

Universidad San Francisco de Quito

Efecto de la Temperatura, Medios Nutritivos y Reguladores de Crecimiento
en la Germinación de Embriones Cigóticos de Durazno *Prunus persica* var.
Diamante.

Homero Arteaga

Tesis de grado presentada como requisito para la obtención del título de Ingeniería en
Procesos Biotecnológicos

Quito, 2009

Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

HOJA DE APROBACIÓN DE TESIS

Efecto de la Temperatura, Medios Nutritivos y Reguladores de Crecimiento en la Germinación de Embriones Cigóticos de Durazno *Prunus persica* var. Diamante.

Luís Homero Arteaga Cholango

María de Lourdes Torres, Ph.D.

Director de Tesis y Miembro del Comité de Tesis

Venancio Arana, Ph.D.

Miembro del Comité de Tesis

José Tobar, M.Sc.

Miembro del Comité de Tesis

Decanato de Ciencias Biológicas y Ambientales

Stella de la Torre, Ph.D.

Decana del Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

Quito, diciembre 2009

© Derechos de autor

Luis Homero Arteaga Cholango

2009

Agradecimientos

Quiero expresar mi gratitud a todas las personas que hicieron posible la realización de este proyecto, de forma muy especial a María de Lourdes Torres y Venancio Arahana, por el conocimiento que me han transmitido a lo largo de mis estudios, también por sus sabios consejos, por el aliento y las reprimendas, que permitieron formarme tanto en la parte profesional como la humana.

Mi más sentido agradecimiento a mi familia: mis padres y mis hermanos que con su palabra de aliento y esfuerzo de todos los días permitieron que no descuide mis estudios, ahora puedo decir “objetivo cumplido”.

DEDICATORIA

A mis padres, por su amor, comprensión y sacrificio.
Por la confianza que me dieron y que no fue defraudada.

Resumen

En esta investigación se evaluó los efectos de la temperatura, medios de cultivo y reguladores de crecimiento sobre la germinación de embriones cigóticos de durazno var. Diamante. Los resultados de germinación mostraron diferencias significativas ($p < 0,001$) entre las temperaturas 4° y 18°C . Embriones cultivados in vitro con un pretratamiento de frío (4°C) por 40 días en medio AM suplementado con 1mgL^{-1} de BAP presentaron 84% de germinación, mientras que embriones cultivados sin pretratamiento de frío (18°C) presentaron 50% de germinación. No hubo diferencias significativas de interacción entre las variables Temperatura x Hormonas, ni Medios Nutritivos x Hormonas ($p > 0,05$). Los resultados sobre características de las plantas como número de raíces, hojas y altura del tallo mostraron los mayores promedios cuando crecieron en medio AM suplementado con 1mgL^{-1} de BAP con tratamiento de frío.

Los tratamientos de enraizamiento no mostraron diferencias significativas ($p > 0,05$) basado en el número de raíces por retoño. Sin embargo, los retoños cultivados en medio MS suplementado con 3mgL^{-1} de IBA por 16 días presentaron raíces más grandes y gruesas comparado con el tratamiento por 8 días bajo las condiciones mencionadas. Los resultados de aclimatación mostraron un porcentaje de sobrevivencia del 80%. Finalmente, el mejor tratamiento de germinación de embriones fue seleccionado y usado para germinar embriones resultantes de los cruces entre las variedades de durazno Diamante y Florida, dando un promedio de germinación del 61%.

Abstract

This research analyzed temperature, culture media and plant growth regulators in zygotic embryo germination of peach var. Diamante. The germination results showed significant differences ($p < 0,001$) between temperatures (4°C and 18°C). Embryos cultured in vitro with a cold treatment (4°C) for 40 days in AM medium supplemented with 1mg/L BAP showed 84% germination, while embryos cultured without cold treatment showed 50% germination. There was not a significant effect between temperature x plant growth regulators or culture medium x plant growth regulators ($p > 0.05$). Additionally root number, number of leaves and shoot height showed the highest averages when seedlings grew in AM supplemented with 1mgL^{-1} BAP and cold treatment.

There were not differences between rooting treatments ($p > 0,05$) based on seedlings root number; however, seedlings cultured in MS medium with 3mgL^{-1} IBA for 16 days showed longer and thicker roots compared to those roots cultured under the same conditions for 8 days. Acclimatization results demonstrated a survival rate of 80%. Finally, the most effective treatment for embryo germination was selected and used to germinate embryos from crosses between Diamante x Florida peach cultivars, obtaining germination average of 61%.

Tabla de contenido

	Tabla de
contenido.....	1
	1.
Introducción.....	4
1.1. <i>El durazno Prunus persica Generalidades.....</i>	4
1.1.1. <i>Origen y Desarrollo Inicial.....</i>	4
1.1.2. <i>Oferta mundial del durazno Prunus pérsica.....</i>	5
1.1.3. <i>Clasificación taxonómica del durazno Prunus persica.....</i>	5
1.1.4. <i>Características morfológicas del durazno Prunus persica (L.) Batsch....</i>	6
1.2. <i>El Durazno en el Ecuador.....</i>	6
1.3. <i>Programas de Mejoramiento Genético del Durazno.....</i>	7
1.3.1. <i>Limitaciones de la mejora clásica y el mejoramiento moderno.....</i>	8
1.4. <i>Cultivo in vitro.....</i>	9
1.4.1. <i>Cultivo de embriones.....</i>	10
1.4.1.1. <i>Cultivo de embriones maduros.....</i>	10
1.4.1.2. <i>Cultivo de embriones inmaduros.....</i>	11
1.4.1.3. <i>Factores que afectan el cultivo de embriones.....</i>	11
1.4.1.4. <i>Aplicaciones prácticas del cultivo de embriones.....</i>	12
1.4.2. <i>Investigaciones realizadas en cultivos de embriones en durazno.....</i>	13
	2. Objetivo
General.....	15
	3. Objetivos
Específicos.....	15

	4.
Justificación.....	.16
	5. Área de
estudio.....	18
	6.
Materiales.....	18
6.1. Material Vegetal.....	18
6.2. Liberación del cuesco y Desinfección de las semillas.....	18
6.3 Medios de cultivo utilizados para el cultivo de embriones de durazno.....	18
6.3.1 Reguladores de crecimiento utilizados.....	19
6.4 Medios de enraizamiento.....	9
6.5 Tratamiento de frío.....	19
6.6 Aclimatación.....	19
6.7 Emasculación y Polinización.....	20
	7.
Metodología.....	20
7.1. Diseño del experimento.....	20
7.2. Obtención de semillas de durazno variedad diamante.....	20
7.2.1. Desinfección de semillas de durazno.....	21
7.2.2. Siembra y germinación se embriones de durazno.....	21
7.3. Enraizamiento In vitro.....	22
7.4. Aclimatación.....	22
7.5. Cruces Variedad Diamante x Variedad Florida y Viceversa.....	23

7.5.1. Colección de polen.....	24
7.5.2. Emasculación.....	24
7.5.3. Polinización.....	24
7.5.4. Siembra y germinación de embriones de durazno obtenidos de los cruces realizados.....	25
7.6. Análisis de Datos.....	25
8. Resultados.....	..26
8.1. Colecta y siembra de semillas de durazno var. Diamante.....	26
8.1.1. Germinación de semillas de durazno var. Diamante.....	26
8.2. Enraizamiento de explantes.....	27
8.3. Aclimatación.....	28
8.4. Germinación de los cruces de variedades Diamante x Florida.....	28
9. Discusión.....	.29
9.1. Germinación de embriones de durazno var. Diamante.....	29
9.2. Enraizamiento de explantes.....	33
9.3. Aclimatación de embriones var. Diamante.....	34
9.4. Cultivo de embriones de los cruces variedades Diamante x Florida.....	34
10. Conclusiones y	
Recomendaciones.....	35
10.1. Conclusiones.....	35
10.2. Recomendaciones.....	37
11. Bibliografía.....	38

12. Tablas.....	...41
13. Figuras.....	.50
14. Anexos.....	63

1. Introducción

1.1. Características del durazno, *Prunus persica*

1.1.1. Origen y Desarrollo Inicial

El centro de origen y diversidad del durazno, *Prunus persica*, es China. Hendrick (1917) en sus viajes a China observó que en varias provincias crecían duraznos en forma silvestre con distintas características. Según uno de los principios de Vavilov's, una especie presenta su mayor variabilidad en su centro de origen. Sin embargo, los primeros escritos griegos afirman que el durazno vino de Persia al Mediterráneo, el nombre *Prunus persica* aparentemente se debe al lugar de donde migró (Moore, 1993).

