido Naftalen Acético), IBA (Ácido Indol Butírico), CA (Carbón activado), GA<sub>3</sub> (Ácido Giberélico). B) La micropropagación de nispero en cuatro variantes del medio de cultivo MS (1962) a partir de trozos de tallos conteniendo yemas axilares de las plantas desarrolladas en la fase A de este ensayo. En ambos ensayos se utilizaron 20 repeticiones por tratamiento. Se logró obtener la germinación de semilla de nispero en ensayos de laboratorio en platos petri con papel filtro y agua destilada estéril, en tubos de ensayos conteniendo medio de cultivo líquido, el cual facilita la imbibición de la semilla pero puede causar afixia. En el establecimiento de los explantes la contaminación causada por hongos y bacterias fue inferior en los medios de cultivo conteniendo embriones cigóticos provenientes de frutas inmaduras. Las mayores alturas promedio por plantas se presentaron en los embriones provenientes de frutas maduras; las mismas alcanzaron el estadio de desarrollo número III (plantas formadas con las primeras hojas verdaderas y raíz), por el contrario las mayores longitudes promedios de raíces por plantas se obtuvieron en plantas desarrolladas a partir de embriones cigóticos provenientes de frutas inmaduras. El medio de cultivo 6 (MS + 2 mg/l de IBA) indujo los mejores resultados en altura y longitud promedio de raíces de plantas provenientes de ambos estados de madurez de la fruta. La micropropagación de plántulas a partir de trozos de tallos con yemas axilares no fue posible debido a que los explantes no lograron desarrollar raíces, aunque sí presentaron primordios foliares desarrollados.

**PALABRAS CLAVES:** Nispero, *Manilkara zapota*, embriones cigóticos, estado de madurez de la fruta, germinación, establecimiento, micropropagación, reguladores de crecimiento.

## I.- INTRODUCCIÓN

El Níspero (Manilkara zapota) pertenece a la familia de las sapotáceas y es originario de América Central. Crece de forma silvestre desde el nivel del mar hasta mil metros de altura, se considera que los españoles contribuyeron a la dispersión del cultivo (Rubluo, 1981).

El cultivo de esta especie tiene un mercado aún no satisfecho y puede jugar un papel importante como fuente de ingreso, a la vez que puede contribuir a una adecuada composición de la dieta alimenticia, particularmente de las poblaciones de bajos recursos, tanto rurales como urbanos. En algunos lugares de Mesoamérica, las semillas molidas se usan para darle al chocolate el sabor amargo y característico. En Costa Rica se han usado para planchar ropa. En Guatemala y El Salvador el aceite de las semillas se utiliza como tónico para la piel, para evitar la calvicie, reducir dolores musculares y afecciones reumáticas (Blanco, 1985).

El establecimiento de esta especie como cultivo en un sistema de producción tradicional permitirá mantener un desarrollo frutícola de gran sostenibilidad. La explotación de esta fruta en sistema intensivo y extensivo, demandará la producción y existencia de adecuadas cantidades de semilla-planta que estén a disposición de productores y que garanticen una adecuada condición genética y productiva.

Las formas convencionales de multiplicación del níspero son dos: propagación a través de la semilla o embrión cigótico (sexual) y la propagación a través de injertos (asexual).

En la propagación de plantas a partir de semilla botánica existe el problema de la gran heterogeneidad y variación genética. Las semillas necesitan para su germinación entre cuarenta a sesenta días. Como tiene un período corto, con bajo poder germinativo, se acelera la germinación con más facilidad si se realiza una escarificación

de la semilla. Este método se utiliza con el objetivo de que la cosecha no comience hasta los siete años y que su ciclo sea más corto. Para emplear este método deben usarse o seleccionarse semillas de mayor tamaño procedentes de árboles que muestren características deseables para su uso y multiplicación; así como también el grado de resistencia a plagas y enfermedades (Rubluo, 1981). La propagación asexual es conveniente ya que se pueden propagar genotipos deseables o de mayor producción y que producen en la mitad de tiempo que cuando se producen por semillas. El método preferido y que aparentemente es el más recomendable para la propagación asexual de níspero es el de injerto o de enchape lateral. Cuando el árbol proviene de una injertación inicia su producción a los tres años.

En la reproducción vegetativa el empleo de la micropropagación a través de la técnica de cultivo de tejidos, comparada con el de las técnicas hortícolas tradicionales presentan un coeficiente de multiplicación mucho más alto independientemente de los factores climáticos y estacionales. Estas técnicas *in vitro* pueden utilizarse todo el año (Withers, 1985); permiten además un crecimiento continuo y una ruptura de la latencia que causa una "brotación" en la cáscara. Por otra parte hay toda una gama de explantes (hojas, pedúnculos florales) que no son utilizados para el desqueje hortícola pero; lo son en condiciones *in vitro* y contribuyen a aumentar ese coeficiente de multiplicación (Westcott *et al.*; 1977).

La técnica de micropropagación *in vitro* ha sido considerada por muchos investigadores como posible solución para aumentar los volúmenes de producción del material de siembra y con mejor calidad.

La estrategia de conservación del germoplasma depende de la naturaleza del material biológico y esta definida por la duración de su ciclo de vida, el tipo de reproducción, el tamaño de los individuos y el nivel ecológico (silvestre o

domesticado). De acuerdo con estas características se han intentado diversos métodos de conservación los cuales van del tradicional jardín de variedades hasta el mantenimiento de reservas en bancos de semillas (Rubluo, 1981).

El cultivo de tejidos vegetales presentan aspectos y aplicaciones prácticas muy variadas, como son el ciclo de selección más corto. De las ventajas de la multiplicación vegetativa es el cultivo de tejidos sin duda la más difundida y la que más ha contribuido al desarrollo de esta tecnología. Sin embargo, cualquiera que sea el procedimiento utilizado, ayuda en el mejoramiento genético de las plantas cultivadas. En realidad es el único método que permite producir individuos excepcionales obtenidos al azar de las combinaciones genéticas o de las mutaciones cuya fiel reproducción no puede realizarse por vía sexual por diferentes razones. Esto ocurre precisamente con varias especies tropicales perennes de gran interés económico como las palmeras, el cacao, el cafeto y el caucho (Dubin, 1991).

La importancia de este trabajo radica en que potencialmente se pueden utilizar una amplia variedad de explantes para el cultivo de tejido *in vitro* de níspero. Se puede lograr un gran avance en cuanto a la propagación del níspero, considerando que esta es una planta leñosa.

Estudios similares al presente han sido realizados por investigadores del Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE), en las especies de sapotaceas; zapote (*Pouteria sapota* Jack. Merr) y caimito (*Chrisophyllum cainito*); con los cuales han obtenido resultados relativamente exitosos.

Para lograr desarrollar el protocolo de micropropagación de níspero se deberán estudiar los efectos que tienen sobre el establecimiento, multiplicación, enraizamiento y posterior adaptación de las plantas a condiciones de invernadero, factores muy importantes como el tipo de medio de cultivo, concentración y tipo de reguladores de

crecimiento, tipo y origen del explante, consistencia del medio de cultivo y la condición genética de la planta donadora.

El presente estudio pretende contribuir al desarrollo de la agricultura nicaragüense a través de la obtención de resultados que muestren la factibilidad del establecimiento y micropropagación in vitro del níspero, considerando la importancia potencial de esta especie frutal; por lo cual se plantea cumplir con los siguientes objetivos:

### **Objetivo General**

- Determinar la metodología adecuada para el establecimiento y micropropagación in vitro del níspero a partir de embriones cigóticos provenientes de frutos maduros e inmaduros.

### **Objetivos Específicos**

- Estudiar la germinabilidad de las semillas de níspero en ensayos preliminares, en platos petri y medios de cultivo in vitro.

- Determinar en cual de las 13 variantes del medio de cultivo propuestas se logran los mejores resultados en cuanto a: crecimiento de plantas, raíces y porcentaje de contaminación de los embriones cigóticos de níspero provenientes de frutos maduros e inmaduros.

- Estudiar las posibilidades de micropropagación de plantas de níspero a través de microestacas obtenidas a partir de las plantas desarrolladas en la etapa de establecimiento.

## **II.- MATERIALES Y MÉTODOS.**

### **A.- Materiales y equipos**

El presente estudio se realizó en el laboratorio de cultivo de tejidos vegetales del Programa de Recursos Genéticos Nicaragüense (REGEN), perteneciente a la Facultad de Agronomía de la Universidad Nacional Agraria; ubicada en el kilómetro 12 1/2 de la carretera norte, Managua, Nicaragua.

