

PROPAGACION "IN VITRO" DEL MASTO DE MONTAÑANA

JUAN A. MARIN
RAFAEL GELLA
Dpto. Fruticultura
CRIDA-03 - I.N.I.A.
ZARAGOZA

R E S U M E N

Se ha propagado "in vitro" el patrón de cerezo local "Masto de Montañana" difícil de propagar por métodos tradicionales, pero de indudable valor para suelos calcáreos de terraza.

En la proliferación el factor de multiplicación hallado es tuvo entre 3 y 4 cada 4 semanas y el enraizamiento ha sido próximo al 100%, aumentando el número de brotes enraizados y el número de raíces por planta con tratamientos que disminuyen la influencia del BAP del medio de proliferación. La aclimatación presentó problemas que siguen estudiándose con posibilidades de solución.

INTRODUCCION

El "Masto de Montañana", que responde a las características de la especie Prunus cerasus, es un patrón de cerezo que le confiere poco vigor y cierta adaptación al cultivo en regadio con un valor indudable al haber permitido el cultivo de cerezo en zonas donde el "Santa Lucía" (P. Mahaleb) no ha tenido buen comportamiento (HERRERO, 1.970, CAMBRA, 1.979). Se ha difundido desde antiguo en la zona de Montañana y Villamayor (Zaragoza) y se emplea tradicionalmente injertando "in situ" sobre sierpes (HERRERO, - 1.970) debido a las grandes dificultades de propagación.

El interés del "Masto de Montañana" como patrón de cerezo para suelos de terraza y regadio sigue siendo grande y se continúan los estudios de propagación con técnicas actuales (FELIPE, 1.983, comunicación personal).

La micropropagación "in vitro" por ápices caulinares y yemas axilares puede resolver estas dificultades, además de proporcionar una propagación masiva y rápida de clones seleccionados que reduciría el tiempo necesario entre el cultivo de pies madres y la comercialización de la planta.

La propagación "in vitro" de distintas variedades y patrones de cerezo (dulce o amargo) ha sido reseñada por diversos autores: JONES y HOPGOOD, 1.979; ZUCCHERELLI, 1.979; RANJIT et al, 1.981; SKIRVIN et al, 1.981 y SNIR, 1.982.

En este trabajo se estudia la propagación "in vitro" del "Masto de Montañana" y de diversos factores para la obtención de plantas en un estado óptimo con unos resultados que indican la posibilidad de aplicación de esta técnica para su propagación masiva.

MATERIAL Y METODOS

Material vegetal: los explantos (ápices caulinares y microestaquillas de 1-2 cm. con una yema axilar) se obtuvieron en el CRIDA-03 (Zaragoza) en junio de 1.982.

Esterilización: Después de quitadas las hojas se esterilizaron según el método de JONES et al. (1.977) modificado:

- 10 minutos en lejía comercial al 10% (5 g de Cloro activo por litro) con Tween 20 (0,5 ml/l). Tres aclarados con agua destilada esteril y 24 horas en un medio básico de cultivo compuesto por componentes minerales de MURASHIGE y SKOOG, 1.952 (MS) empleando FeNa EDTA (2 mg/l) como sal de hierro, inositol (100 mg/l), Tiamina-HCl (0,4 mg/l) y sacarosa (30 g/l). Todos los medios se gelificaron con Bacto-agar (0,6%) y se ajustó el pH a 5.25 antes de añadir el agar y esterilizar a 120° C durante 15 minutos en autoclave. Los cultivos se desarrollaron en una cámara a 25° C con 16 horas de luz diarias a unos 1.000 lux proporcionados por tubos fluorescentes "Gro-Lux".