Los romanos se encargaron de dispersar este frutal por todos sus dominios. Las primeras plantaciones de durazno provenían a partir de semillas y la técnica del injerto por varetta y yema era dominada por éstos. Así es como se pudo introducir de forma fácil y simple al durazno a zonas del norte de África y países de Europa como España, Francia e

Inglaterra. En los siglos XVI y XVII, la exploración y colonización fue acompañada de una distribución de plantas hacia las colonias. Los españoles introdujeron al durazno en el continente Americano en 1565, los indígenas del norte lo difundieron por todo el Sur, Sureste y Este de lo que actualmente es Estados Unidos y de igual manera los portugueses en la parte del actual Brasil (Moore, 1993).

El durazno es una de las especias frutales que más se ha distribuido y adaptado a una diversidad de zonas climáticas, pero su mayor producción se localiza entre las latitudes 30° y 45° Norte y Sur. Existen cientos de variedades comerciales que se cultivan alrededor del mundo. Una característica especial de los caducifolios y especialmente del durazno es la necesidad de horas frío, es decir deben cumplir con un cierto número de horas por debajo de los 7°C para defoliarse y florecer normalmente. Por lo general los requerimientos de frío van desde 350 a 1100 horas frío, aunque esto depende de si la variedad es de bajo, medio o alto requerimiento de frío (Moore, 1993).

1.1.2. Oferta mundial del durazno *Prunus persica*

El cultivo y comercio de esta fruta es amplio, relacionado con una gran actividad económica en las zonas templadas donde se concentra la mayor producción de las variedades. El consumo de esta fruta se da en fresco o productos industrializados como jugos, mermeladas y/o conservas (Moore, 1993).

La producción de durazno en el mundo asciende a $15,6 \times 10^6$ toneladas métricas. China es el primer productor mundial con 8 millones de Tm por año, seguido por Italia con 1,7 millones de Tm, en tercer lugar se encuentra España con una producción anual de 1,16 millones de Tm, seguido en cuarto lugar por Estados Unidos con 1,0 millón de Tm. Países como Argentina, Chile y Brasil se encuentran dentro de los primeros veinte productores

mundiales de esta fruta con $2,7 \times 10^5$ Tm, $1,8 \times 10^5$ Tm y $1,8 \times 10^5$ Tm, respectivamente (FAOSTAT 2007).

1.1.3. Clasificación taxonómica del durazno *Prunus persica*

El durazno pertenece a la familia *Rosaceae*, subfamilia *Prunoidea*, género *Prunus* L. y subgénero *Amygdalus*. Todos los cultivares modernos pertenecen a *Prunus persica*(L.) Batsch. El número cromosómico es $2n = 16$ y posee de 265 a 295 mil pares de bases en un genoma haploide (Moore, 1993).

1.1.4. Características morfológicas del durazno *Prunus persica* (L.)

Batsch.

El durazno, es un árbol caducifolio, de porte erecto, puede alcanzar hasta los 6 m de altura. Presenta un tronco robusto y de madera fuerte con color gris hasta rojiza. Presenta hojas de color verde claro, alargadas y de forma lanceolada, aserradas o doblemente dentadas. Las flores se localizan en racimos, se caracterizan por ser pentámeras, generalmente de color rosado. Presenta numerosos estambres y son hermafroditas. El fruto es una drupa de forma globosa con exocarpo liso o pubescente, el mesocarpo es dulce, duro o blando, de color blanco y de amarillo hasta rojizo. El mesocarpo puede o no estar adherido al endocarpo, el cual está lignificado. La semilla presenta color marrón y los cotiledones son blancos (Agustí, 2004).

1.2.El Durazno en el Ecuador

Ecuador se ubica en el puesto 51 en la lista de 70 países que producen durazno y nectarinas con 7200 Tm, anuales. La producción de durazno se ubica por debajo de de la producción de manzanas. Los rendimientos a nivel nacional son reducidos y no satisface la

creciente demanda de la población y la industria. El duraznero ha sido cultivado en los valles altos de la Sierra desde la colonia, siendo su cultivo muy rudimentario sin una tecnología de manejo. Sin embargo, en la década de los ochenta el Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP) a través del Programa de Fruticultura y el apoyo de la Cooperación Técnica Suiza (COTESU), realizó varias investigaciones en este frutal con el objetivo de adoptar nuevas tecnologías y aumentar la eficiencia en la producción del duraznero en el Ecuador (INIAP, 1993).

El cultivo del durazno se localiza en las provincias de: Azuay, Tungurahua, Chimborazo, Cotopaxi, Loja y en algunas localidades en las provincias del norte Imbabura (Pimampiro, Cotacachi e Ibarra) y Mira en la provincia del Carchi con altitudes que varían desde los 2000 hasta los 3000 msnm (INIAP, 1993).

Los climas abrigados o templados son los óptimos para su desarrollo, ya que necesita de abundante luz y calor durante la maduración del fruto, aunque es importante destacar que para la formación de yemas florales es necesario que exista una acumulación de horas frío bajo los 7°C. Muchas veces la falta de horas frío se compensa con inductores de floración como el Dórmex. Los cambios bruscos de temperatura, lluvias frecuentes y las granizadas son perjudiciales para la floración y de igual forma durante el desarrollo del fruto. Los suelos donde se adapta mejor el duraznero son ligeros, profundos, blandos, de naturaleza arenosa y calcárea (INIAP, 1993).

Las variedades que se cultivan en las fincas ecuatorianas son las denominadas “criollas”, las cuales se caracterizan por desarrollarse con pocas exigencias tanto nutricionales como de manejo agronómico comparado con las variedades élite provenientes de otros lugares. En el Ecuador se cultivan las siguientes variedades de

durazno: Diamante, Conservero amarillo, Chagrahuay tambo, Puka Shungo, Tajón, Fortuna, Zapallo, Abridor amarillo y Sungold (INIAP, 1993)

1.3. Programas de Mejoramiento Genético del Durazno

Desde el siglo XVII hasta el XIX hubo un mejoramiento incipiente del durazno. Sin embargo, la era moderna del mejoramiento del durazno se dio en Estados Unidos con la implementación de programas estatales (los de New York, Iowa, Illinois, California, Massachusetts, Michigan, Virginia, Carolina del Norte, Louisiana, Texas y Florida) en las primeras décadas del siglo XX, al igual que en las estaciones canadienses de Vineland y Harrow. Por otro lado, en Europa programas de gran importancia fueron los de Italia y España, también países como Sudáfrica, Australia y Brasil han creado programas de mejoramiento genético en el durazno (Byrne, 1988).

Después de aprobarse la Ley de Patentes Vegetales en Estados Unidos en 1930, nacieron programas de mejoramiento del durazno y nectarinas en el ámbito privado. Entre los más importantes están: los programas de Grand Merrill, F. W. Anderson y el de la compañía de Viveros Armstrong desde 1930. Estos programas de mejoramiento tanto públicos como privados, se encargaron de generar información relacionada con la resistencia a heladas del árbol, dormancia de las yemas vegetativas y florales, horas frío necesarias para florecer, entre los más importantes. Como resultado de este esfuerzo intensivo, los cultivares de origen norteamericano han ocupado posiciones de liderazgo en muchas zonas productoras del mundo y además están siendo utilizados en varios programas de fitomejoramiento en varios países (Moore, 1993).

1.3.1. Limitaciones de la mejora clásica y el mejoramiento moderno

La mayoría de variedades elite en el durazno han sido producidas por la mejora clásica utilizando la variabilidad genética disponible dentro de la especie. Sin embargo, la

obtención de variedades de durazno con características agronómicas importantes a partir de métodos tradicionales actualmente presenta varias limitantes: poca variabilidad dentro de las variedades comerciales, estados juveniles prolongados del árbol, expresión de características potencialmente importantes en estados adultos y la imposibilidad de transferir características de resistencia a enfermedades y tolerancia a estrés ambiental de especies no relacionadas. Cabe resaltar que el tiempo necesario para generar un nuevo cultivar mediante el mejoramiento clásico es de 10 a 15 años, siendo necesario para esto gran cantidad de mano de obra, espacio físico y recursos económicos (Gómez et al., 2005).

Hoy día con la suma de conocimientos sobre la herencia y genética, técnicas de cultivo *in vitro* y ADN recombinante, las limitaciones a que se enfrentaba el fitomejoramiento clásico están siendo superadas. La biotecnología moderna o también denominado mejoramiento moderno comprende un conjunto de técnicas muy poderosas (el microinjerto, la regeneración, la variación somaclonal, el cultivo de embriones y la transformación genética) que junto a la mejora clásica permitirán la obtención de variedades élite optimizando tiempo, mano de obra y recursos económicos (Gómez et al., 2005).