A continuación se detallan los materiales y equipos que fueron utilizados en este estudio en todas sus fases:

- |                             |               |
|-----------------------------|---------------|
| -Ácido clorhídrico (HCl)    | -Sacarosa     |
| -Frascos de aluminio        | -Agitadores   |
| -Alcohol                    | -Horno        |
| -Parafina (cintas)          | -Marcadores   |
| -Mecheros de Bunsen         | -Autoclave    |
| -Balanza analítica          | -Algodón      |
| -Tubos de ensayo            | -Papel craft  |
| -Papel de aluminio          | -Beakers      |
| -Reguladores de crecimiento | -Cuchillos    |
| -Escalpelos y cuchillas     | -Parafina     |
| -Cámara de flujo laminar    | -Bacto Agar   |
| -Destilador de agua         | -Pipetas      |
| -Soluciones madres (MS)     | -Placas petri |

El ensayo se ejecutó en dos etapas: la primera etapa correspondió a los estudios o ensayos preliminares y la segunda etapa es el establecimiento del experimento final.

El ensayo final se ejecutó en dos fases: establecimiento *in vitro* a partir de embriones cigóticos provenientes de frutos maduros e inmaduros y la segunda fase es la micropropagación *in vitro* del explante.

## **B.- Establecimiento de los ensayos preliminares.**

En esta parte del estudio se realizaron una serie de experimentos encaminados a definir la metodología más adecuada para la desinfección y determinar en cual condición el embrión cigótico utilizado logra mejores resultados para su germinación.

De inicio se pretendió conocer cual sería la respuesta de las semillas de níspero a los ensayos de germinación en platos petri y en el cultivo *in vitro*. Se realizaron ensayos utilizando semillas enteras provenientes de frutas maduras en sus dos variantes: con cubierta (testa) y sin cubierta.

El proceso incluye la selección de frutas y posterior desinfección y establecimiento de las mismas bajo condiciones de asepsia.

**- Selección de los frutos.** Los frutos fueron colectados de árboles ubicados en patios y fincas de los municipios de Masaya, Carazo, Granada y/o comprados en el mercado de Masaya y en los mercados de Managua (El Mayoreo y Roberto Huembes). En los dos últimos los frutos provienen de Rivas y La Isla de Ometepe. No se prefirió tamaño específico de los frutos pero si el estado de madurez. Se consideró fruta madura aquel fruto que había adquirido su tamaño final, cuya pulpa se ha suavizado y desprende el aroma característico y el sabor típico de la pulpa y cuya piel de la fruta no presentó látex. El fruto verde es un fruto compacto, con una pulpa dura a la presión, al hacerle un leve corte presenta un color blanco en la pulpa y con presencia de látex, no tienen el olor y sabor desarrollado.

- **Desinfección de los frutos.** Los frutos se lavan con agua y jabón para eliminar asperezas en la cáscara y restos de látex que se encuentran en la superficie. Luego se sumergen los frutos en hipoclorito de sodio (NaOCl) al 5% por diez minutos.

En la cámara de flujo laminar en condiciones de asepsia, la cual fue desinfectada con anticipación con luz ultravioleta durante 15 minutos y con alcohol al 90%, las frutas fueron rociadas con alcohol al 70% posteriormente fueron flameados. Las pinzas, escalpelos y platos petri fueron esterilizados en un horno a 170 °C durante una hora antes de ser utilizados.

En los experimentos preliminares las variables que se evaluaron fueron:

a) Porcentaje de contaminación por bacterias y hongos.

b) Estadíos de desarrollo de la semilla:

-Semillas reventadas, cuando la testa de la semilla tiene alguna ruptura.

-Semilla no reventadas.

-Semilla germinadas, cuando estas presentan algún brote o presencia de las primeras hojas cotiledonales.

En esta etapa se realizaron varios ensayos con los que se pretendía obtener ideas de cómo trabajar con plantas de níspero in vitro para dar continuidad de la segunda etapa.

**B.1.- Germinabilidad de la semillas de níspero con cubierta (testa) ubicadas en platos petri sobre papel filtro y agua destilada estéril.**

Las semillas utilizadas en este experimento fueron desinfectadas en dos ocasiones con hipoclorito de sodio, previo a su introducción en las condiciones de prueba. A las frutas se le eliminaron las asperezas de la cáscara y restos de látex con agua y jabón; luego con la ayuda de un cuchillo y en condiciones de asepsia se

extrajeron las semillas las cuales fueron lavadas con agua e hipoclorito de sodio al 90% por diez minutos, para luego ser ubicadas en los platos petri. Estos platos fueron esterilizados en el horno a 180 °C durante una hora conteniendo papel filtro y una vez al introducir la semilla se le adicionó el agua estéril. La cantidad de semillas utilizadas fue de 80; cada plato contenía 4 semillas. Se evaluó el número de hojas verdaderas y la presencia de raíces. Las evaluaciones fueron realizadas cada dos semanas.

### **B.2.- Germinabilidad de la semilla de níspero con cubierta en un medio de cultivo MS (1962) sin reguladores de crecimiento.**

El método de desinfección de la fruta y semilla utilizados en este ensayo fue el mismo que se utilizó en el experimento anterior. El objetivo fue el de determinar las posibilidades de la germinación *in vitro* de las semillas del níspero y la respuesta de las semillas (crecimiento y desarrollo) al medio de cultivo. El medio de cultivo básico utilizado fue el medio Murashige y Skoog (1962) (MS) líquido sin adicionarle regulador de crecimiento, las semillas fueron extraídas de los frutos y desinfectadas con agua e hipoclorito de sodio al 5% durante 10 minutos. Se utilizaron 80 tubos que contenían 10 ml del medio MS donde se depositaron 80 semillas de níspero, una por cada tubo.

### **B.3.- Germinabilidad de la semilla de níspero con cubierta en un medio de cultivo MS (1962) líquido con y sin tela utilizada como nodriza.**

Se planteó en este estudio como objetivo estudiar la consistencia líquida del medio de cultivo sobre la germinación de las semillas. En la mitad del número total de tubos (40) se ubicó tela de venda como soporte, lo que facilitaría la sobrevivencia de la semilla; a las restantes no se les ubicó el material señalado.

### C.- Ensayo definitivo.

En base a los resultados obtenidos en los ensayos preliminares se estableció un experimento que se subdivide en dos fases: El establecimiento in vitro de embriones cigóticos y la micropropagación in vitro.

#### C.1.- Establecimiento in vitro de embriones cigóticos.

El objetivo de este estudio fue el de determinar alguna influencia sobre el crecimiento y desarrollo de la semilla de níspero proveniente de embriones cigóticos de semillas de frutos maduros e inmaduros, al ser cultivados en trece variantes del medio de cultivo. La variante del medio de cultivo MS en estudio se presentan en la tabla 1.

**Tabla 1.- Las variantes del medio básico de cultivo MS (1962) utilizados en estudio de establecimiento in vitro de plantas de níspero a partir de embriones cigóticos.**

Tratamientos de sales MS	Reguladores de crecimiento (mg/l)
1	0.5 ANA* (Ácido Naftalen Acético)
2	1.0 ANA
3	2.0 ANA
4	0.5 IBA* (Ácido Indol Butírico)
5	1.0 IBA
6	2.0 IBA
7	0.5 IBA + 1.0 ANA
8	0.5 ANA + 1.0 IBA
9	0.5 g/l CA* (Carbón Activado)
10	0.50 g/l CA + 1.0 IBA
11	0.50 g/l CA + 0.5 ANA
12	0.50 g/l CA + 1.0 GA <sub>3</sub>
13	1.0 mg/l GA <sub>3</sub> * (Ácido Giberélico)

## **Diseño estadístico**

Los tratamientos se organizaron en un Diseño Completamente Aleatorizado (DCA) con dos factores en estudio. Se realizó un análisis de varianza (ANDEVA) y separación de medias empleando la prueba de rangos múltiples de Duncan al 5% de acuerdo a metodología sugerida por Pedroza (1993) a los datos de las variables altura de planta y longitud de raíz. Los niveles por cada factor son los siguientes:

**Factor A:** Medio de cultivo [trece variantes del medio de cultivo MS (1962) presentados en la tabla 1].

**Factor B:** Estado de madurez de la fruta.

Niveles del factor B:  $B_1 =$  Maduro

$B_2 =$  Inmaduro

El total de tratamientos en estudio fueron 26, cada tratamiento constó con 20 repeticiones, utilizando tubos de ensayos en las que se estableció un embrión de semilla provenientes de frutas maduras e inmaduras. El total de embriones utilizados fueron 520 embriones.

