

Efecto de la temperatura, medios de cultivo y reguladores de crecimiento en la germinación de embriones cigóticos de durazno (*Prunus persica*) var. Diamante

Venancio Arahana^{1*}, Homero Arteaga¹, Jose Tobar¹, Viviana Jaramillo¹, Maria de Lourdes Torres¹

¹ Laboratorio de Biotecnología Vegetal, Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales, Universidad San Francisco de Quito, Diego de Robles s/n y Vía Interocéánica, Quito, Ecuador.

* Autor principal/Corresponding author, e-mail: varahana@usfq.edu.ec

Editado por/Edited by: Cesar Zambrano, Ph.D.

Recibido/Received: 12/10/2012 Aceptado/Accepted: 12/15/2012

Publicado en línea/Published on Web: 12/28/2012 Impreso/Printed: 12/28/2012

Abstract

In this research, the effects of temperature, culture media and growth regulators on mature peach embryos (var. Diamante) were evaluated. Temperature had a significant influence on germination, as embryos cultured at 4°C for 40 days and then moved to a temperature of 18°C had a germination rate of 84 %, compared to embryos cultured directly at 18°C, which had a germination rate of 50 %. Regarding the culture media, the highest germination rate was achieved using MS media with half the concentration of salts. Despite not having significant differences when adding growth regulators in the culture media, the addition of high concentrations of cytokinins (>1mg/L) and low concentrations of auxins (0.5mg/L) generated plants with a higher number of leaves. The best root development was obtained by the subculture of plants in MS media with 3mg/L of IBA for 16 days. The acclimatization of plants was successful, with a survival rate of 80 % in plants that germinated from embryos cultured at 4°C for 40 days. This standardized protocol was also tested in the germination of var. Diamante x var. Florida peach hybrids, with a germination rate of 61 %, proving to be a potentially efficient method for peach propagation in crop improvement programs.

Keywords. *Prunus persica*, zygotic embryos, stratification, growth regulators, *in vitro* germination

Resumen

En esta investigación se evaluó los efectos de la temperatura, medios de cultivo y reguladores de crecimiento sobre la germinación de embriones maduros de durazno var. Diamante. La temperatura tuvo una influencia significativa sobre la germinación. Embriones cultivados a 4°C durante 40 días y luego trasladados a temperatura de 18°C tuvieron un porcentaje de germinación del 84 % en comparación con los cultivados directamente a 18°C cuyo porcentaje fue del 50 %. En cuanto al medio de cultivo, la tasa de germinación más elevada se obtuvo con el medio MS a la mitad de concentración de sales. Pese a que no se obtuvo diferencias significativas respecto a la adición de reguladores de crecimiento en el medio de cultivo, la adición de concentraciones altas de citoquininas (>1mg/L) y bajas de auxinas (0.5mg/L) dió lugar a plantas con mayor número de hojas pero con poca iniciación radicular. Para obtener un óptimo desarrollo de raíces se realizó un subcultivo de las plantas a medio MS con 3mg/L de IBA durante 16 días. La aclimatación de las plantas fue exitosa, el porcentaje de supervivencia alcanzó el 80 % en plantas provenientes de embriones cultivados a 4°C durante 40 días. Finalmente, el protocolo estandarizado pudo ser utilizado en la germinación de híbridos de durazno var. Diamante x var. Florida con un porcentaje de germinación del 61 %, mostrando ser un método eficiente para la propagación de durazno en programas de mejoramiento.

Palabras Clave. *Prunus persica*, embriones cigóticos, estratificación, reguladores de crecimiento, germinación *in vitro*

Introducción

El durazno (*Prunus persica*) pertenece a la familia Rosaceae. Es un árbol caducifolio, de porte erecto que puede alcanzar hasta los 8 metros de altura. Presenta un tronco robusto y de madera fuerte. Las hojas son de color verde claro, alargadas, lanceoladas y aserradas. Las flores se encuentran en racimos, son pentámeras y, generalmente de color rosado, poseen varios estambres y son hermafroditas. El fruto es una drupa globosa con exocarpo liso o pubescente y mesocarpo carnoso y dul-

ce. La semilla es de color marrón y los cotiledones son blancos [1].