La principal ventaja del mejoramiento moderno es que permite transferir material genético de interés agronómico superando la barrera de especie, y permitiendo utilizar genes de gran interés que se encuentran en cualquier ser vivo. Actualmente se investiga liberar variedades de durazno que son más productivas, resistentes a herbicidas y plagas, tolerantes a estrés ambiental y un sinnúmero de otros valores fruto del mejoramiento vegetal moderno (Serrano, 2005).

1.4.Cultivo in vitro

El cultivo in vitro se utilizó por primera vez a inicios del siglo XX, y es la base del mejoramiento moderno. Éste consiste en cultivar cualquier tejido vegetal en forma aséptica y bajo condiciones controladas (nutritivas y ambientales) de laboratorio. La micropropagación a nivel industrial, el cultivo de embriones maduros e inmaduros, la regeneración, la variación somaclonal y la transformación genética no se lograría sin el cultivo in vitro (Pierik, 1987).

1.4.1. Cultivo de embriones

El cultivo de embriones, es el aislamiento y desarrollo de un embrión inmaduro o maduro in vitro y la consiguiente obtención de una plántula. Hanning (1904) fue el primero en obtener plantas viables de *Crucifera* a partir de embriones aislados y cultivados in vitro. Turkey (1933) perfeccionó el cultivo de embriones en cerezas dulces, luego de muchas investigaciones la técnica fue perfeccionándose. Ya para 1945 el cultivo de embriones fue utilizado como una herramienta muy útil para eliminar dormancia en semillas de durazno y también para obtener híbridos interespecíficos e intergenéricos en los programas de mejoramiento del durazno con mucho éxito (Pierik, 1987).

1.4.1.1. Cultivo de embriones maduros

El cultivo de embriones maduros provenientes de semillas maduras es relativamente fácil, y es utilizado para eliminar la dormancia en algunas las semillas y para acelerar e incrementar el porcentaje de germinación. En general las condiciones de cultivo no son muy estrictas, un medio nutritivo basal (agar, azúcar y minerales) suele ser suficiente; sin embargo, cuando se quiere reducir el tiempo de germinación y aumentar la eficiencia la misma se adiciona reguladores de crecimiento o varios compuestos químicos. El cultivo de embriones maduros ha sido muy utilizado en programas de mejoramiento de

durazno para generar patrones resistentes a nemátodos y tolerantes a estrés ambiental (**Lipe y Crane 1966**; Pierik, 1987; Çetinbaş y Koyuncu 2006).

1.4.1.2.Cultivo de embriones inmaduros

El cultivo de embriones inmaduros o rescate de embriones, es una técnica utilizada para evitar el aborto del embrión y recuperar una planta viable. Este tipo de cultivo es extremadamente difícil debido a que es necesario tener extremo cuidado durante la manipulación del embrión, además los requerimientos nutricionales para inducir su germinación y desarrollo son muy complejos. El éxito del cultivo de embriones inmaduros depende fuertemente del estado de desarrollo del embrión cuando es aislado (Pierik, 1987).

El cultivo de embriones inmaduros ha sido utilizado en programas de mejoramiento genético para rescatar híbridos interespecíficos e intergenéricos con características agronómicas importantes. La hibridación interespecífica e intergenérica en el durazno exige el empleo del cultivo y rescate de embriones debido las barreras postcigóticas (mal desarrollo del endospermo, aborto del embrión y caída del fruto) que se presentan (Kukharchyk y Kastrickaya, 2006).

1.4.1.3.Factores que afectan el cultivo de embriones

El éxito del rescate de embriones depende básicamente del medio de cultivo a utilizarse, el estado de desarrollo del embrión y las condiciones del cultivo.

En frutales varios medios nutritivos de tipo sólido han sido utilizados con relativo éxito, entre los más importantes están: Medio Gilmore y Monet (George et al., 1987), Medio Brooks y Hough (Scorza y Sherman, 1996). Medio para plantas leñosas (Lloyd y McCown, 1981), Medio MS y el modificado (Murashige y Skoog, 1962). Estos

presentan propiedades semejantes como pH que va de 5.0 a 6.0, la sacarosa como fuente de energía que va desde un 2 hasta el 12%, el agar que va del 0.6 a 0.8%. Muchas investigaciones reportan que la adición de reguladores de crecimiento como 6-BA (6-benzil-aminopurina), IBA (ácido indol butírico) e IAA (ácido 3-indol acético) tienen un efecto positivo en la germinación y desarrollo de embriones maduros e inmaduros, especialmente en especies del género *Prunus* (Liu, 2006; Kuden et al., 1999).

El estado de desarrollo del embrión es un factor importante en el éxito del rescate de embriones. Un embrión en estados muy tempranos de desarrollo es casi imposible que germine in vitro, pero embriones con un estado de desarrollo intermedio en adelante pueden germinar con relativa facilidad (Pierik, 1987).

Los factores ambientales como el oxígeno, la luz y la temperatura se deben tomar en cuenta durante el cultivo de embriones. Los requerimientos de oxígeno aparentemente son mayores que la concentración que existe en el aire (Monnier 1980). En cuanto a la luz, muchas veces los embriones aislados necesitan ser cultivados en oscuridad por 7 a 14 días y después ser transferidos a la luz lo que permitirá la formación de clorofila. Finalmente la temperatura óptima para el cultivo de embriones normalmente va 22 a 28 °C. Sin embargo, embriones de frutales como el durazno, la manzana y los perales requieren tratamientos previos de frío (2 y 4°C por varias semanas) para romper la dormancia y germinar (Anderson et al., 2002).

1.4.1.4. Aplicaciones prácticas del cultivo de embriones

Dentro de las aplicaciones prácticas del cultivo de embriones encontramos: Eliminar la inhibición de germinación de semillas y germinar semillas parásitas, generalmente es imposible obtener germinación in vivo, por lo que el cultivo de embriones in vitro es esencial. Acortar el ciclo de fitomejoramiento, en especies frutales donde las semillas

muestran dormancia debido a la acumulación de ácido abscísico (ABA) en sus tejidos, el remover estos tejidos y cultivar al embrión in vitro, éste presenta germinación inmediata (Pierik, 1987).

También el cultivo de embriones es empleado para la producción de haploides, por ejemplo: en los cruces de *Hordeum vulgare* x *H. bulbosum*, la fertilización ocurre, pero inmediatamente después los cromosomas de *H. bulbosum* son eliminados. Como resultado se obtiene un embrión haploide de *H. vulgare* que germina solo mediante el cultivo de embriones. Después se duplica los cromosomas y se obtiene un homocigoto de *H. vulgare*.
Prevención de aborto de embriones en frutales de hueso que presentan maduración temprana, en estos el flujo de nutrientes y agua hacia el embrión es cortado, produciéndose el aborto del mismo (Pierik, 1987).

Otra aplicación importante está destinada a evitar el aborto de embriones como resultado de incompatibilidad en cruces interespecíficos, intergenéricos y entre diploides y tetraploides. Generalmente estos cruces presentan aborto del embrión en cualquier estado de desarrollo, mal desarrollo del endospermo y caída del fruto, de ahí la importancia del cultivo de embriones. Finalmente, el cultivo de embriones es empleado en propagación vegetativa, por ejemplo los embriones de *Gramineae* y *Coniferae* son generalmente usados como una fuente de material para propagación vegetativa. El objetivo es la formación de callo y luego una inducción hacia la generación de embriones somáticos, lo cual es relativamente sencillo en estos géneros (Pierik, 1987).

1.4.2. Investigaciones realizadas en cultivo de embriones en durazno

En la actualidad se encuentra gran cantidad de trabajos sobre rescate de embriones en durazno. Embriones producto de la hibridación en cultivares de maduración temprana germinaron exitosamente en medios cultivo Brooks y Hough, Gilmore, Monet y Woody

Plant (Jeegool y Boonprakob 2004). Otros trabajos se han basado en eliminar la dormancia y estimular el desarrollo de embriones maduros e inmaduros del durazno combinando tratamientos de frío o adicionando varios compuestos químicos (citoquininas, auxinas, giberelinas, nitrato de potasio y tiourea) previos a la germinación (Tukey, 1933, Liu, et al., 2007).

Producto de estos trabajos se han obtenido cultivares híbridos interespecíficos entre durazno con almendras (*P. amygdalus*), albaricoques (*P. americana*) y ciruelas (*P. domestica*), con características importantes como tolerancia a heladas, adaptabilidad a suelos pobres y secos, menores requerimientos de frío, alta calidad de frutos entre otras. Los programas más intensivos de mejoramiento genético en durazno en países como: China, Italia, España, Estados Unidos, Japón, Turquía han empleado el cultivo y rescate de embriones como una herramienta muy útil para la obtención de nuevas variedades de durazno (Serrano, 2005).