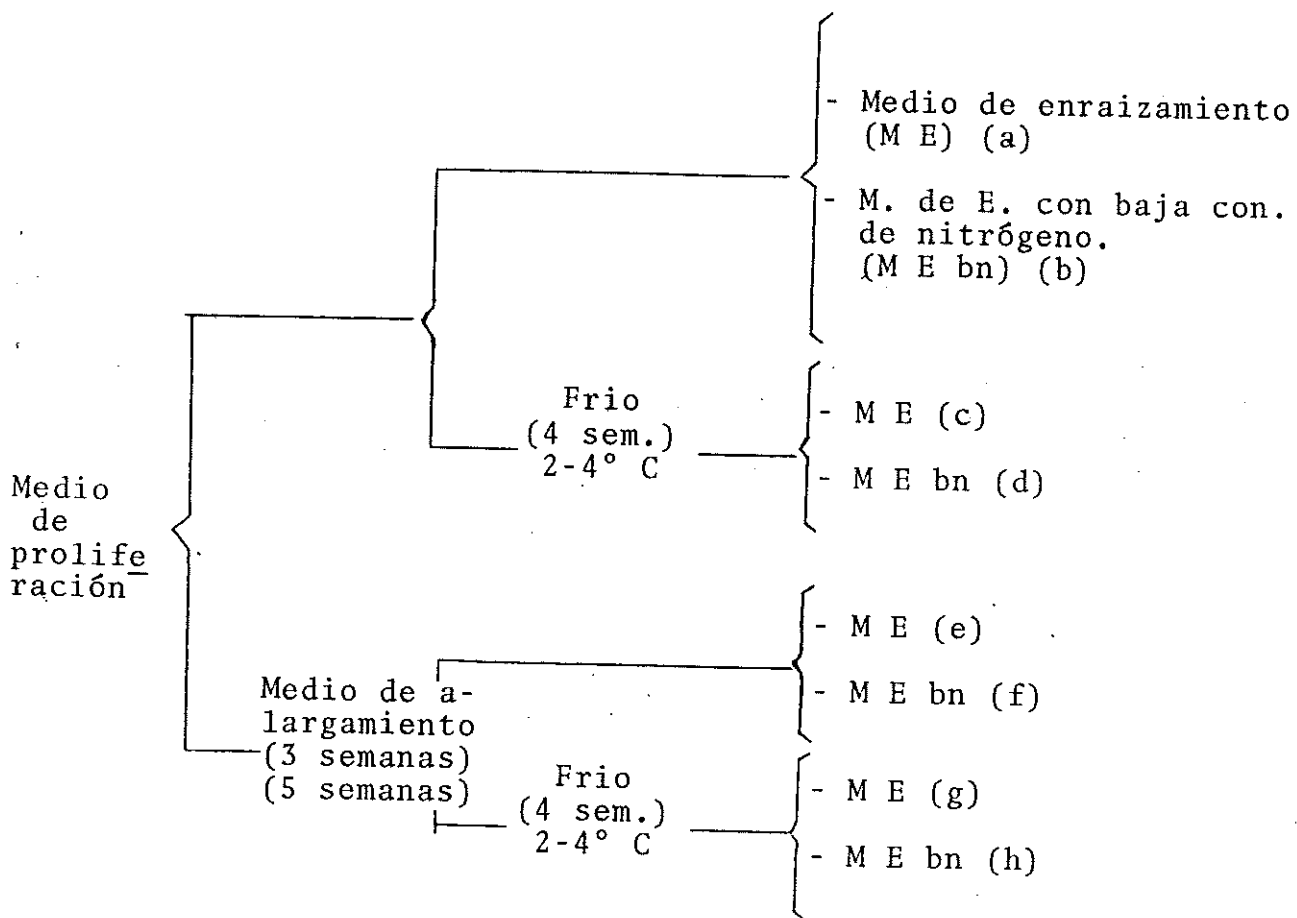
- inmersión de 30 segundos en etanol al 70% (v/v) seguido de 30 minutos en lejía al 10% con Tween 20 (0.5 ml/l). Tres aclarados con agua destilada esteril.