El durazno es originario del oeste de China y el fruto es altamente apreciado a nivel mundial por su sabor y por la presencia de compuestos carotenoides, vitamina C y antocianinas [1]. La producción anual de durazno a nivel mundial es de 19.25x10⁶TM y los principales productores son China, Italia, Estados Unidos, España y Grecia [2]. En el Ecuador, la producción de durazno oscila alrededor de 3 125 TM por año, la cual no abastece

ISSN 1390-5384



la demanda nacional. El cultivo enfrenta algunas limitaciones principalmente debidas a enfermedades causadas por hongos [3] y al uso de variedades “criollas” cuyo rendimiento es bajo en comparación con variedades élite que se cultivan en otras partes del mundo. Las variedades más comunes en nuestro país son Diamante, Conservero amarillo, Chagrahuay tambo, Puka Shungo, Tajón, Fortuna, Zapallo, Abridor amarillo y Sungold [4]. La producción de estas variedades podría ser optimizada mediante cruzamientos y obtención de variedades híbridas con características mejoradas. Sin embargo, estos híbridos por lo general tienen problemas para germinar, se ha encontrado, por ejemplo, una alta proporción de abortos en muchos cruzamientos [5]. Una alternativa para superar estos problemas es su propagación mediante cultivo in vitro.

El cultivo in vitro de plantas consiste en utilizar cualquier tejido vegetal con fines de propagación en condiciones asépticas y controladas de laboratorio [5]. El cultivo de embriones de durazno ha sido ampliamente utilizado y desarrollado con diferentes fines [6]. El cultivo de embriones maduros se ha utilizado para eliminar la dormancia de las semillas y en programas de mejoramiento destinados a producir patrones resistentes a nemátodos y tolerantes a estrés ambiental [7, 8]. Por otro lado, el cultivo de embriones inmaduros así como el rescate de embriones de durazno se ha utilizado para obtener híbridos, especialmente en cruzamientos con otras especies del género *Prunus* como almendra (*P. amygdalus*), albaricoque (*P. americana*), y ciruela (*P. domestica*) con el fin de obtener características como tolerancia a heladas, adaptabilidad a suelos pobres en nutrientes, sequías y mejoras en la calidad de los frutos [9]. En la actualidad la mayor cantidad de investigación en torno al cultivo de embriones de durazno y el mejoramiento de la especie se lleva a cabo en los grandes países productores: China, Italia, España, Estados Unidos y Japón [10].

El objetivo del presente estudio fue evaluar el porcentaje de germinación de embriones maduros de durazno (var. Diamante) y la eficiencia de la técnica hasta producir plantas de invernadero. Adicionalmente, se evaluó este protocolo para la germinación de embriones híbridos (var. Diamante x var. Florida), para determinar la aplicabilidad del mismo en programas de mejoramiento genético de durazno, y así aportar a un manejo más eficaz de este frutal con potencial económico interesante en el país.

Métodos

Material Vegetal

Se obtuvo frutos recién cosechados de la variedad Diamante de durazno de la plantación San Felipe ubicada en la hacienda Corranquí en la provincia de Imbabura. Se removió el mesocarpo de los frutos y se enjuagó con

abundante agua las semillas aún cubiertas del endocarpo para eliminar residuos de pulpa. Con ayuda de una prensa se retiró el endocarpo y se liberó las semillas.

Desinfección de semillas, siembra de embriones y germinación

La desinfección de las semillas consistió en su inmersión en alcohol al 70 % por 5 minutos y en hipoclorito de sodio al 1.25 % por 20 minutos con agitación constante. A continuación, se realizaron varios lavados en agua destilada estéril para eliminar residuos de hipoclorito, y se dejó las semillas en remojo en agua destilada estéril por 24 horas dentro de la cámara de flujo.

Se eliminó la cubierta seminal de las semillas y los embriones se sembraron en los diferentes medios de cultivo y concentraciones hormonales de acuerdo a las especificaciones que se describen más adelante. El tratamiento de temperatura se hizo sometiendo la mitad de embriones a un período de estratificación a 4°C por 40 días, transcurrido el cual se los colocó en el cuarto de cultivo (fotoperiodo 16 horas, temperatura 18°C), mientras que la otra mitad de los embriones se colocó en el cuarto de cultivo a 18°C y 16 horas fotoperiodo desde el momento de la siembra en los medios de cultivo. El porcentaje de germinación y las características de crecimiento de las plántulas: número de hojas y altura de tallo se tomaron 70 días después de la siembra. Finalmente, el protocolo con el que se obtuvo el porcentaje de germinación más alto fue replicado en híbridos (var. Diamante x var. Florida), para comprobar la aplicabilidad del mismo en la propagación de las plántulas resultantes de estos cruzamientos.