En esta investigación se evaluó el efecto de la temperatura, medios de cultivo y concentración de reguladores de crecimiento sobre la germinación de embriones cigóticos de durazno var. Diamante. Los resultados mostraron de manera significativa que los embriones cultivados en medio AM suplementado con 1mgL^{-1} de BAP, con tratamiento de frío a 4°C por 40 días tuvieron el promedio de germinación más alto (84%). Además, se probó dos tratamientos para enraizar, obteniendo generación de raíces en ambos tratamientos. Finalmente, se aclimató plántulas provenientes del experimento de germinación teniendo un porcentaje de sobrevivencia del 80%. Este protocolo fue empleado para germinar embriones de un cruce entre las variedades de durazno Diamante x Florida, teniendo un promedio de germinación del 61%.

2. Objetivo General

Determinar el efecto de la temperatura, medios nutritivos y de reguladores de crecimiento en la germinación de embriones cigóticos de durazno *Prunus persica* var. Diamante in vitro.

3. Objetivos Específicos

- Evaluar el efecto de la interacción entre la temperatura, medios nutritivos y reguladores de crecimiento en la germinación de embriones de durazno.
- Probar concentraciones de auxinas para la inducción de raíces de retoños de durazno.
- Establecer un proceso de aclimatación para plantas generadas a partir de la germinación de embriones in vitro de durazno.
- Probar si el mejor tratamiento obtenido en la germinación de embriones de durazno es útil para germinar embriones obtenidos a partir de cruces entre las variedades de durazno Diamante x Florida.

4. Justificación

El Ecuador es un país eminentemente agrícola, posee un sinnúmero de pisos climáticos que favorecen el cultivo de una diversidad de productos agrícolas durante todo el año. Pese a las ventajas climáticas, nuestro país no se destaca por ser un gran productor agrícola especialmente en especies frutales como el durazno, la manzana y la pera. De cinco mil hectáreas de durazno que se cultivaban hasta el 2002, esta cifra se ha reducido a cerca de mil hectáreas a inicios del año 2009 (Wilson Vásquez, comunicación personal INIAP).

Los altos costos de producción, la falta de capacitación de productores sobre manejo agronómico, la falta de renovación de las variedades y el abandono por parte de las autoridades son las causas posibles que han obligado a dejar de lado la producción de esta importante fruta, obligando a su importación desde países como Chile y Estados Unidos (Duarte, 2005).

Las variedades que se cultivan en el Ecuador no han sido renovadas y por ende no pueden competir con la calidad del producto de origen chileno o americano. El mercado ecuatoriano está obligado a consumir producto importado ya sea para consumo en fresco así como procesado. La ventaja climática que posee el Ecuador sobre Chile, Estados Unidos y otros países con cuatro estaciones, más un programa intensivo de manejo agronómico y mejoramiento genético del durazno, convertiría al Ecuador en un productor importante de este frutal (Duarte, 2005).

La presencia de fruta chilena y americana en el Ecuador indica que hay una demanda interna insatisfecha, la que se podría cubrir a corto plazo mediante el incentivo de la producción de variedades élite o nuevas variedades de durazno obtenidas internamente (Duarte, 2005). La mejora clásica está limitada en la obtención de nuevas variedades debido a las barreras sexuales, la poca variabilidad dentro de los cultivares y además del

tiempo, mano de obra y dinero requerido para este fin (Gómez et al., 2005). De aquí que es indispensable la utilización de técnicas modernas de fitomejoramiento. El cultivo de embriones es empleado para rescatar embriones híbridos fruto de cruces interespecíficos y germinar embriones de variedades con bajos requerimientos de frío cultivados en el Ecuador, abriendo un abanico de posibilidades para la obtención de nuevos cultivares en el durazno.

La importancia del presente trabajo de investigación radica en que se determinó el efecto de tres variables (temperatura, medios de cultivo y reguladores de crecimiento) en la germinación de embriones cigóticos de durazno var. Diamante. Además, se probó periodos de inducción de raíces en retoños de durazno, también se estableció un proceso de aclimatación para plantas generadas a partir de la germinación de embriones in vitro de durazno. Esta investigación establece una metodología de cultivo de embriones que podrá ser utilizada en programas de mejoramiento genético del durazno en el Ecuador.

5. Área de estudio

Este proyecto se llevó a cabo en dos áreas. La colecta de semillas y las polinizaciones se llevaron a cabo en la plantación San Felipe, ubicada en la Hacienda

Conrraqui, en las inmediaciones de Ibarra (Lat. 0.35° Long. -78.11° y 2192 msnm.), mientras que los procedimientos de cultivo in vitro se los realizó en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Universidad San Francisco de Quito. Campus Cumbayá, Ecuador.

6. Materiales

6.1. Material Vegetal

Semillas de durazno de la variedad Diamante provenientes de la plantación San Felipe, ubicada en la Hacienda Conrraqui, en las inmediaciones de Ibarra.

6.2. Liberación del cuesco y desinfección de las semillas

Prensa para romper el cuesco

Solución de alcohol potable al 70%

Solución de Hipoclorito de Sodio 1,25 %

Tween 20

Cámara de flujo laminar LABCONCO *Horizontal Clean Beach*

6.3. Medios de cultivo utilizados para el cultivo de embriones de durazno

Medio MS (Murashige y Skoog, 1962) suplementado con 30gL⁻¹ de sacarosa, 7gL⁻¹ de agar, pH 5,8.

Medio AM (1/2 concentración de sales que MS) suplementado con 30gL⁻¹ de sacarosa, 7gL⁻¹ de agar, pH 5,8.

Medio WP (Lloyd y McCown, 1981) suplementado con 20gL⁻¹ de sacarosa, 6gL⁻¹ de agar, pH 5,8.

6.3.1. Reguladores de crecimiento utilizados

Benzil amino purina (BAP) 0.5, 1.0, 4.0 mgL⁻¹ (SIGMA)

Ácido indol butírico (IBA) 0.5 mgL⁻¹ (SIGMA)

Ácido 3-indol acético (IAA) 0,5 mgL⁻¹ (SIGMA)

6.4. Medio de Enraizamiento

Medio MS (Murashige y Skoog, 1962) con 30gL⁻¹ de sacarosa, 7gL⁻¹ de agar, con pH 5,8 y suplementado con 3mgL⁻¹ de IBA.

6.5. Tratamiento de Frío

Cámara de frío de la planta de alimentos de la Universidad San Francisco de Quito regulada a 4°C +- 2°C.

6.6. Aclimatación

Vasos de plástico 12 onzas

Fundas plásticas transparentes

Sustrato Vermiculita y Turba (1:1)

Fundas negras de vivero

6.7. Emasculación y Polinización

Ramas en estadio floral de las variedades Diamante y Florida

Cajas de Petri

Pinzas

Fundas de papel

7. Metodología

7.1. Diseño del Experimento

Reportes anteriores indican que un tratamiento de bajas temperaturas (4 a 6°C), medios de cultivo y reguladores de crecimiento estimulan la germinación y desarrollo de embriones de durazno. En base a lo anterior, se quiso determinar el efecto que tiene tres factores sobre la germinación de embriones de durazno, para lo cual se realizó un diseño experimental dispuesto en bloques completas al azar (DBCA). Los bloques fueron las temperaturas (4 y 18°C), medios de cultivo con tres niveles (AM, MS y WP) y concentraciones hormonales con cinco niveles (0, 0.5ppmBAP, 1ppmBAP, 4ppmBAP+0.5ppmIAA, 4ppmBAP+0.5ppmIBA). Se corrió un factorial completo 3 x 5 con tres réplicas en cada bloque (Tabla 2).

7.2. Obtención de Semillas de Durazno var. Diamante

Las semillas de durazno fueron obtenidas de frutos recién cosechados provenientes de la plantación San Felipe ubicada en la hacienda Conrraquí en la provincia de Imbabura. El mesocarpo fue removido de los frutos y se liberó las semillas, éstas fueron lavadas con agua corriente para eliminar residuos de pulpa existentes. Ya en el laboratorio con ayuda de una prensa se eliminó el endocarpo y se liberó la semilla.

7.2.1. Desinfección de semillas de durazno

Una vez liberadas las semillas, se realizó un lavado con agua destilada para eliminar pequeños residuos del endocarpo que se pudieron quedar. Se colocó las semillas en un frasco de vidrio con tapa y se llevó dentro de la cámara de flujo laminar para iniciar con la desinfección. Se agregó al frasco que contenía las semillas, 150mL de alcohol al 76%, se las mantuvo allí por 5 minutos y luego se eliminó el alcohol. A continuación se puso 150mL de hipoclorito de sodio al 1,25% por 20 minutos con agitación constante y

posteriormente se lavó las semillas con agua destilada estéril por cuatro ocasiones. Por último se hidrató las semillas desinfectadas con agua destilada estéril por veinticuatro horas (Anexo1).