Proliferación de brotes: los explantos se colocaron en tubos de 25 x 150 mm con 10 ml de medio de proliferación descrito por ZUCCHERELLI, 1.979b, pero con los reguladores de crecimiento de JONES et al., 1.977: sales minerales MS, mio-inositol (100 mg/l), tiamina-HCl (0.4 mg/l), ac. nicotínico (0.5 mg/l), glicina (2 mg/l), piridoxina (0.5 mg/l), ac. ascórbico (10 mg/l), Benzyl-amino-purina (BAP) (0.72 mg/l), ac. indolbutílico (AIB) (0.1 mg/l), ac. giberélico (GA₃) (0.1 mg/l) y sacarosa (30 g/l).

Un mes después las plantas no contaminadas se pasaron a matraces erlenmeyer con 50 ml del mismo medio, cerrados con papel de aluminio. Después se pasaron a jarras de vidrio de medio litro

de capacidad con 100 ml de medio donde se repicaron cada 4 semanas a medio renovado dividiendo las matas de brotes en pequeños grupos. El factor de multiplicación se calculó a partir del número de jarras obtenidas de manera similar en varios repicados.

Enraizamiento de brotes: se han comparado los resultados obtenidos con varios tratamientos efectuados después de la proliferación según el siguiente esquema:



poniendo aproximadamente 100 brotes por tratamiento. El repicado a medio de alargamiento se realizó sin dividir las matas de brotes. El medio de alargamiento es igual al de proliferación, pero disminuyendo el BAP de 0.72 mg/l a 0.1 mg/l. Para el tratamiento de Frio se almacenaron las jarras con el mismo medio durante 4 semanas en una cámara frigorífica sin luz a 2-4° C, repicándose varios días después de pasarlas de nuevo a la cámara de cultivo.

Para poner los brotes en Medio de Enraizamiento se separaron individualmente aquellos que tenían una longitud mínima de 2 cm. poniendo 10 brotes por jarra con 100 ml de medio. Se han comparado dos medios de enraizamiento con distinta concentración de sales nitrogenadas. El primero de composición igual al medio de proliferación, pero con las sales minerales MS reducidas a la mitad, sin ac. ascórbico, sin BAP y sin GA₃. El AIB se lleva a 1 mg/l. El segundo es igual al anterior excepto la concentración de NH₄NO₃ y KNO₃ reducidas a 7.5 mM (8 veces menos que en la fórmula original MS) (HYNDMAN *et al.* 1.982). El enraizamiento se determinó a las 2 y a las 3 semanas y se contó el número de raíces por planta.

Aclimatación: los brotes salidos del medio de enraizamiento se lavaron en agua corriente para eliminar restos de agar. Se plantaron en bandejas con sustrato Humin (NEUHAUS) sombreadas y cubiertas con un túnel de plástico transparente colocado en un invernadero. Otros brotes se plantaron en vasos desechables de plástico transparente de 330 ml con el fondo agujereado, llenos hasta la mitad del mismo sustrato y cerrados con una lámina de plástico autoadherente de uso doméstico, colocados en un lugar sombreado en el invernadero.

RESULTADOS

Proliferación: de 40 explantos iniciales sólo 3 desarrollaron sin contaminación. Seis semanas más tarde se pasaron a erlenmeyer y 4 semanas después a jarras. Se siguió proliferando para obtener un número suficiente de plantas. El factor de multiplicación durante la proliferación en los tres últimos repicados fue de 3.8, 3.7 y 3.4 (media 3.6).

El número de brotes con una longitud mínima de 2 cm. que se pasaron a enraizamiento varió según el tratamiento:

<u>Tratamiento</u>	<u>n° jarras</u>	<u>n° brotes/jarra</u>	<u>media</u>
a,b) MP	23	9.5	12.4
c,d) MP-Frío	15	15.3	
e,f) MA (3 sem.)	7	28.5	
g,h) MA (3 sem.-F)	6	33.3	30.9
e,f) MA (5 sem.)	10	50	50

Estas cantidades son mínimas ya que en los medios de alargamiento se aprovecharon los de longitudes mayores. El medio de alargamiento tiene un efecto positivo en el crecimiento de los brotes, así el número de brotes grandes aumenta de 3 a 5 semanas. El buen estado de las plantas se mantiene durante este tiempo.