La preparación de los frutas donadoras de las semillas se realizó eliminando las lenticelas de la superficie de las frutas utilizando cuchillos, detergentes y luego se enjuagaron con tres pases de agua destilada estéril. La desinfección se realizó en condiciones asépticas rociando con alcohol al 90% las frutas y posteriormente se flamea para lograr mayor éxito en la desinfección.

Las semillas fueron removidas del fruto con pinzas, se depositan en un plato petri, se rocían con alcohol al 90% y se flamean. Después de la desinfección superficial del fruto las semillas fueron extraídas en condiciones axénicas y la testa fue eliminada utilizando un "quebra-nueces" de tamaño adecuado. El embrión fue excisado del resto

de las cotiledones mediante un corte de la parte de la semilla que lo contiene. Estos embriones fueron depositados en un tubo de ensayo acompañado con una pequeña porción de endosperma para facilitar la emergencia de las hojas cotiledonales y de la radícula. Después de la siembra de los explantes, los tubos fueron trasladados a un cuarto de crecimiento donde se establecieron bajo condiciones de temperatura regulada y luz.

### **Variables evaluadas.**

Una vez establecido la serie de ensayos se procedió a la evaluación de las siguientes variables:

- a) Porcentaje de contaminación (bacteriana y/o fungosa).
- b) Estadío de desarrollo del embrión:
  - I - Sin germinar.
  - II - Germinada (plantas con dos hojas cotiledonales).
  - III- Plántulas con hojas cotiledonales y con hojas primarias.
- d) Altura de plantas.
- e) Longitud de raíces.

Se realizaron evaluaciones periódicas hasta completar los dos meses.

### **C.2.- Micropropagación *in vitro* de los explantes.**

Para el inicio de este estudio se utilizaron las plántulas obtenidas en la fase anterior seleccionando los mejores explantes. Las plántulas fueron extraídas del medio de cultivo para el establecimiento y trasladadas al medio de cultivo fresco donde se pretendió un mejor desarrollo de hojas.

Para la realización del ensayo de micropropagación se seleccionaron los explantes cortando las plántulas previamente establecidas en trozos. Cada trozo de hoja o primordio de hojas que en su base contenían una yema de crecimiento axilar. Cada entrenudo fue utilizado para la siembra. El medio básico utilizado fue un MS modificado como se presenta en la tabla 2.

Tabla 2.- Variantes de los medios de cultivo básico MS (1962) utilizados en la micropropagación de níspero.

Tratamientos	Macro sales	GA <sub>3</sub>
1	100%	2 mg/l
2	50%	2 mg/l
3	100%	—
4	50%	

En este estudio se utilizaron 40 tubos de ensayos con 10 ml de medio de cultivo MS semisólido para un total de 400 ml totales. Este ensayo se repitió en dos ocasiones.

### Variables evaluadas.

Las variables que se analizaron fueron las siguientes:

- a) Número de hojas verdaderas.
- b) Altura de planta.
- c) Número de raíces.
- d) Longitud de raíces.

### III.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De las formas posibles de propagación de la sapotáceas, se decidió inicialmente trabajar con la variante sexual; por considerar que se obtienen resultados con mayor seguridad, lo que es lo mismo; se puede obtener material vegetal para estudios exploratorios posteriores. El inconveniente de la utilización de material proveniente de la vía sexual de propagación, es que al parecer, este no garantiza la estabilidad genética del progenitor, la planta donadora.

#### A.- Experimentos preliminares.

Una vez concluidos los ensayos preliminares se obtuvieron resultados en cuanto al porcentaje de contaminación y estadios de desarrollo de la semilla los cuales se presentan en la tabla 3.

**Tabla 3.- Porcentaje de contaminación y estadios de desarrollo de semillas de níspero (*Manilkara zapota*) ubicadas en platos petri sobre papel filtro y agua destilada estéril a los 21 días.**

Nº de semillas	Contaminación		Estadio de desarrollo de la semilla		
	bacterias	hongos	reventadas	sin reventar	germinadas
80	8 (10%)	-	62 (77.5%)	18 (22.50%)	45 (56%)

Hay facilidad para el trabajo con las semillas de níspero por su tamaño y por lo tanto, posibilidades de la realización de las pruebas de germinación, así como por la facilidad en la desinfección de la semilla.

Al analizar el porcentaje de germinación de las semillas de níspero se observó que hubo una germinación de un 56%. El porcentaje de semillas germinadas es menor que el porcentaje de semillas reventadas, lo cual es normal puesto que la imbibición de la semilla es un proceso meramente físico y ocurre indistintamente en semilla viable y en semilla no viable. La germinación sólo ocurre en semillas viables.

Con los resultados obtenidos en níspero en este primer experimento, se planteó la realización de los ensayos de germinación sobre medios de cultivos *in vitro*. Los resultados después de dos meses de haberse establecido el experimento se muestran en la tabla 4.

**Tabla 4. Porcentaje de contaminación y estadios desarrollo de la semilla de níspero (*Manilkara zapota*) provenientes de frutas maduras; establecidos en medio de cultivo *in vitro* sin reguladores de crecimiento.**

Ensayos	Contaminación		Estadios de la semilla		
	bacterias	hongos	reventadas	sin reventar	germinadas
80 (A)	25 (33.7%)	22 (27.5%)	44 (55.0%)	36 (45.0%)	25 (31.2%)
80 (B)	18 (22.5%)	7 (8.75%)	52 (65.0%)	28 (35.0%)	38 (47.5%)
T=160	46 (28.12%)	29 (18.12)	96 (60.0%)	64 (40.0%)	63 (39.37%)

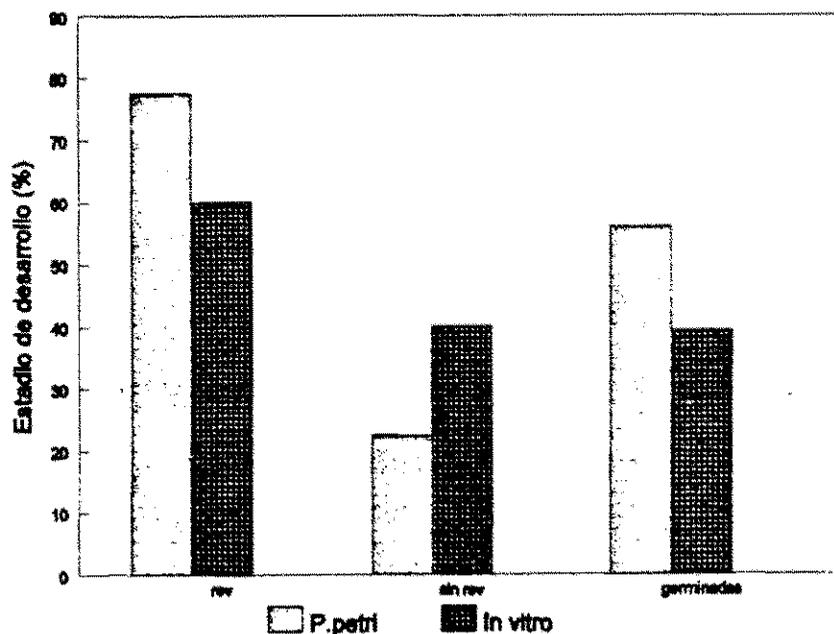
A= primera repetición del experimento.

B= segunda repetición del experimento.

Al comparar los dos primeros experimentos se encontró que en platos petri se obtuvo mayores resultados en cuanto a semillas reventadas y germinadas que en los tubos de ensayos con medio de cultivo MS sin reguladores de crecimiento.

Se obtuvo un porcentaje de 77.5% de las semillas de níspero reventadas y 39.37% de semillas de níspero germinadas, reportándose un 40.0% de semillas de

níspero sin reventar *in vitro*. Con respecto a los platos petri el porcentaje de semillas sin reventar es de un 10.0% lo que marca una diferencia de un 30.0% menos que en los tubos de ensayo, considerando que *in vitro* se evaluaron los totales de las dos repeticiones realizados (gráfico 1).