7.2.2. Siembra y germinación de embriones de durazno

Después de la hidratación de las semillas y dentro de la cámara de flujo laminar, el agua fue retirada. Se procedió a eliminar la cubierta seminal con ayuda de pinzas, bisturí y papel toalla, acto seguido los embriones sin la cubierta seminal fueron sembrados en los diferentes medios nutritivos que se iban a probar (20 embriones por tratamiento). Todo el experimento fue puesto a un periodo de estratificación (4°C) por 40 días, luego del cual los frascos que contenían los embriones fueron puestos en el cuarto de cultivo (fotoperiodo 16 horas luz/8 horas oscuridad) para que puedan germinar. Una réplica del mismo experimento fue puesto directamente en el cuarto de cultivo (sin tratamiento de frío). Treinta días después de la incubación de los embriones en el cuarto de cultivo, se tomó datos sobre porcentajes de germinación y características de crecimiento de las plántulas como: número de raíces, número de hojas y altura del tallo de los dos ensayos (Anexo 2).

7.3.Enraizamiento In Vitro

Las plántulas, del experimento de germinación de embriones, que no produjeron raíces fueron sujetas a dos tratamientos de inducción de raíces. El primer tratamiento consistió en la inducción de raíces por un periodo de 8 días en medio MS basal que contenía 3mgL⁻¹ IBA, y el otro fue un periodo de inducción de raíces por 16 días en MS basal más 3mgL⁻¹ IBA. Ambos tratamientos fueron llevados en un fotoperiodo de 16 horas luz/8 horas oscuridad y una temperatura de 18 a 20°C. Luego de estos periodos de tiempo,

las plantas fueron trasplantadas a medio MS basal para que se complete la regeneración y crecimiento de las raíces en el cuarto de cultivo (Anexo 3).

7.4.Aclimatación

Después de seis semanas de germinación de los embriones de durazno en el cuarto de cultivo (fotoperiodo de 16 horas luz/8 horas oscuridad y una temperatura de 18 a 20°C), se seleccionó plántulas provenientes de semillas que fueron sometidas a estratificación y de semillas que no fueron sometidas a este periodo de frío. Se formó dos grupos, el grupo 1 con plántulas provenientes de semillas estratificadas y el grupo 2 con plántulas provenientes de semillas sin estratificación. La extracción de las plántulas del medio de cultivo y la siembra en vasos plásticos se llevó a cabo bajo condiciones asépticas dentro de la cámara de flujo laminar.

Primero, las plantas fueron extraídas del medio de cultivo con mucho cuidado, se retiró los restos de agar de las raíces con una pinza y papel absorbente estéril, se lavó las raíces de dos o tres veces con agua destilada estéril. Por último las plantas completamente libres de agar fueron puestas en vasos plásticos con sustrato estéril (vermiculita y turba 1:1), luego fueron cubiertas con fundas plásticas para no cambiar las condiciones de crecimiento in vitro de forma drástica y evitar la deshidratación. Por último las plántulas fueron puestas en el cuarto de cultivo con fotoperiodo 16 horas luz/8 horas oscuridad y 18 a 20°C.

Una vez por semana se regó las plántulas con agua potable. Luego de tres semanas de iniciado el proceso de aclimatación, las fundas que cubrían a las plántulas fueron abiertas ligeramente, una semana después se abrieron a la mitad y pasada la quinta semana se retiró la funda. Las plántulas fueron transferidas a fundas negras de vivero y puestas

dentro de un pequeño invernadero en el cuarto de cultivo por dos semanas más, finalmente las plántulas fueron llevadas al invernadero de la Universidad San Francisco de Quito donde se determinó el porcentaje de sobrevivencia en los dos grupos de estudio (Anexo 4).

7.5. Cruces Variedad Diamante x Variedad Florida y Viceversa.

Los frutos de la variedad Diamante se caracterizan por su resistencia a la degradación, mientras que los frutos de la variedad Florida son muy aceptados en el mercado por el color roja de su piel, pero su degradación es muy rápida. Se realizó cruces entre estas dos variedades con el fin de obtener embriones que podrían conjugar positivamente estas características importantes.

7.5.1. Colección de polen

El polen se colectó de flores bien desarrolladas con botón cerrado de las variedades Diamante y Florida. Se colectó las flores de ambas variedades individualmente, con una pinza se separó las anteras de las flores colocándoles en una caja de Petri y se las puso en un lugar fresco y seco hasta que las anteras liberen el polen. Una vez que se había liberado el polen, éste fue utilizado para las polinizaciones.

7.5.2. Emasculación

Las flores de las variedades Diamante y Florida que se iban a utilizar como hembras debieron estar cerradas, se seleccionó flores de ramas periféricas y ubicadas en la parte superior del árbol. Los estambres fueron eliminados con ayuda de una pinza evitando que el carpelo sea dañado. Las flores emasculadas no se protegieron porque la polinización se realizó pocas horas después.

7.5.3. Polinización

Según Moore (1993), el estigma se vuelve receptivo desde horas después de la emasculación hasta por un periodo de doce días. La receptividad del estigma se notó por la cantidad de polen que se adhería debido a la poca o mucha humedad que éste poseía. Notando la receptividad del estigma se procedió a polinizar las flores emasculadas de las dos variedades con ayuda del borrador de lápiz (el polen se adhiere fácilmente al borrador de lápiz, debido a esto, éste fue utilizado para inocular el polen en el estigma de las flores a ser polinizadas). La polinización se llevó a cabo desde la media mañana hasta las dos o tres de la tarde. Las flores polinizadas fueron protegidas con fundas de papel periódico (30cm x 13cm) sujetadas con clips, cada funda fue rotulada con la fecha de polinización y el número de flores que fueron polinizadas. Las ramas que tenían las flores polinizadas fueron marcadas con cinta amarilla. Se identificó como cruce A al que la variedad Diamante fue tomada como padre y el cruce B al que la variedad Florida fue tomada como padre.

Cada semana se observó el desarrollo de los frutos y tres meses después de la polinización los frutos fueron colectados y llevados al laboratorio de la Universidad San Francisco de Quito.

7.5.4. Siembra y germinación de embriones de durazno provenientes de los cruces realizados

Se removió el exocarpo de los frutos provenientes de ambos cruces, posteriormente se removió el endocarpo con una prensa. Una vez obtenidas las semillas, éstas siguieron el mismo procedimiento de desinfección mencionado en el punto 7.2.1. La siembra de los embriones obtenidos de los cruces se realizó de acuerdo al procedimiento mencionado en el punto 7.2.2. El tratamiento de germinación empleado fue: periodo de frío a 4°C por 40 días, seguido de una incubación de 30 días bajo condiciones del cuarto de cultivo

(fotoperiodo 16 horas/8 horas oscuridad) en Medio nutritivo AM suplementado con 1mgL⁻¹ de BAP.

7.6. Análisis de Datos

Los datos de porcentajes de germinación de embriones de la var. Diamante fueron corregidos mediante una transformación angular (*arco sin(x)*) y después analizados mediante análisis de varianza (ANOVA), las diferencias entre medias fue analizado con el método de diferencia mínima significativa (LSD) ($p < 0,001$), usando STATGRAPHICS CENTURION PROGRAM. Los parámetros de crecimiento de las plántulas fueron analizados bajo resumen estadístico, que comprende promedios y desviación estándar.

8. Resultados

8.1. Colecta y siembra de semillas de durazno var. Diamante.

Se tuvo tres colectas de semillas de durazno variedad Diamante con un promedio de 750 semillas por colecta, cada una con un intervalo de tres meses aproximadamente. De cada recolección se seleccionó y utilizó 600 semillas para cada réplica del experimento (Tabla 1). El diseño del experimento se muestra en la Tabla 2.

8.1.1. Germinación de semillas de durazno var. Diamante

El porcentaje promedio de germinación en todos los tratamientos varió entre el 36 y el 84%, (Tabla 3). El análisis de varianza (Tabla 4), muestra los efectos principales y la interacción entre los factores. La temperatura tiene un efecto significativo sobre el porcentaje de germinación en semillas de durazno con un promedio de 50 y 70% en 18 y

4°C respectivamente ($p < 0,001$). También se observó que los medios de cultivo utilizados tienen un efecto significativo sobre el porcentaje de germinación con promedios que varió del 47 al 71% ($p < 0,001$) (ver Figuras 1 y 2). El efecto de las hormonas no fue significativo ya que se mantuvo promedios de germinación entre el 50 y 66 % en cada concentración de hormonas ($p > 0,05$).

Se encontró que hay un efecto de interacción positivo entre el factor temperatura y medios de cultivo ($p < 0,001$) (Tabla 4). El efecto de interacción se puede ver en las Figuras 3 y 4, cuando se pasa de 18°C a 4°C hay un aumento notable en el promedio de germinación para cada uno de los niveles del factor medios de cultivo, aunque la proporción de cambio no es igual para cada nivel de medios. La interacción entre 4°C y AM es la más fuerte, incrementando el porcentaje promedio de germinación del 60 al 84%.