Enraizamiento

Se probaron 2 tratamientos de inducción de raíces. El primero consistió en un subcultivo de las plántulas que germinaron in vitro y que presentaron problemas para enraizar, a un medio MS+ IBA 3mg/L por 8 días, el segundo en un subcultivo al mismo medio por 16 días. Luego de la inducción de raíces, las plantas fueron transferidas a medio MS basal sin hormonas para que se complete el desarrollo y crecimiento de raíces en el cuarto de cultivo con las condiciones de fotoperiodo y temperatura indicadas previamente.

Aclimatación

Seis semanas después de la germinación, se tomó plantas que habían sido sometidas al período de estratificación y plantas que no habían sido sometidas a dicho tratamiento. La transferencia de las plantas desde los frascos hasta los sustratos de aclimatación se llevó a cabo en cámara de flujo laminar. Se usó un sustrato estéril de turba y vermiculita 1:1 en vasos cubiertos con plástico. Se regó las plantas una vez por semana y el plástico fue retirado paulatinamente hasta la quinta semana en la cual se retiró por completo. Transcurrido este tiempo, las plantas se trasplantaron a fundas de vivero y se las llevó al invernadero de la Universidad San Francisco

de Quito. Después de dos semanas en el invernadero se determinó y comparó el porcentaje de sobrevivencia de las plantas provenientes o no de un período de estratificación previo.

Diseño experimental

El factorial 2x3x5 (temperatura, medios de cultivo y dosis hormonales) fue dispuesto en un diseño experimental de bloques completos al azar (DBCA). El factor temperatura (4°C y 18°C) constituyó los bloques, y en ellos se distribuyeron los medios de cultivo MS [11] 1/2MS, WP [12] y las concentraciones hormonales (ausencia de hormonas, BAP 0.5ppm, BAP 1ppm, BAP 4ppm+ IAA 0.5ppm y BAP4ppm + IBA 0.5ppm) que fueron seleccionadas en base a estudios previamente reportados [13]. Para cada uno de los tratamientos se sembró 20 semillas y el ensayo se realizó por triplicado.

Análisis estadístico

Los datos de porcentajes de germinación de embriones fueron corregidos usando una transformación angular (arco sin(x)) y después se realizó un análisis de varianza (ANOVA). Las diferencias entre los valores promedio de los tratamientos se analizaron con el método diferencia mínima significativa (LSD) ($p < 0,001$) usando el programa Statgraphics Centurion Program. Para los datos de crecimiento de las plántulas se calculó promedios y desviación estándar.

Resultados

Germinación de embriones de durazno var. Diamante

El porcentaje de germinación de embriones de durazno fue influenciado significativamente por dos (temperatura y medios de cultivo) de los tres factores evaluados, así como por su interacción ($p < 0,001$) (Tabla 1, Figura 1a). En relación a la temperatura, al tratamiento a 4°C le correspondió un promedio de 69 % de germinación contra 50 % del tratamiento a 18°C. En cuanto a los medios de cultivo el porcentaje más alto se obtuvo con el medio $\frac{1}{2}$ MS (71 % vs 60 % y 47 % del MS y WP respectivamente). La mejor interacción fue la estratificación a 4°C combinada con el medio 1/2MS (84 % germinación, $p < 0,001$). Por otro lado, la adición de hormonas no influyó diferencialmente en la germinación.

El resultado obtenido en el presente estudio es congruente con lo reportado en la literatura. La superioridad del medio 1/2MS sobre los otros ensayos está relacionada con la menor concentración de sales del primero que ya se había reportado previamente como favorable para la germinación de embriones de durazno alcanzando un porcentaje de germinación de hasta un 90 % [14].