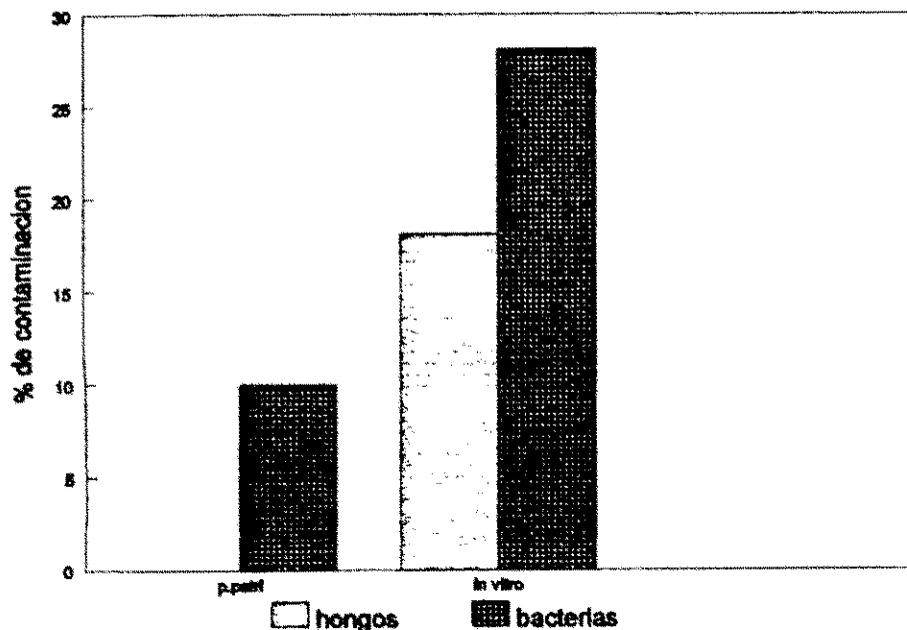
**Gráfico 1.-** Estadíos de desarrollo de la semilla de níspero (*Manilkara zapota*) ubicadas en placas petri y en un medio de cultivo MS sin reguladores de crecimiento.

Los resultados de los estudios de la germinabilidad de la semilla de níspero en un medio de cultivo MS sin adicionarle reguladores de crecimiento, demuestran que se pueden obtener porcentajes de germinación de la semilla hasta un 40%. Hubo un porcentaje de contaminación de un 28%; lo que es común cuando se está hablando de un medio de cultivo rico en nutrientes que son aprovechados por las bacterias. Las bacterias con seguridad permanecieron de manera sistémica en la semilla, las que no fueron eliminadas en su totalidad por la desinfección realizada superficialmente. El 12% de contaminación restante fue causada por hongos, que pudo haberse originado

por descuido en los medios de asepsia a la hora de establecer el experimento. No obstante, el porcentaje total de contaminación (fungosa y bacteriana) no incidió de manera significativa en el desarrollo general del experimento, puesto que no se impidió los procesos normales de imbibición y germinación de la semilla estudiada.

Al analizar los resultados en cuanto a contaminación con hongos y bacterias registrados en los ensayos de germinación, se encontró que el porcentaje de contaminación bacteriana fue mayor que la contaminación con hongos, tanto en las semillas ubicadas en platos petri como en las ubicadas en tubos de ensayos en un medio de cultivo MS simple sin reguladores de crecimiento; encontrándose un 10% de contaminación bacteriana en los ensayos en plato petri y un 28.10% en los ensayos en tubos de ensayo con un medio de cultivo MS (gráfico 2).

La contaminación fungosa es menor que la contaminación bacteriana. La contaminación fungosa en los platos petri fue de un 0.0% y en los tubos de ensayos con un medio de cultivo MS simple sin reguladores de crecimiento el porcentaje de contaminación fue en un 18.12%. La permanencia endógena de ciertas bacterias dificulta la total efectividad de la desinfección, las mismas no pueden ser erradicadas en su totalidad al momento de la aplicación superficial del desinfectante en la semilla.



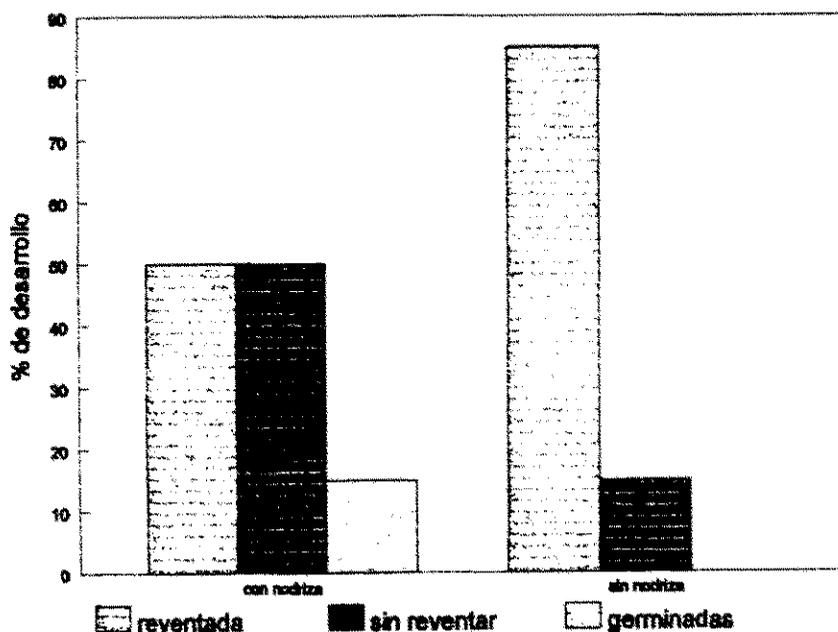
**Gráfico 2.-** Porcentaje de contaminación con hongos y bacterias registrada en los ensayos de germinación de la semilla de níspero (*Manilkara sapota*) en placas petri y en medio de cultivo MS sin reguladores de crecimiento.

Por otro lado, para completar una parte de los estudios preliminares utilizando semilla botánica de níspero se planteó como nueva variante consistencia líquida del medio de cultivo sobre la germinación de las semillas. El medio de cultivo utilizado fue un MS suplementando con 1mg/l de ácido giberélico (GA<sub>3</sub>). A la mitad del número total de tubos (40) se le ubicó como soporte, tela de venda (gasa), lo que facilitaría la sobrevivencia de la semilla. Los resultados se presentan en la tabla 5.

**Tabla 5.- Porcentaje de contaminación y estadios de desarrollo de la semilla de níspero provenientes de frutos maduros cultivados en dos variantes líquidas del medio de cultivo MS.**

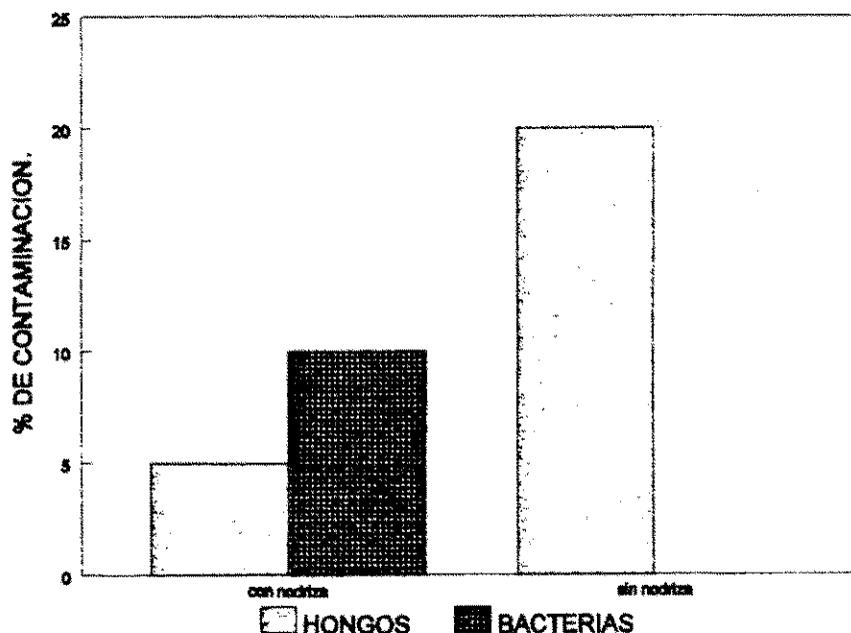
Medios de cultivo	Contaminación		Estadios de la semillas		
	Bacteria	Hongos	Reventadas	Sin reventar	Germinadas
MS líquido sin tela de venda (20 tubos)	–	4 (20%)	17 (85%)	3 (15%)	–
MS líquido con tela de venda (20 tubos)	2 (10%)	1 (5%)	10 (50%)	10 (50%)	3 (15%)

Los medios líquidos dificultan la germinabilidad de la semilla (gráfico 3). Aunque la imbibición ocurre en un 89%; no se logró obtener altos porcentajes de germinación. Es posible que hayan habido más semillas viables, pero estas no germinaron por impedimento físico que significó el sumergimiento de la semilla en el medio líquido.