La interacción entre temperatura y hormonas no fue estadísticamente significativa al igual que la interacción entre medios y hormonas ($p > 0,05$) (Tabla 4 y Figuras 5 y 6).

Se encontró que las plántulas provenientes de embriones de durazno germinados en los medios de cultivo AM y MS suplementados con $0,5\text{mgL}^{-1}$ de BAP y 1mgL^{-1} de BAP y que fueron puestos a 4°C produjeron mayor número de raíces principales por plántula (2 y 2,4 raíces) respectivamente comparado con el promedio de raíces en las plántulas obtenidas a 18°C (1,5 raíces). El promedio más alto en cuanto al número de hojas fue para el tratamiento AM suplementado con 4mgL^{-1} de BAP + $0,5\text{mgL}^{-1}$ IBA con tratamiento de 4°C. El promedio de mayor longitud del tallo se obtuvo con el tratamiento en medio AM suplementado con 1mgL^{-1} de BAP (2,9 cm) (Tabla 5).

8.2.Enraizamiento de retoños

Se encontró que tanto el tratamiento de inducción de raíces por ocho días y dieciséis días en medio MS suplementado con 3mgL^{-1} de IBA presentaron regeneración de raíces en un

83 y 100% respectivamente, con 4,6 y 5,5 raíces por explante (Tabla 6). Estadísticamente la diferencia en el promedio de raíces que se obtuvo en cada tratamiento fue significativo ($p>0,05$) (Tabla 7). Sin embargo, visualmente se notó que el tratamiento de inducción de raíces por 16 días produjo raíces más gruesas y largas comparado con el tratamiento de inducción de raíces por 8 días, también se presentó la formación de callo en la base de los explantes en pequeña cantidad en ambos tratamientos (Figuras 9, 10 y 11).

8.3.Aclimatación

8.3.1. Aclimatación de plántulas de durazno var Diamante provenientes del ensayo de germinación

El grupo 1 (plantas provenientes de embriones sometidos a 4°C) presentó un porcentaje de sobrevivencia del 80%, mientras que el grupo 2 (plantas provenientes de embriones sin tratamiento de frío) presentó una sobrevivencia del 50 % (Tabla 8 y Figuras 13 y 14). En las primeras etapas de aclimatación se observó que tanto el grupo 1 como el 2 presentaron plántulas arrosadas, pero en diferente proporción siendo el grupo 2 donde se presentó mayor número de plantas con esta característica (50%) comparado al grupo 1 (33%) (Figura 12). Este fenómeno estuvo caracterizado por entrenudos cortos en donde las hojas crecían unas sobre otras. Aproximadamente un mes después de aclimatación, el arrosamiento empezó a desaparecer ya que el tallo principal o uno de los brotes laterales iniciaban un crecimiento normal, con entrenudos largos y crecimiento rápido. En cuanto a la aclimatación de embriones híbridos, se tuvo un 80% de sobrevivencia y un

arrosetamiento del 30 %, que igualmente fue perdiéndose conforme avanzó el proceso de aclimatación.

8.4. Germinación de Embriones Provenientes de los Cruces Diamante x Florida

De los cruces Diamante x Florida (cruce A) y Florida x Diamante (cruce B) realizados se obtuvo 35 y 25 frutos, teniendo un éxito de polinización del 14 y 7 por ciento respectivamente (Tablas 9 y 10). Luego de ser sometidos los embriones a un periodo de estratificación (40 días a 4°C en medio AM suplementado con 1ppmBAP) y posteriormente a condiciones del cuarto de cultivo (fotoperiodo 16h luz/8h oscuridad y de 18 a 20°C) para su germinación, se obtuvo para el cruce A un 72% de germinación y para el cruce B 50% (Tabla 11 y Figuras 7 y 8).

9. Discusión

9.1. Germinación de Embriones de Durazno var. Diamante

La diferencia significativa que se encontró en la germinación de embriones de durazno, a 4°C (70%) y a 18°C (50%), muestra que un tratamiento de frío sobre éstos incrementa el porcentaje de germinación. Reportes anteriores demuestran que la mayoría de semillas de especies del género *Prunus* entran en un periodo de dormancia luego de que éstas son cosechadas. Piaggessi, et al., (1991) encontraron que durante el desarrollo de las semillas de durazno, éstas acumulan ácido abscísico (ABA) en sus tejidos (en cubierta seminal o testa, en cotiledones e incluso en el mismo embrión) y que aumenta la concentración en la última etapa de desarrollo de la semilla. Normalmente las semillas de durazno (*Prunus pérsica*) requieren un periodo de frío de entre 10 y 12 semanas para romper la dormancia y permitir la germinación (Tukey, 1933), en este periodo el embrión sintetiza instantáneamente ácido geberélico (GA), el cual promueve e incrementa la

actividad enzimática en el embrión, mientras que la concentración de ABA en los tejidos de la semilla se reduce, permitiendo el inicio de la germinación (Çetinbaş y Koyuncu, 2006).

Anderson, et al. (2002) obtuvieron un promedio de germinación del 97% utilizando semillas de durazno var. Diamante desprovistas de la cubierta seminal cuando éstas fueron sometidas por 45 días a 5°C, mientras que en la presente investigación se obtuvo un resultado similar (84%) con embriones de la misma variedad desprovistos de la cubierta seminal y que fueron sometidos 4°C por 40 días en medio nutritivo AM. Esto demuestra que la dormancia de los embriones de durazno es eliminada por la aplicación de un pretratamiento de frío, ratificando los resultados de trabajos anteriores (Tukey, 1933; Jeegool y Boonprakob 2004; Kukharchyk y Kastrickaya, 2005).

La reducción del periodo de estratificación necesario para eliminar la dormancia de semillas de durazno de entre 10 y 12 semanas (Tukey, 1933) a cerca de un mes y medio que se reporta en el presente trabajo, se debe a que al remover la cubierta seminal de las semillas, también se elimina una parte importante de ABA que se encuentra en esta estructura (Lipe y Crane, 1966), por ende el periodo de frío necesario para que se reduzca la concentración de ABA y se promueva la germinación se reduce a la mitad del periodo normalmente requerido. Çetinbaş M., Koyuncu (2006) reportaron que semillas de *Prunus avium* L. germinan en mayor porcentaje cuando se removió la testa de la semilla (80% de germinación) comparado con semillas a las que no se retiró la testa (57% de germinación), esta diferencia se debe a que la testa o cubierta seminal tiene una acción reguladora sobre la germinación y cuando esta estructura es eliminada una serie de factores químicos y fisiológicos activan los procesos de germinación.

En lo que tiene que ver con los medios de cultivo probados, se encontró que el medio nutritivo AM presentó el promedio más alto de germinación (72%) comparado con MS (60%) y WP (47%). La diferencia obtenida entre los medios utilizados estaría relacionada con su concentración de sales. Liu, et al., (2007) reportaron que el medio de cultivo AM presentó un promedio de germinación del 90% en embriones de durazno. La razón podría ser que los embriones de durazno prefieren medios con una moderada concentración de sales para germinar en forma adecuada, también Jeegool y Boonprakob, (2004) encontraron que el medio BH (Brooks y Hough 1958), el cual posee baja concentración de sales promovió un alto porcentaje de germinación en duraznos y nectarinas con plántulas con abundantes raíces, características muy importantes que son necesarias en cualquier programa de mejoramiento genético. De ahí que la interacción positiva entre la temperatura (4°C) y el medio de cultivo AM se manifiesta como un incremento en la germinación de embriones de durazno.

En cuanto a los reguladores de crecimiento probados, éstos no influyeron de manera significativa en la de germinación de embriones de durazno, esto de ninguna manera quiere decir que los efectos de tratamientos con distintas concentraciones hormonales son iguales, sino más bien que las diferencias encontradas entre los tratamientos son muy reducidas y que estadísticamente no se pudieron detectar. Sin embargo, se notó una diferencia en el promedio de germinación entre tratamientos con hormonas versus los sin hormonas, tanto a 4°C como a 18°C, siendo mayor el promedio de germinación en los tratamientos con hormonas. Esto indicaría que la adición de citoquininas promueve la germinación de embriones de durazno, pero este efecto no se ve reforzado por la concentración de éstas. Concentraciones moderadas de citoquininas (0,5 – 1mgL⁻¹) promueven la división celular y aceleran la germinación de semillas, además contrarrestan el efecto de dormancia provocado por la acumulación de ABA en la semilla

(Lipe y Crane, 1966; Jeegool y Boonprakob, 2004; Liu, et al., 2007). En forma separada se corrió un ensayo pequeño en donde se probó $0,5\text{mgL}^{-1}$ de GA_3 para medir el efecto que este tenía sobre la germinación de embriones de durazno; sin embargo, no hubo diferencias en el promedio de germinación con y sin GA_3 .