En cuanto a la estratificación (tratamiento a 4°C), su impacto positivo en la germinación también ha sido previamente mencionado. Las semillas de durazno, como de muchas otras especies del género *Prunus* acumulan

| Factor | %Germinación±S.E |
|---------------------------|------------------|
| Temperatura | |
| 18°C | 50.32 ± 2.95b |
| 4°C | 60.17 ± 2.95a |
| Medios de Cultivo | |
| $\frac{1}{2}$ MS | 71.63 ± 3.61a |
| MS | 60.37 ± 3.61b |
| WP | 47.23 ± 3.61c |
| Hormonas | |
| BAP 0.5 mg/L | 60.38 ± 4.66 |
| BAP 1 mg/L | 56.37 ± 4.66 |
| BAP 4 mg/L + IAA 0.5 mg/L | 65.75 ± 4.66 |
| BAP 4 mg/L + IBA 0.5 mg/L | 65.95 ± 4.66 |
| Ausencia de hormonas | 50.26 ± 4.66 |

Tabla 1: Porcentaje de germinación de embriones maduros de durazno variedad Diamante bajo la influencia de los tres factores ensayados: temperatura, medios de cultivo y hormonas

grandes cantidades de ácido abscísico (ABA) en la cubierta seminal, cotiledones y en el mismo embrión, principalmente durante la última etapa del desarrollo de la semilla [15]. Por esta razón, las semillas requieren un período de frío de entre 10 a 12 semanas para romper la dormancia y permitir la germinación, período en el cual se sintetiza ácido giberélico (GA) que promueve e incrementa la actividad enzimática en el embrión, mientras que la concentración de ABA se reduce [8]. El retiro de la testa permite reducir significativamente el período de frío requerido debido a que se remueve una buena parte del ácido abscísico acumulado; además esta estructura tiene una acción reguladora sobre la germinación de modo que al ser eliminada, factores químicos y fisiológicos activan el proceso [8]. En varios estudios previos se ha reportado la estratificación como un paso clave para la germinación de durazno [13, 16, 17].

Pese a que no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos con y sin reguladores de crecimiento si se pudo identificar porcentajes de germinación ligeramente mayores en los tratamientos con hormonas en comparación con los sin hormonas tanto en las plantas con y sin estratificación (Tabla 1). Previamente se ha reportado como favorable la presencia de citoquininas en la germinación de embriones de durazno debido a que concentraciones moderadas de estas hormonas (0.5-1mg/L) promueven la división celular, contrarrestan el efecto de dormancia provocado por el ácido abscísico y de esta manera aceleran la germinación de la semilla [7, 13, 14].

La germinación de embriones híbridos (var. Diamante x var. Florida), fue exitosa utilizando medio MS con la mitad de la concentración de sales y sometiendo a los embriones a un período de estratificación a 4°C por 40 días. El porcentaje de germinación obtenido fue del 61 %; a pesar de que este porcentaje es menor al de los embriones var. Diamante, se pudo comprobar que el protocolo estandarizado puede ser utilizado para híbridos generados en programas de mejoramiento.

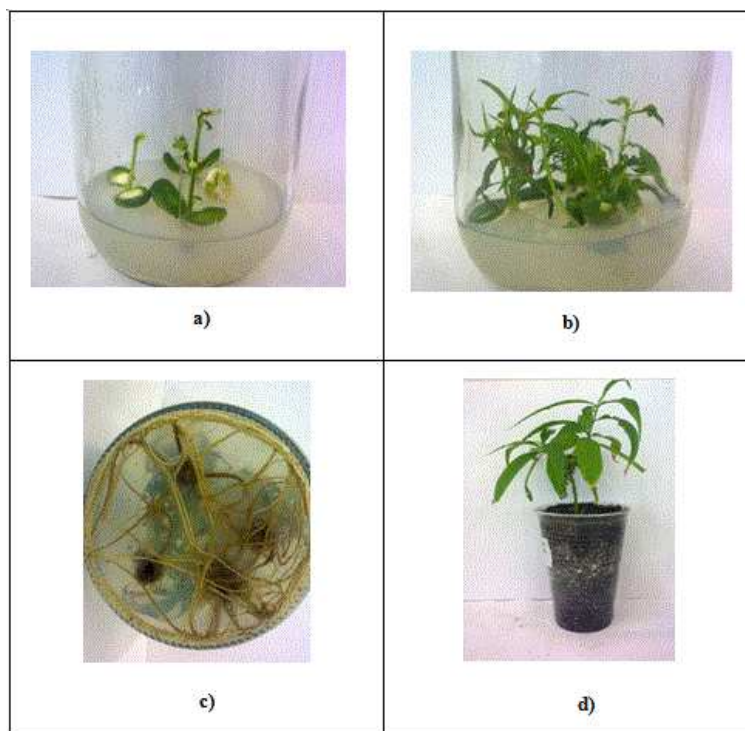


Figura 1: Cultivo in vitro de embriones maduros de durazno: a) Germinación de embriones de durazno var. Diamante en medio MS sin hormonas después de un período de estratificación a 4°C por 40 días, b) Crecimiento de plántulas del durazno var. diamante. Aproximadamente 4 semanas después de su germinación, c) Enraizamiento de retoños de durazno después del tratamiento con 3mg/L de IBA por 16 días, d) Aclimatación de plantas de durazno var. Diamante (planta a las 5 semanas de aclimatación).