*Gráfico 3.- Estadios de desarrollo de la semilla de níspero (Manilkara zapota) en un medio de cultivo MS líquido con y sin tela de venda como nodriza.*

Al analizar la contaminación causada por hongos se encontró que ésta fue inferior a la contaminación causada por bacterias. En el medio de cultivo con nodriza se reportó un 5% de contaminación y no se reportó en el medio líquido sin nodriza (gráfico 4). La contaminación por bacterias fue mayor en el cultivo sin nodriza con un 20% de contaminación, en cambio en el medio con nodriza se reportó un 10%. Las diferencias en cuanto al porcentaje de infección bacteriana reportada es típica de la distribución azarizada de las semillas.



**Gráfico 4.-** Porcentaje de contaminación con hongos y bacterias registradas en ensayos de germinación de la semilla de níspero (*Manilkara zapota*) en un medio de cultivo MS líquido con y sin tela de venda como nodriza.

## **B.- Ensayo definitivo.**

### **B.1.- Establecimiento de embriones cigóticos.**

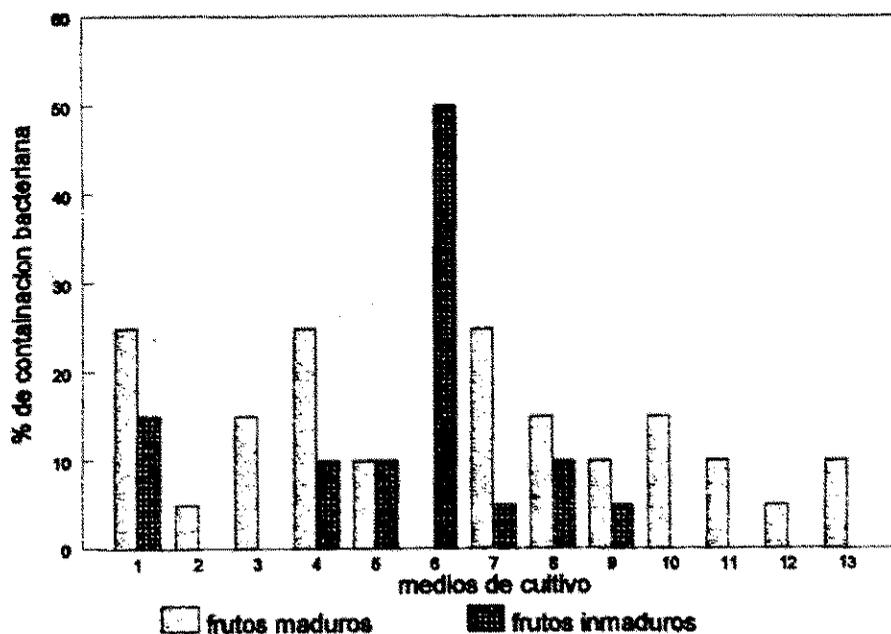
En base a los resultados obtenidos en los ensayos preliminares y a la metodología desarrollada por el CATIE, se procedió a establecer un experimento en el

que se evaluó dos estados de madurez de la semilla proveniente de frutos maduros e inmaduros y trece variantes del medio de cultivo. El objetivo fue determinar alguna influencia del estado de madurez de la semilla y/o de los reguladores de crecimiento en los medios de cultivo, sobre la velocidad de establecimiento in vitro de los explantes. Los resultados de porcentajes de contaminación, altura de planta y longitud de raíces; lo mismo que el estadio de desarrollo de las plántulas establecidas in vitro se presentan en la tabla 6.

**Tabla 6.- Porcentaje de contaminación (fungosa y bacteriana) de embriones cigóticos provenientes de frutas maduras e inmaduras de níspero, cultivadas en 13 variantes del medio de cultivo in vitro.**

Medios de cultivo	Frutos maduros		Frutos inmaduros	
	hongos	bacterias	hongos	bacterias
1	5%	25%	-	15%
2	-	5%	-	-
3	10%	15%	-	-
4	15%	25%	-	10%
5	-	10%	-	10%
6	-	-	-	50%
7	-	25%	5%	-
8	5%	15%	-	10%
9	-	10%	5%	5%
10	-	15%	-	-
11	-	10%	-	-
12	-	5%	-	-
13	10%	10%	10%	-

El porcentaje de contaminación fue mayor cuando se trabajó con los frutos maduros. Estos resultados son debido posiblemente que las frutas maduras tienen blanda la cubierta y la carnosidad del fruto podría permitir la introducción de agentes patógenos las que se depositan en la semilla y contaminarán posteriormente al medio de cultivo (gráfico 5).



**Gráfico 5.-** Porcentaje de contaminación bacteriana en 13 variantes del medio de cultivo conteniendo embriones cigóticos de semillas de níspero (*Manilkara zapota*) provenientes de frutas maduras e inmaduras.

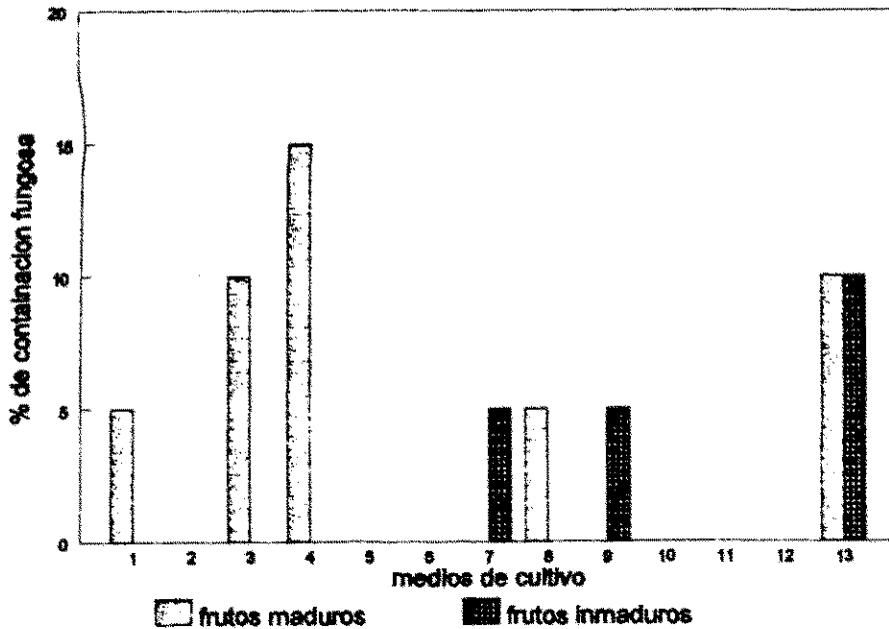
La contaminación causada por hongos fue menor que la causada por bacterias en los medios de cultivos para embriones en ambos estadios de desarrollo de la fruta. Los medios de cultivo 2, 3, 6, 9, 10, 11 y 12 no presentaron contaminación alguna en los medios de cultivo conteniendo embriones provenientes de frutas maduras. Los medios de cultivo 2, 3, 9, 10, 11 y 12 conteniendo embriones cigóticos provenientes de frutas inmaduras también no reportaron contaminación.

La mayor contaminación encontrada fue la provocada por bacterias con un mayor porcentaje en los medios de cultivo con embriones provenientes de frutas maduras que en los embriones de frutas inmaduras (gráfico 6).

En general se encontró contaminación bacteriana en los medios de cultivo conteniendo embriones cigóticos provenientes de frutas maduras en todos los medios de cultivo, exceptuando el medio de cultivo número 6.

El medio de cultivo con mayor contaminación bacteriana es el medio cultivo 6 conteniendo embriones provenientes de frutas inmaduras el porcentaje es alto; pero al comparar ambos medios de cultivo el medio de cultivo 6 el más afectado con un 50% de contaminación.

Las bacterias se encuentran de manera intrínseca en la semilla y es común que cuando hay un medio de cultivo rico en nutrientes, estos sean aprovechados por las bacterias que con seguridad permanecieron sistémicas en la semilla y no pudieron ser eliminadas en su totalidad una vez que se realizó la desinfección superficial de la semilla, previo la siembra.