En cuanto a los parámetros de crecimiento que presentaron las plántulas obtenidas de la germinación de embriones de durazno, se notó que no existe un tratamiento único en donde se encuentre plántulas que se diferencien notablemente con mayor número de raíces, de hojas y mayor altura de tallo. Lo que sí está claro es que los tratamientos con altas concentraciones de citoquininas ($>1\text{mgL}^{-1}\text{BAP}$) y bajas de auxinas ($0,5\text{mgL}^{-1}$ IBA e IAA) estimularon el desarrollo de brotes laterales, mayor número de hojas aunque pequeñas, pero inhibieron la iniciación radicular en las plántulas obtenidas de la germinación de embriones de durazno. Por otra parte los tratamientos con bajas concentraciones de citoquininas y nada de auxinas no presentaron desarrollo de brotes laterales, ni hojas pequeñas, pero presentaron buena formación de raíces de las plántulas y mayor altura de tallo.

Trabajos anteriores reportaron que una combinación alta de citoquininas (especialmente 6-BA) y baja de auxinas (IBA e IAA) estimuló el crecimiento de brotes laterales e inhibió la generación de raíces en explantes de durazno, pero en concentraciones bajas de citoquininas los explantes presentaron mayor longitud de tallo, hojas normales y buena formación de raíces (Pierik, 1987; Jeegool y Boonprakob, 2004). Fisiológicamente y en función de la concentración de citoquininas, éstas están involucradas en varias funciones celulares como: promover la división celular, acelerar la germinación en semillas que han entrado en dormancia, estimular el crecimiento meristemático y el desarrollo de

brotos laterales. Si el objetivo es la obtención de plántulas completas sería indispensable emplear tratamientos con baja concentración de citoquininas, pero si el fin es la micropropagación de una variedad élite de durazno, los tratamientos a utilizar serían con una combinación alta de citoquininas (BAP) y baja de auxinas (IBA e IAA).

9.2.Enraizamiento de Retoños.

El proceso de inducción de raíces fue exitoso, con resultados similares a los encontrados por Kalinina y colaboradores (2007), quien sometió a inducción de raíces a varios explantes de especies del género *Prunus* con periodos de 4 hasta 28 días en medio AM suplementado con 3mgL^{-1} de IBA y Ning et al. (2007), quienes probaron tratamientos de inducción de raíces con $2,5$ y 5mgL^{-1} IBA con una formación de raíces del 80% y con un promedio 5 raíces por explante en *Prunus mume* “Xue mei”.

Dentro del género *Prunus* hay especies que requieren periodos cortos (4 a 8 días) para inducir raíces como: *P. americana*, *P.x cistena*, *P. tomentosa*, *P. triloba*, *P. virginiana* y *P. pérsica* v. *GF305* y también variedades que requieren periodos largos (8 a 28 días) para inducir raíces como: *P. serrulata* ‘Kwanzan’, *P. sargentii* and *P. laurocerasus* (Kalinina et al. 2007). Por los resultados obtenidos en los dos tratamientos de inducción de raíces, la variedad Diamante puede ser identificada dentro del grupo que necesita periodos largos para inducir raíces. Esto se confirma ya que en un ensayo separado se sometió a un periodo de inducción de raíces a explantes de la var Diamante durante cuatro días en medio MS suplementado con 3mgL^{-1} de IBA sin obtener resultados favorables.

En los dos tratamientos utilizados (8 y 16 días de inducción) se presentó una pequeña formación de callo en la base del los retoños, es posible que se deba a la concentración de IBA o al tiempo de inducción al que fueron sometidos los retoños. Si

bien las especies de enraizamiento tardío presentan normalmente formación de callo como lo reportan Kalinina et al., (2007), se podría probar concentraciones menores a 3mgL^{-1} de IBA o de igual manera se podría disminuir los periodos de inducción de raíces y comparar estos resultados con los obtenidos en esta investigación.

9.3. Aclimatación de Plántulas Provenientes del Ensayo de Germinación de Embriones de Durazno var Diamante.

La tasa de sobrevivencia de las plantas (80 y 50%) que se encontró en los grupos 1 y 2 está dentro del rango aceptable de sobrevivencia que ocurre en un proceso de aclimatación (Ponce y Monter, 2009). El porcentaje mayor de arrosetamiento que se presentó en el grupo 2 de plantas se debe directamente a la falta de estratificación de las semillas reportado por Moore (1993). Las plántulas arrosetadas al parecer presentan un nivel considerable de ABA, el cual está inhibiendo el normal desarrollo del tallo y que con el tiempo éste desaparece, permitiendo un correcto desarrollo de la plántula. La estratificación al igual que compuestos químicos como el ácido giberélico, el nitrato de potasio así como la tioúrea reducen los niveles de ABA o lo inactivan (Lipe y Crane 1966; Çetinbaş y Koyuncu 2006).

9.4. Cultivo de Embriones Provenientes de los Cruces Diamante x Florida.

El éxito de la polinización que se obtuvo en los cruces en este trabajo se encuentra dentro del margen aceptable 10 al 40 por ciento según Moore (1993). Específicamente en el cruce A se tuvo un 14% de éxito de fertilización, que es el doble de lo que se obtuvo para el cruce B, aparentemente esto pudo deberse a diferencias que pudieron existir en cuanto a la fertilidad del polen de las dos variedades utilizadas. El cruce B, que fue el menos eficiente

donde la variedad Florida fue utilizada como padre posiblemente tenga una reducida viabilidad de polen. Otra causa pudo ser la poca experiencia en el manejo de polinizaciones en variedades de durazno y por ende errores en cuanto a interpretar la receptividad del estigma y el punto exacto para realizar la polinización.

10. Conclusiones y Recomendaciones

10.1. Conclusiones

Se determinó que un periodo de estratificación de embriones de durazno sin cubierta seminal por 40 días a 4°C y la incubación bajo condiciones del cuarto de cultivo (fotoperiodo 16h luz/8h oscuridad) en medio nutritivo AM suplementado con 1mgL⁻¹ de BAP incrementa significativamente su germinación. Se notó que la eliminación de la cubierta seminal en las semillas redujo el periodo de incubación para eliminar la dormancia de 12 semanas reportado anteriormente a 6 semanas.

El medio nutritivo AM tuvo el promedio más alto de germinación de embriones de durazno, debido a que su moderada concentración de sales crea condiciones favorables para la germinación y desarrollo de embriones de durazno.

Los resultados no mostraron una interacción significativa entre los factores temperatura y hormonas, ni entre los factores medios y hormonas que afecten de manera significativa la germinación de embriones de durazno. Sin embargo, fisiológicamente los reguladores de crecimiento tienen efectos positivos sobre la germinación y desarrollo de embriones de durazno, pero en este trabajo su efecto estadísticamente no se pudo detectar.

El mejor tratamiento identificado permitió germinar embriones con una eficiencia del 60%. Por lo que se puede afirmar que el protocolo de germinación de embriones

descrito en esta investigación puede ser utilizado para el cultivo y rescate de embriones de durazno en futuros programas de fitomejoramiento.

Se determinó que el tratamiento más efectivo para el enraizamiento de retoños de durazno es cultivar a éstos por un periodo de 16 días en medio MS + 3mgL⁻¹ de IBA, en base al número de raíces por retoño, grosor y longitud de éstas. Por último, se logró aclimatar plantas de durazno obtenidas a partir de semillas germinadas in vitro teniendo una alta tasa de sobrevivencia.

10.2. Recomendaciones

Se recomienda emplear esta metodología de cultivo de embriones en programas de mejoramiento genético del durazno, donde la hibridación interespecífica presente inconvenientes en cuanto al normal desarrollo del embrión.

Se recomienda emplear el tratamiento de inducción de raíces en retoños de durazno estandarizado en esta investigación para programas de micro propagación donde el objetivo sea generar clones de una variedad élite de durazno.

Sería importante realizar ensayos combinando reguladores de crecimiento como citoquininas y giberelinas, debido a que se encontró varios trabajos donde reportan que la combinación de estas hormonas tiene efectos positivos en la germinación de embriones de durazno.

En lo que tiene que ver con la obtención de híbridos, sería de gran importancia que antes de realizar cruces entre variedades se realice pruebas de viabilidad de polen, esto determinará si es factible o no el cruce entre variedades determinadas.