El tratamiento de frío no parece afectar al estado de los brotes, aunque aumenta el número de brotes útiles por jarra.

Enraizamiento: la siguiente tabla resume el enraizamiento a las 2 y 3 semanas y el número de raíces por planta a las 3 semanas:

<u>Tratamiento</u>	<u>n° plantas</u>	<u>% enraizamiento</u>		<u>n° raíces/planta</u> <u>± des. Tip.</u>
		<u>2 sem.</u>	<u>3 sem.</u>	
a) MP-ME	111	86.3	95.5	6.8 ± 4.2
b) MP-ME bn	111	72.7	77.5	5.4 ± 3.8
c) MP-F-ME	99	86.4	93.9	7.6 ± 5.2
d) MP-F-ME bn	110	79.1	84.5	6.7 ± 4.4
e) MA(3s)-ME	100	97	99	8 ± 3.2
f) MA(3s)-MEbn	100	91	95	6.5 ± 3.3
e) MA(5s)-ME	128	96.7	99.2	9.8 ± 4.8
f) MA(5s)-MEbn	129	96.5	98.4	7 ± 3.1

El enraizamiento ha sido en todos los casos muy elevado, pero dismi

nuye en el medio con baja concentración de sales nitrogenadas -- (M E bn) igual que el número de raíces por planta, aunque su longitud era mayor. Hay un aumento del número de plantas enraizadas y del número de raíces por planta al aumentar el tiempo en el medio de enraizamiento de 2 a 3 semanas y también al aumentar el tiempo entre el medio de proliferación (con influencia del BAP) y el medio de enraizamiento en los distintos tratamientos. El número de raíces por planta muestra una gran variabilidad en un rango muy amplio (de 1 a 30 raíces/planta).

Aclimatación: Los brotes transplantados a tunel de plástico se secaron a las 2 semanas. Sólo un 10% en los mejores casos sobrevivieron. En los vasos transparentes cerrados seguían vivos a las 3 semanas y con buen aspecto, empezando a crecer hojas nuevas.

DISCUSION

La esterilización de los explantos en el establecimiento del cultivo es difícil si las yemas son obtenidas en el campo. Las yemas obtenidas en invernadero son más fáciles de desinfectar.

El medio de proliferación con una concentración de BAP de 0.7 mg/l ha dado un buen resultado sin necesitar elevar su concentración a 3-5 mg/l como indica ZUCCHERELLI, 1979a, evitando los problemas derivados de la aparición de yemas adventicias. Los factores de multiplicación son comparables a los suyos y a los de JONES y HOPGOOD, 1979.

La utilización de un medio de alargamiento para aumentar la longitud de los brotes descrita por ZUCCHERELLI et al., 1978, ha permitido el crecimiento de los brotes mejorando el número de brotes útiles para enraizar. Pero en nuestro caso hemos utilizado -- una composición diferente, tanto en los componentes orgánicos como en la composición y la concentración de hormonas. Este efecto es mayor aumentando la permanencia de 3 a 5 semanas. Sin embargo, la eliminación total de las hormonas ha dado un resultado negativo. Permitted el crecimiento de los brotes, pero produjo necrosis en ápices y hojas superiores (datos no publicados).

El tratamiento de frío no parece tener ningún efecto específico. Al aumentar el tiempo en el mismo medio ha permitido un crecimiento, aunque pequeño, de los brotes. Eso parece explicar tanto el mayor número de brotes útiles como de plantas enraizadas y de raíces por planta. Y hace posible el almacenamiento de material en frío sin causar modificación en la aptitud de enraizamiento.