**Gráfico 6.-** Porcentaje de contaminación fungosa en 13 variantes del medio de cultivo conteniendo embriones cigóticos de semillas de níspero (*Manilkara zapota*) provenientes de frutas maduras e inmaduras.

Por otro lado, el porcentaje de contaminación causada por hongos es bajo en los medios de cultivo 7, 9 y 13 con embriones de frutas inmaduras con valores de 5, 5, y 10% respectivamente. Para embriones provenientes de frutas maduras los medios de cultivo contaminados fueron 1, 3, 4, 8 y 13 con valores de 5, 10, 15 y 10% respectivamente.

El medio con mayor contaminación por hongos es el medio de cultivo 4 con embriones proveniente de frutas maduras en un 15% de contaminación y para los embriones provenientes de frutas inmaduras el porcentaje de contaminación es de un 5% siendo el medio de cultivo 7 y 9 los más afectados.

En los medios de cultivo conteniendo los embriones de frutas maduras se encontraron con mayor contaminación que los embriones de frutas inmaduras. Esto se

debe posiblemente a que las frutas maduras tienen blanda la cubierta; en algunos casos inclusive llegan a cuartarse en la base; lo que provoca la entrada de elementos contaminantes que luego se establecen en el medio de cultivo.

Así mismo se encuentra una menor contaminación fungosa en relación a la contaminación por bacteria tanto en frutas maduras como en frutas inmaduras, lo que se puede atribuir a la manipulación y a las medidas de asepsia, lo que pudo haberse originado por un descuido con las medidas de asepsia a la hora de establecer el experimento y/o a la no total efectividad de las desinfecciones.

En cuanto a los medios de cultivo estudiados no encontramos relación alguna entre los medios de cultivo (constitución) y la contaminación registrada.

Al analizar las variables longitud de raíces y altura de planta se encontró que existen diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos resultados de la combinación de los trece medios de cultivos y las dos procedencias de la semilla (tabla 7).

Según estos resultados; los embriones cigóticos de níspero establecido in vitro desarrollan más rápidamente altura y raíces cuando provienen de semillas de frutas inmaduras que cuando lo hacen de fruto madura.

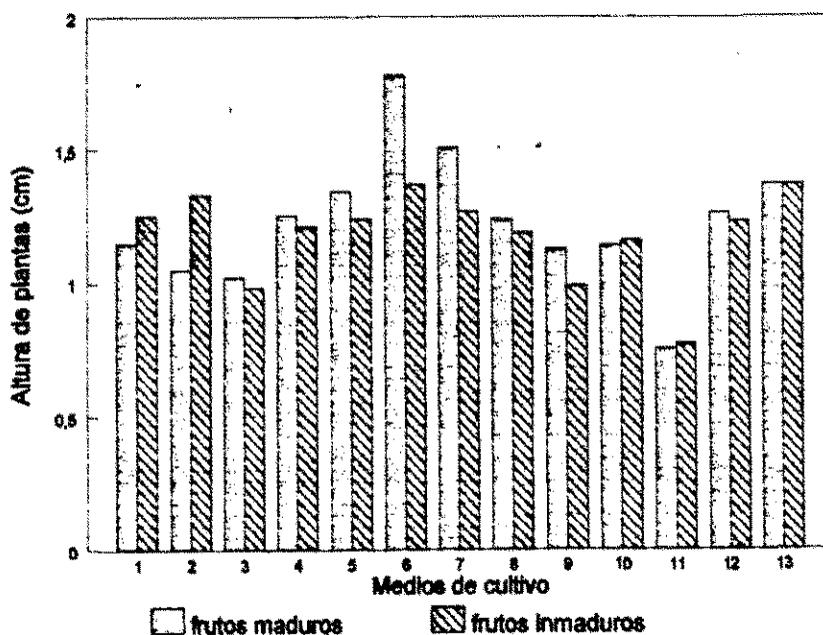
**Tabla 7.- Longitud promedio de raíces y altura promedio de plantas de níspero (*Manilkara zapota*) provenientes de embriones cigóticos obtenidos de frutos maduros e inmaduros, cultivadas en 13 variantes del medio de cultivo *in vitro*.**

Medio de cultivo	Frutos inmaduros		Frutos maduros	
	Alt.planta	Long. raíces	Alt.planta	Long.raíces
1	1.25 ab	3.07abc	1.15 bc	1.20 de
2	1.33 a	3.08 abc	1.05 bc	1.96 cd
3	0.98 ab	1.90 d	1.02 bc	1.77 e
4	1.21 ab	1.93 d	1.25 bc	1.81 cd
5	1.24 ab	2.44 bcd	1.34 ab.	1.88 cd
6	1.37 a	3.88 a	1.78 a	2.93 ab
7	1.27 a	2.65 bcd	1.50 ab	1.75 cd
8	1.19 ab	1.88 d	1.23 bc	1.52 cde
9	0.99 ab	3.35 ab	1.13 bc	3.04 a
10	1.16 bc	2.05 cd	1.14 bc	2.28 abc
11	0.77 b	1.88 d	0.75 c	1.43 cde
12	1.23 ab	3.74 a	1.26 bc	2.18 bc
13	1.37 a	3.46 ab	1.37 ab	1.49 cde

Promedio con las mismas letras no presentan diferencias estadísticas significativas según la prueba de medias de Duncan al 5%.

En la tabla se presentan los promedios de longitud de raíces y altura de plantas obtenidas. Los embriones cigóticos de níspero establecidos *in vitro* desarrollan más rápidamente altura y raíces cuando provienen de frutas inmaduras que cuando provienen de frutas maduras.

La longitud de raíces es mayor en frutas inmaduras que la longitud de raíces de embriones provenientes de frutas maduras; se encontró un mejor resultado en los medios de cultivo 6, 9 y 12. Para el medio 6 el promedio de longitud fue de 3.88 cm y para el medio 9 fue de 3.04 cm en embriones provenientes de frutas inmaduras. Los promedios de longitud en los embriones provenientes de frutas inmaduras está el medio de cultivo 6 y 9 con 2.93 cm y 3.04 cm respectivamente, también el medio 12 logró alcanzar una longitud bastante razonable en ambos estadios de desarrollo como es 3.74 cm para frutos inmaduros y 2.18 cm para frutos maduros (gráfico 8).



**Gráfico 7.** *Altura promedio de plantas (cm) de níspero (Manilkara sapota) provenientes de frutas maduras e inmaduras establecidos en 13 variantes del medio de cultivo.*

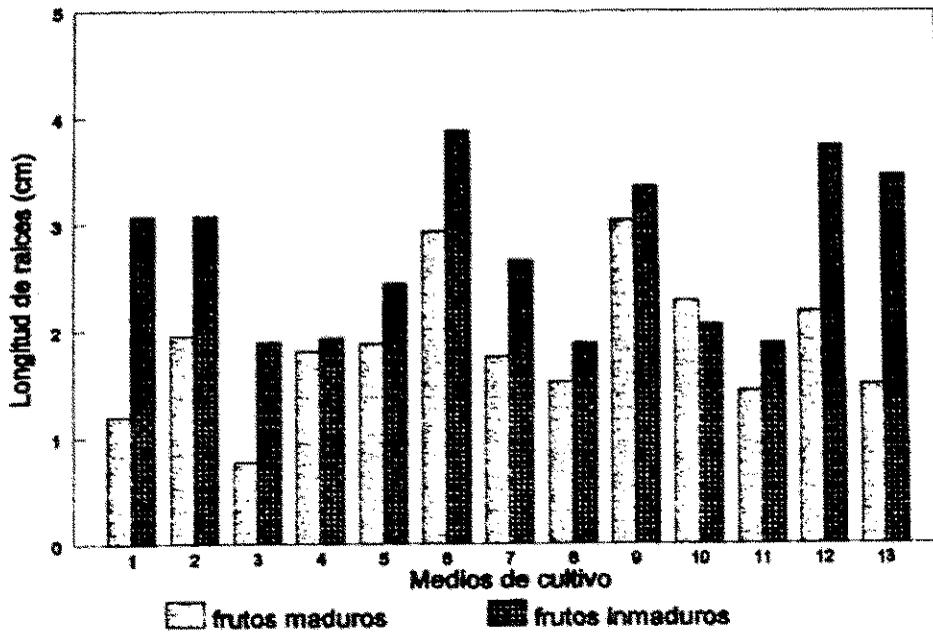
Al analizar la altura promedio de plántulas de níspero provenientes de embriones cigóticos de frutos maduros e inmaduros los mejores promedios fueron para el medio de cultivo 6 con 1.78 cm en embriones de frutos maduros y 1.37 cm en embriones de

frutos inmaduros, y al igual que en la longitud de raíz el medio de cultivo 12 también tuvo efecto en ambos estados de la fruta con un promedio de 1.26 cm para frutas maduras y 1.23 cm para frutas inmaduras en altura de plantas (gráfico 7).