Desarrollo de Plántulas

En cuanto a las condiciones de crecimiento de las plántulas, no se encontró un tratamiento que favorezca los tres parámetros medidos: número de hojas, número de raíces y altura de tallo (Figura 1b). El mayor número de raíces principales por plántula se obtuvo a partir de tratamiento de estratificación a 4°C en medio MS + BAP 1mg/L (promedio 2.4 raíces). En cuanto al número de hojas el tratamiento más favorable fue estratificación a 4°C en medio AM + BAP 4mg/L + IBA 0.5mg/L (promedio 10 hojas). Para la altura del tallo, el mejor tratamiento fue estratificación a 4°C en medio AM + BAP 1mg/L (promedio 2.9cm). Pese a que no se observó un solo medio que significativamente favorezca el crecimiento de plántulas, se pudo comprobar que concentraciones altas de citoquininas (>1mg/L) y bajas de auxinas (<0.5mg/L) estimularon el desarrollo de mayor número de hojas pequeñas, pero inhibieron la iniciación radicular tal como ha sido previamente reportado para durazno [13].

Enraizamiento de plántulas.

El proceso de enraizamiento de retoños fue exitoso en los dos tratamientos ensayados. En la siembra de plántulas en medio suplementado con 3mg/L de IBA por ocho días se obtuvo un porcentaje de enraizamiento del 83 % y en el tratamiento por 16 días el porcentaje fue del 100 % (Figura 1c). La diferencia entre ambos tratamientos fue significativa ($p < 0.05$). Adicionalmente, las raíces formadas en el tratamiento de 16 días fueron más

gruesas y largas en comparación con el tratamiento de 8 días. En ambos casos se observó la formación de callo en la base de los explantes. Este reporte es congruente con el previamente reportado por Kalinina y Brown (2007) quienes también probaron enraizamiento utilizando 3mg/L de IBA en períodos de 4 a 28 días obteniendo los mejores resultados en tiempos cortos de cultivo en presencia de la hormona (4-8 días) [18].

Aclimatación.

La sobrevivencia de las plantas sometidas al proceso de aclimatación varió dependiendo de si los embriones de los que provenían tuvieron o no un tratamiento de estratificación a 4°C. Así, el porcentaje de sobrevivencia de las plantas que provenían de embriones sometidos a estratificación fue del 80 %, mientras que las que provenían de embriones no estratificados fue del 50 % (Figura 1d). En las primeras etapas de aclimatación se pudo observar arrosetamiento de las plantas provenientes de ambos tratamientos, dicho arrosetamiento estuvo caracterizado por la presencia de entrenudos cortos en los cuales las hojas crecían unas sobre otras y fue predominante en plantas que no pasaron por estratificación (50 % de plantas sin estratificación presentaron este fenotipo, en comparación con el 33 % de las plantas que provenían del tratamiento de estratificación). Aproximadamente un mes después de la aclimatación, el tallo principal y los brotes laterales presentaban ya un crecimiento normal y el arrosetamiento desapareció. La sobrevivencia alcanzada en este estudio puede ser considerada aceptable en comparación con otros estudios

previos de cultivo in vitro de durazno [19]. En cuanto al arrosamiento, constituye también un fenómeno común en la aclimatación de durazno y se piensa que su causa es la existencia de concentraciones elevadas de ABA en las plántulas que inhibe el desarrollo correcto del tallo; a medida que la planta crece, la producción de otras hormonas contrarresta los efectos del ABA [7, 8]. Se ha reportado también que la estratificación al contrarrestar el efecto del ABA, disminuye el arrosamiento de las plantas aclimatadas [20].