El enraizamiento ha sido muy elevado (cercano al 100%). El medio de enraizamiento con baja concentración de nitrógeno ha dado peores resultados, aunque las raíces crecían más, no observando los resultados de HYNDMAN et al., 1982, para Rosa. El AIB ha

sido eficaz a la concentración utilizada (1 mg/l). ZUCCHERELLI, - 1979a, obtuvo enraizamiento nulo en P. avium con AIB a 0.1 mg/l y sí, en cambio, con ac. naftalenacético a la misma concentración. JONES y HOPGOOD, 1979, utilizaron AIB a 3 mg/l, pero en nuestro caso no sería aconsejable por la producción basal de callo. SKIRVIN et al., 1981, ha encontrado un efecto inhibitor del enraizamiento en las vitaminas de Staba. La mezcla vitamínica empleada aquí es más sencilla y no parece tener efectos inhibidores.

La aclimatación de los brotes enraizados se sigue estudiando. Los bajos porcentajes de plantas supervivientes en tunel contrastan con los resultados obtenidos hasta ahora con los vasos -- transparentes de plástico cerrados. La causa puede ser la disminución del volumen de aire que rodea cada planta.

El método de propagación "in vitro" para el Mastro de Montañana presenta posibilidades reales de aplicación por las dificultades que plantea su propagación por métodos tradicionales.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- CAMBRA, R., 1979. Selecciones de patrones en curso en el Departamento de Pomología de la Estación Experimental de Aula Dei. I Jornadas de Hortofruticultura. Zaragoza, Junio 1979.
- HERRERO, J., 1970. Patrones de otras especies de hueso. I.T.E.A. 1:137-152.
- HYNDMAN, S.E.; HASEGAWA, P.M.; BRESSAN, R.A.; 1982. Stimulation of root initiation from cultured rose shoots through the use of reduced concentrations of mineral salts. HortScience 17 (1):82-83.
- JONES, O.P.; HOPGOOD, M.E.; 1979. The successful propagation in vitro of two rootstocks of Prunus: the plum rootstock Pixy (P. insititia) and the cherry rootstock F 12/1 (P. avium). J. of Hort. Sc. 54 (1): 63-66.
- JONES, O.P.; HOPGOOD, M.E.; O'FARRELL, D.; 1977. Propagation in vitro of M 26 apple rootstocks. J. of Hort.Sc. 52:235-238.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. - Plant. 15: 473-497.
- RANJIT, M.; KBSTER, D.E.; MICKE, W.; 1981. Shoot tip and callus culture of cherry rootstocks. HortScience 16 (3,2): 417.
- SKIRVIN, R.M.; CHU, M.C.; KEARNES, H.; 1981. In vitro proliferation and rooting of "Harbite" peach and "Montmorency" sour cherry. HortScience 16 (3,2): 459-460.
- SNIR, I., 1982. In vitro propagation of sweet cherry cultivars. --- HortScience 17 (2): 192-193.
- UCCHERELLI, G., 1979a. Primi risultati della moltiplicazione "in vitro" di alcune varietà di ciliegio dolce (Prunus avium L.). Atti Convegno su "Tecniche di colture 'in vitro' - per la propagazione su vasta scala delle specie ortoflorofrutticole". Pistoia.
- UCCHERELLI, G., 1979b. Metodologie nella moltiplicazione industria

le "in vitro" dei portainnesti clonali del pesco: "Pescomandorlo GF 677", "Susino GF 43", "Damasco 1869", - "S. Giuliano 655/2". Atti Convegno su "Tecniche di colture 'in vitro' per la propagazione su vasta scala delle specie ortoflorofrutticole". Pistoia.

ZUCCHERELLI, G.; VENTURI, V.; DAMIANO, C.; 1978. Rapid propagation on a vast scale of Damasco 1869 rootstock by in vitro culture. Ann Ist. Sper. Fruttic. 9: 21-23.