Una vez realizado el análisis de varianza se encontró que sí existe diferencia significativa entre los tratamientos, los medios de cultivo 6, 9 y 12 para los embriones de frutas maduras e inmaduras fueron estadísticamente superiores al resto de los tratamientos en las variables longitud de raíces y altura de planta.

Es importante señalar que el medio de cultivo número 6 es en el que se obtuvo mejores resultados en longitud de raíz, para frutos maduros con un promedio de 2.93 cm y para los embriones provenientes de frutos inmaduros con un promedio de 3.88 cm. No así en altura de plantas son los embriones provenientes de frutos maduros establecidos en el medio 6 con un promedio de 1.78 cm y los embriones provenientes de frutos inmaduros con un promedio de 1.37 cm.

El medio de cultivo número 9 presenta buenos resultados en longitud de raíces también con embriones de frutos inmaduros con 3.35 cm y para los embriones de frutos maduros 3.04 cm; pero los resultados en altura de plantas son menores, presentando mejor promedio los frutos maduros con 1.78 cm y en las frutas inmaduras un menor de 0.99 cm.



**Gráfico N° 8.-** Longitud promedio en cm de raíces de nispero (*Manilkara zapota*) proveniente de frutas maduras e inmaduras establecidas en 13 variantes del medio de cultivo.

El medio de cultivo 12 también presenta buenos resultados para embriones de frutas inmaduras que en embriones de frutas maduras, con un promedio de 3.74 cm en longitud de raíces para inmaduros y 1.23 cm para maduros. La altura de planta es mayor en frutos maduros con 1.26 cm y para frutos inmaduros con 1.23 cm.

Cuando se analiza el estado de desarrollo de las plantas a los cuarenta y cinco días después de establecido el ensayo, se observó que la mayoría de las plantas se encontraban en el estadio tres de desarrollo (embriones con hojas cotiledonales y primarias desarrolladas) (tabla 9). En los embriones provenientes de semilla de frutas inmaduras se logra los más altos resultados con respecto a las semillas de fruto maduro por lo que sólo se analizaron tres medios de cultivo: 6, 9 y 12 ya que estos presentan mayor longitud de raíces, lo que es más importante ya que si no existe raíz no habrá posibilidades de que se establezca una planta.

**Tabla 8.- Estadíos de desarrollo de plantas de níspero provenientes de embriones cigóticos obtenidos de frutas maduras e inmaduras establecidos en trece medios de cultivo *in vitro*.**

Medio de cultivo	Frutas maduras Estadíos de desarrollo			Frutas inmaduras Estadíos de desarrollo		
	I	II	III	I	II	III
1			70%	10%	80%	
2		10%	90%	40%	50%	10%
3			50%		60%	
4			70%	10%	70%	10%
5			50%	10%	70%	20%
6				10%	70%	20%
7			100%		60%	30%
8		10%	90%		60%	20%
9		20%	40%		10%	50%
10			70%		30%	40%
11			60%	10%	30%	30%
12	10%		40%		50%	40%
13			70%		30%	60%

### **B.2.-Micropropagación *in vitro* de los explantes.**

El estudio de micropropagación de plantas establecidas *in vitro* se realizó utilizando cuatro variantes del medio de cultivo básico MS (1962). Como explantes se utilizaron trozos de tallo de las plántulas conteniendo yemas, estas plantas fueron establecidas en el ensayo anterior.

En la primera evaluación a los 15 días después de la siembra, se observó la formación mínima de brotes o primordios de hojas en algunas de las microestacas con yemas apicales e intermedias. A los 30 días después de la siembra, algunas yemas presentaron brotes foliares pero los porcentajes eran muy bajos.

Casi un 70% de las plántulas habían muerto, no precisamente por contaminación causada por hongos y/o bacterias ya que estos medios de cultivo no presentaron contaminación alguna y los que resultaron contaminados se pudo atribuir a la manipulación durante el proceso de siembra.

La micropropagación de microestacas obtenidas a partir de plántulas establecidas *in vitro* no fue efectiva, ya que las yemas al ser trasladadas al medio fresco mueren cierto tiempo después. Las microestacas que logran sobrevivir forman hojas; pero pasado un tiempo mueren al no poseer raíz.

Los medio de cultivo estudiados no indujeron a la formación de raíces en los explantes utilizados (microestacas), al parecer la ausencia de primordios radiculares en el tallo, fenómeno que hace imposible la propagación del níspero de manera convencional a través de estacas, es la causa fundamental del poco éxito de este ensayo.

La activación en las microestacas de los primordios de hojas ocurre a partir del uso de las reservas que poseen éstas. La necrosis y muerte de las plantas ocurrió paulatinamente desde la base de los explantes hacia arriba. Fue común en el ensayo encontrar plantas con la parte apical aún con hojas pequeñas verdes, con la base necrosada y seca.

**Tabla 9.- Contaminación, altura de planta cm, longitud de raíces cm, número de hojas/planta y sobrevivencia de plantas de níspero (*Manilkara zapota*) obtenidas en ensayos de micropropagación a partir de microestacas en 4 variantes del medio de cultivo MS (1962).**

**15 días después de establecido el experimento.**

Medio de cultivo	Contaminación		Altura (cm)	Long. Raíz (cm)	Nº Hoja	Sobrevivencia (%)
	Hongos	Bacterias				
1	-	-	0.5	-	-	30 (6)
2	-	-	0.3	-	-	40 (8)
3	-	-	1.2	-	-	40 (8)
4	-	-	0.3	-	-	15 (3)

**30 días después de establecido el experimento.**

	-	-	1.0	-	4	5 (1)
	-	-	-	-	-	-
	-	-	1.6	-	5	15 (3)
	-	-	-	-	-	-

### **C.- Discusión general.**

#### **C.1.- Sobre establecimiento in vitro.**

Al evaluar las variables altura de plantas y longitud de raíces se encontró que hubieron medios de cultivo que presentaron buenos resultados en cuanto a estas dos variables.

La influencia del estado de madurez de la semilla es muy importante sobre los resultados de las variables analizadas. Los medios de cultivo 6, 9, 12, y 13 reportaron altos valores de ambas variables en los embriones provenientes de frutas inmaduras. El

medio de cultivo 6 fue estadísticamente superior al resto (tabla 7, gráfico 7 y 8).

Los mayores promedios en cuanto altura de planta se encontró en los embriones provenientes de frutas maduras; sin embargo, son los que reportan menor longitud de raíces en relación a los embriones provenientes de frutas inmaduras.

De manera general se encontró menor contaminación con hongos y bacterias en los medios de cultivo conteniendo embriones cigóticos provenientes de frutas inmaduras. La contaminación causada por hongos fue considerablemente menor que la causada por bacterias.

La relación medios de cultivo y estadios de desarrollo y la relación de ambos con la variable longitud de raíces es muy buena. Los embriones provenientes de frutas maduras llegan con mayor facilidad al estadio de desarrollo número III (planta formada con las primeras hojas verdaderas y raíces). En el caso de las frutas inmaduras presentaron mayores valores en el estadio de desarrollo número II (planta formada con las primeras hojas verdaderas). La velocidad al alcanzar el estadio de desarrollo III fue muy lenta (tabla 8).

Al revisar la composición química de los medio de cultivo indica que los medios de cultivo más destacados son los medios 6 (MS + 2 mg/l IBA), 9 (MS+ 0.5 g/l CA), 12 (MS+ 0.5 g/l CA + 1 mg/l GA<sub>3</sub>), 13 (MS + 1 mg/l GA<sub>3</sub>). Al parecer la adición de un sólo regulador de crecimiento en concentraciones relativamente bajas (2mg/l IBA; 1 mg/l GA<sub>3</sub>) o adicionarle altas concentraciones de CA (0.5 g/l) inducen a los mejores resultados; de igual manera la combinación de ambos CA + GA<sub>3</sub>.