Conclusiones

Se pudo determinar que las mejores condiciones para la germinación de embriones maduros de durazno variedad Diamante son la siembra en medio de cultivo $\frac{1}{2}$ MS sin hormonas y un período de estratificación de 40 días a 4°C, condiciones en las que se obtuvo un porcentaje de germinación del 84 %. La adición de concentraciones altas de citoquininas (>1mg/L) y bajas de auxinas (<0.5mg/L) dio lugar al desarrollo de las plántulas con mayor número de hojas. En estas condiciones las plántulas germinadas no tienen un desarrollo de raíces óptimo por lo que dicho enraizamiento se logró mediante un subcultivo en medio MS con 3mg/L de IBA por 16 días. Finalmente, en la aclimatación se obtuvo una supervivencia de plantas provenientes del tratamiento de estratificación del 80 % utilizando un sustrato turba/vermiculita 1:1. La eficiencia de este protocolo pudo ser trasladada a los híbridos resultantes de los cruzamientos entre duraznos var. Diamante x var. Florida alcanzando un porcentaje de germinación de embriones del 61 %.

Agradecimientos

Los autores agradecen a Daniel Palacios por la edición del resumen en inglés, y a todo el equipo de investigación del Laboratorio de Biotecnología Vegetal.

Referencias

- [1] Layne, D.; Bassi, A. 2008. "The peach: Botany, production and uses". Biddles: King's Lynn CAB International: Cambridge, MA. USA.
- [2] FAOSTAT 2012. "Índice anual de producción de frutas, durazno", Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. Enlace: [http : //faostat.fao.org/DesktopDefault.aspx](http://faostat.fao.org/DesktopDefault.aspx) Consultado: 30-11-2012.
- [3] SIGAGRO 2010. Ministerio de agricultura, ganadería, acuicultura y pesca. MAGAP.
- [4] Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias. 1992. "El cultivo del duraznero en las zonas altas del Ecuador", Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias. Manual No. 23. Programa de Fruticultura.
- [5] Bridgen, M. 1994. "A review of plant embryo culture". *HortScience*. 29: 11.
- [6] Pierik, M. 1987. "In vitro culture of higher plants". *Martinus Nijhoff. Dordrecht*. 139-148.
- [7] Lipe, N.; Crane, J. 1996. "Dormancy regulation in peach seeds". *Science*. 153: 541-542.
- [8] Cetinbas, M.; Koyuncu, F. 2006. "Improving germination of *Prunus avium* l. Seeds by gibberellic acid, potassium nitrate and thiourea". *Hort. Sci*. 33: 119-123.
- [9] Kuden, A.; Tanriver, E.; Gulen, H.; Buyukalaca, S. 1998. "Embryo rescue of peach hybrids". *Acta Hort*.
- [10] Serrano, P. 2005. "Transformación genética del albaricoquero (*Prunus americana* L.), mediada por agrobacterium, y regeneración de plantas transformadas". *Universidad de Murcia, Departamento de Biología Vegetal*.
- [11] Murashige, T.; Skoog, F. 1962. "A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures". *Physiol. Plant*. 15: 1026-1027.
- [12] Lloyd, G.; McCown, B. 1980. "Commercially feasible micropropagation of mountain laurel *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture". *Comb. Proc. Intl. Plant. Prop. Soc.* 30: 421-427.
- [13] Jeengol, N.; Boonprakob, U. 2004. "Rescue of peach embryo in culture media with additional of 6-bezylademine and gibberellic acid". *Nat. Sci*. 38: 468-474.
- [14] Liu, W. 2007. "Interespecific hybridation of *Prunus persica* with *P. americana* and *P. salicina* using embryo rescue". *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 289-299.
- [15] Piagessi, A. 1991. "Level of abscisic acid in integuments, nucellus, endosperm and embryo of peach seeds (*Prunus persica* l. cv springcrest) during development". *Plant Physiology*. 97: 793-797.
- [16] Anderson, N. 2002. "Cooler temperature during germination improves the survival of embryo cultured peach seed". *HortScience*. 32: 402-403.
- [17] Kukharchyk, N. and Kastrickaya, M. 2005. "Embryo rescue techniques in *Prunus* L. breeding". *Journal of Fruit and Ornamental Plant Research*. 14: 129-145.
- [18] Kalinina, A. and Brown, C. 2007. "Micropropagation of ornamental *Prunus* spp. and gf305 peach, a *Prunus* viral indicator". *Plant Cell Report*. 26: 927-935.
- [19] Parada Ponce D.; Villegas Monter A. 2009. "Propagación in vitro del híbrido almendrox durazno H1". *Revista Fitotecnia Mexicana*. 32: 103-109.
- [20] Moore, J.; Janick, J. 1993. "Avances en la genotecnia de frutales", México. AGT Editor.