Por otro lado no coincidimos con los resultados obtenidos por Astorga y Escalant (1996)(a) quienes trabajando con zapote (*Pouteria sapota* Jacq. Merr.) encontraron los mejores resultados en el medio MS (1/4 de los macroelementos, suplementado con 0.5 mg/l de BAP en el establecimiento de embriones cigóticos

provenientes de frutas maduras. Sin embargo, los mismos autores (1996)(b) trabajando con embriones cigóticos provenientes de frutas maduras de caimito (Chrisophyllum cainito) encontraron que el mejor medio para el establecimiento de los explantes fue el medio MS suplementado con 1 mg/l de BAP y 1 g/l de CA, con el cual dos de los medios propuestos en nuestra investigación tienen importante similitud puesto que tienen en común el uso total del medio básico MS y la utilización de carbón activado.

En estudios realizados por Dublin (1991) en reproducción de cacao encuentran que la adición de 30  $\mu$ M (6 mg/l) de IBA induce a la proliferación de raíces en el establecimiento de las estacas. Considerando que el cacao es un árbol perenne igual que el níspero, similares respuestas se obtuvo en nuestro estudio en cuanto a longitud de raíces y altura de plantas en el establecimiento de embriones cigóticos de níspero, cuando se adicionó al medio MS 2 mg/l de IBA ( $\mu$ M 10).

## C.2.- Sobre la micropropagación in vitro.

A diferencia de los resultados obtenidos por Astorga y Escalant (1996)(a) quienes lograron a desarrollar yemas axilares de zapote en el medio MS + 1 mg/l de BAP + 1 g/l de CA; nuestros resultados indican que la sobrevivencia y desarrollo relativo de las plantas originadas a partir de trozos de tallos con yemas axilares, es posible lograrla en un medio de cultivo, sencillo (MS + 3% de sacarosa). Sin embargo, coincidimos con los mismos autores en cuanto a que es difícil la inducción de raíces en los medios de cultivo donde se lograron los mayores porcentajes de sobrevivencia.

## **IV.- CONCLUSIONES**

### **A) Ensayos preliminares.**

- ▶ La germinación de la semilla de níspero obtenidas de frutas maduras es posible lograrla a nivel de ensayos en laboratorios, ya sea en platos petri con papel filtro y agua destilada estéril o en tubos de ensayos con medio de cultivo.
- ▶ El tamaño de los explantes (semillas) dificulta o imposibilita su establecimiento in vitro fundamentalmente por problemas de la contaminación bacteriana del medio de cultivo.
- ▶ El medio de cultivo líquido, aunque facilita la imbibición de la semilla, dificulta la germinación por el fenómeno de afixia a que se someten las semillas cuando estas son sumergidas en el medio de cultivo.

### **B) Ensayos definitivos.**

#### **b.1) Establecimiento.**

- ▶ En el establecimiento de embriones cigóticos provenientes de semillas de frutas inmaduras menor contaminación que en los provenientes de frutas maduras. La causada por hongos fue menor que la causada por bacterias en ambos estados de madurez de la fruta, independientemente de la variante del medio de cultivo utilizado.
- ▶ Las plantas obtenidas de embriones cigóticos provenientes de semillas de frutas maduras presentaron las mejores alturas promedio de plantas de manera general, por el contrario las mayores longitudes de raíces se lograron en las plantas obtenidas de los embriones cigóticos provenientes de frutas inmaduras.

- ▶ El medio de cultivo número 6 (MS + 2 mg/l de IBA) indujo a las plantas lograr mayores alturas promedios y longitud promedio de raíces, superior estadísticamente al resto de los medios de cultivos estudiados.
- ▶ Las plantas establecidas a partir de embriones cigóticos provenientes de semillas de frutas maduras logran llegar al estadio de desarrollo III (planta formada con las primeras hojas verdaderas y raíz) más rápidamente que las plantas provenientes de frutas inmaduras. En el mismo período estas últimas presentaron mayor cantidad de plantas en el estadio de desarrollo II (planta formada con las primeras hojas cotiledonales).

## B.2) Micropropagación.

- ▶ No hubo contaminación fungosa y/o bacteriana en ninguno de las variantes de los medios de cultivo estudiados, la cual demuestra que es posible utilizar material obtenidos de embriones cigóticos con la seguridad de están libres de las infecciones sistémicas, las cuales perjudican el desarrollo ulterior de los explantes.
- ▶ No fue posible lograr desarrollar plantas enraizadas a partir de los trozos de tallos con yemas axilares utilizadas como explantes, en ninguna de las variantes del medio de cultivo estudiado. Los primordios foliares lograron desarrollar en hojas, sin embargo; no se logró inducir la formación de raíces, lo que causó la muerte paulatina de las plantas.

## **V.- RECOMENDACIONES.**

En base a los resultados obtenidos en los experimentos realizados se recomienda lo siguiente:

- ▶ Utilizar los resultados obtenidos en este estudio para el establecimiento de una copia in vitro del germoplasma de níspero, siempre que para el establecimiento del mismo se utilice semilla botánica, de esta manera se estaría conservando una amplia variabilidad de la especie.
- ▶ Continuar el estudio de la micropropagación a partir de trozos de tallos conteniendo yemas axilares a fin de perfeccionar la técnica en la producción de plántulas y la formación de raíces. Para la sobrevivencia de las mismas elementos nuevos, que podrían ser estudiados en la continuación de este estudio serán la inclusión de nuevos reguladores de crecimiento estimuladores del enraizamiento, mayores concentraciones y combinaciones de los ya utilizados, practicar una especie de anillado en los tallos obtenidos con el objetivo de tratar de concentrar en la parte apical de las plantas mayor cantidad de auxinas, utilizar para los mismos objetivos la técnica de inmersión temporal con la cual se han reportado algunos éxitos en el CATIE.
- ▶ Continuar los estudios de establecimiento y micropropagación de plantas madres a partir de partes somáticas como: yemas axilares, hojas, trozos de cotiledones, de tallo y raíces; las que garantizarían la identidad genética del cultivar.

## VI.- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Astorga, C; Escalant, J.V. 1996. (a) Desarrollo de métodos de propagación in vitro del Zapote (Pouteria sapota Jack. Merr.). En: Informe bianual 1994-1995. CATIE, Turrialba, C.R.
- Astorga, C; Escalant, J.V. 1996. (b) Desarrollo de métodos de propagación in vitro del Caimito (Chrisophyllum cainito). En: Informe bianual 1994-1995. CATIE, Turrialba, C.R.
- Blanco, L. A. 1985. El problema del germoplasma en el mundo material de propagación. FAO. 1985. p. 37.
- CIAT. 1980. El cultivo de meristemas de yuca. Cali, Colombia. p .40.-
- Dublin, P. (1991). Multiplicación vegetativa de café, hevea y cacao. En: Cultivo de tejidos en la Agricultura, Fundamento y Aplicaciones. CIAT. Roca.W; Mroginski. L. Cali, Colombia. p. 917.
- Hartmann, H; Kester, D. 1985. Propagación de plantas. CIA. Ed. Continental, S.A de C.V, México . p. 814.-
- Hoyt, E. 1992. Conservando los parientes silvestres de las plantas cultivadas. Ed. Wesley. p. 51. Iberoamérica. Wimington, Delaware. E.U.A.

- Krikorian, A.D.(1991). Propagación clonal in vitro. En cultivo de tejidos en la Agricultura Fundamentos y Aplicaciones.CIAT. P. 95-125. L. Cali,Colombia.
  
- Núñez,Pérez C. 1987. Determinación de la temperatura de cero crecimiento bajo condiciones in vitro y su importancia en la conservación de germoplasma. Turrialba, Costa Rica. 1987. p. 89.-
  
- Pedroza, H.(1993). Centro de Estudios Ecodesarrollo para el Trópico. Fundamentos de experimentación agrícola. Editora de Arte 1993. Managua, Nicaragua Pág. 264.
  
- Rubluo, I. A. 1981. Estrategias para preservación del germoplasma vegetal invitro. En: El cultivo de tejidos vegetales en México. comp. por. MSc. Robert, V. M. Loyola, México D. F. Mex. CONACYT. p.242-282.
  
- Wither, L. A. 1985. Requisitos mínimos para recibir y mantener material de propagación. FAO. 1985. p. 37.
  
- Wither, L. A. 1980. Tissue culture storage for genetic conservation. Rome, IBPGR. p. 91. (IBPGR Technical report. N<sup>o</sup>. 180/8).
  
- Wescott, R. J; Henshow; Grout, B. W. W; Roca, W. M. 1977. Tissue culture methods and germoplasm storage in potato. Acta horticulturae (Bélg.) 78:45-49. p.

- William M. Roca; Luis A. Mroginski. 1977. Cultivo de tejido en la agricultura. CIAT. Ed. X,Y,Z. Cali, Colombia. p. 970.