11. Bibliografía.

1. Agustí, M. 2004. Fruticultura. Mundi-Prensa: 286 – 289. Madrid
2. Anderson, N. et al. 2002. Cooler Temperature During Germination Improves the Survival of Embryo Cultured Peach Seed. HortScience 37 (2): 402-403.
3. Byrne, D.H. T.G. Littleton. 1988. Verification of the parentage presumed peach x almond hybrids by isoenzyme analyses. Fruit Varieties Journal 42: 130 – 134.
4. Çetinbaş M., Koyuncu F., 2006., Improving germination of *Prunus avium* L. seeds by geberelic acid, potassium nitrate and thiourea. Hort. Sci. (Prague), 33, 2006 (3): 119–123.
5. Cubero, J. 2003. Introducción a la mejora genética vegetal. Mundi-Prensa. 2ª ed. Barcelona.
6. Duarte Odilio. 2005. Informe de consultoría en durazno, acceso a mercados y alivio de la pobreza. Consorcio Chemonics RAISE junto a CARE, Texas A&M y PRIME International.
7. Gilmore, A.E. 1950. A technique for embryo culture of peaches. Hilgardia 20: 147 – 170.
8. FAOSTAT 2007. Organización de la Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, índices anual de producción de frutales, durazno.
9. Gómez, et al. 2005. Application of recent biotechnologies to *Prunus* tree crop genetic improvement. Cien. Inv. Agr. 32(2). 73 – 96
10. Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP). El cultivo del duraznero en las zonas altas del Ecuador. Manual N° 23. Programa de Fruticultura Marzo 1992.

11. James N. Moore 1993. Avances en la Genotecnia de Frutales. AGT. 1^a ed. 359 – 407. México.
12. Jeengool Nonglak and Boonprakob Unaroj., 2004., Rescue of Peach Embryo in Culture Media with Additional of 6-bezylademine and Gibberellic Acid., Kasetsart J. (Nat. Sci) 38: 468-474.
13. Kalinina, A. y Brown, C. W. 2007. Micropropagation of ornamental *Prunus* spp. and GF305 peach, *Prunus* viral indicator. Plant Cell Springer-Verlag 26:927–935.
14. Kukharchyk, N. y Kastrickaya, M. 2005. Embryo rescue techniques in *Prunus* L. breeding. J. Fruit Ornam. Plant Res. vol. 14 (Suppl. 1), pp 129-135.
15. Kuden, A.B. et al. 1999. Embryo rescue in peach hybrids. Acta Hort. 484: 531 – 533.
16. **Lipe, N. y Julian C. Crane. 1966.** Dormancy Regulation in Peach Seeds. *Science* 29 July Vol. 153. no. 3735: 541 – 542
17. Liu, W. et al. 2007. Interspecific hybridation of *Prunus persica* with *P. Americana* and *P. salicina* using embryo rescue. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, An International Journal on Biotechnology of Higher Plants.
18. Murashinge, T. y Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioaddays with tabacco tissue cultures. *Physiol. Plant*: N° 15: 1026 – 1027.
19. Ning, G.G. et al. 2007. Factors affecting plantlet regeneration from in vitro cultured immature and cotyledons of *Prunus mume* “Xue mei” *In Vitro Cell.Dev.Biol.-Plant* 43: 95-100.
20. Pierik, M. 1987. In vitro culture of higher plants. Martinus Nijhoff. Dordrecht. 139 -148.

21. Piaggese Alberto., et al., 1991. Level of Acid Abscisic in Integuments, Nucellus, Endosperm, and Embryo of Peach Seeds (*Prunus persica* L. cv Springcrest) during Development., *Plant Physiol.* 97, 793-797.
22. Ponce, P. et al. Propagación in vitro del híbrido almendro x durazno H1. *Revista Fitotecnia Mexicana*, Vol. 32, Núm. 2, abril-junio, 2009: 103 – 109. Sociedad Fitotecnia Mexicana. México
23. Scorza, R. y W. B. Sherman. 1996. Peach, pp. 325 – 440. In J. Janick y J. N. Moore (eds.) *Fruit breeding Volume 1: Tree and tropical fruit*. John Wiley & Sons, New York.
24. 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.
25. Trevor, V. 2002. Biotechnology provides new tools for plant breeding. *Agricultural Biotechnology in California Series. Publication 8043*.
26. Tukey, H.B. 1933. Growth of peach embryo in relation to growth of fruit and season of ripening. *Proc. Amer. Soc. Hort. Sci.* 30: 209 – 218.

12.1 Tablas

Tabla 1 Colecta y utilización de semillas de durazno provenientes de la plantación San Felipe, ubicada en la Hacienda Conrraqui en Ibarra

Colectas	Número de semillas	Fecha de colecta	Número de semillas utilizadas	Fecha de desinfección
1	700	02/02/2009	600	11/02/2009
2	750	04/05/2009	600	13/05/2009
3	800	22/08/2009	600	01/09/2009

Tabla 2 Diseño experimental del proyecto (diseño de bloques completos al azar DBCA).

Muestra la forma en que estuvo arreglado el experimento, con dos bloques (4 y 18°C), tres medios de cultivo (AM, MS y WP) y cinco concentraciones hormonales (0, 0.5ppmBAP, 1ppmBAP,

4ppmBAP+0.5ppmIAA, 4ppmBAP+0,5ppmIBA). En total se tienen treinta tratamientos con veinte semillas por cada uno.

Temperatura	Medios de cultivo	Hormonas	Número de semillas
18°C	AM	0	20
		0,5ppmBAP	20
		1ppmBAP	20
		4ppmBAP+0,5ppmIAA	20
		4ppmBAP+0,5ppmIBA	20
	MS	0	20
		0,5ppmBAP	20
		1ppmBAP	20
		4ppmBAP+0,5ppmIAA	20
		4ppmBAP+0,5ppmIBA	20
	WP	0	20
		0,5ppmBAP	20
		1ppmBAP	20
		4ppmBAP+0,5ppmIAA	20
		4ppmBAP+0,5ppmIBA	20
4°C	AM	0	20
		0,5ppmBAP	20
		1ppmBAP	20
		4ppmBAP+0,5ppmIAA	20
		4ppmBAP+0,5ppmIBA	20
	MS	0	20
		0,5ppmBAP	20
		1ppmBAP	20
		4ppmBAP+0,5ppmIAA	20
		4ppmBAP+0,5ppmIBA	20
	WP	0	20
		0,5ppmBAP	20
		1ppmBAP	20
		4ppmBAP+0,5ppmIAA	20
		4ppmBAP+0,5ppmIBA	20

Tabla 3 Medias por Mínimos cuadrados para % Germinación con intervalos de confianza del 95%. Muestra los promedios acumulados de germinación de embriones de durazno para temperaturas, medios de cultivo y reguladores de crecimiento utilizados en el ensayo. También, presenta el promedio acumulado debido al efecto combinado de los factores analizados. Se

observa que los mayores promedios de germinación se obtienen con un tratamiento a 4°C en medio AM.

<i>Nivel</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Error Estandar.</i>	<i>Límite Inferior</i>	<i>Límite Superior</i>
Media Global	90	59,74			
Temperatura					
18°C	45	50,32	2,95	44,43	56,21
4°C	45	69,17	2,95	63,28	75,06
Medios					
AM	30	71,63	3,61	64,41	78,84
MS	30	60,37	3,61	53,16	67,59
WP	30	47,23	3,61	40,01	54,45
Hormonas					
0,5ppmBAP	18	60,38	4,66	51,07	69,70
1ppmBAP	18	56,37	4,66	47,06	65,69
4ppmBAP+0,5ppmIAA	18	65,75	4,66	56,44	75,06
4ppmBAP+0,5ppmIBA	18	65,96	4,66	56,64	75,27
sin Hormonas	18	50,26	4,66	40,94	59,57
Temperatura por Medios					
18°C,AM	15	59,25	5,10	49,04	69,45
18°C,MS	15	43,84	5,10	33,64	54,04
18°C,WP	15	47,87	5,10	37,67	58,08
4°C,AM	15	84,01	5,10	73,80	94,21
4°C,MS	15	76,91	5,10	66,70	87,11
4°C,WP	15	46,59	5,10	36,38	56,79
Temperatura por Hormonas					
18°C,0,5ppmBAP	9	50,64	6,59	37,47	63,82
18°C,1ppmBAP	9	40,16	6,59	26,98	53,33
18°C,4ppmBAP+0,5ppmIAA	9	60,83	6,59	47,66	74,01
18°C,4ppmBAP+0,5ppmIBA	9	63,80	6,59	50,63	76,97
18°C,sin Hormonas	9	36,17	6,59	22,99	49,34
4°C,0,5ppmBAP	9	70,12	6,59	56,95	83,30
4°C,1ppmBAP	9	72,59	6,59	59,42	85,76
4°C,4ppmBAP+0,5ppmIAA	9	70,67	6,59	57,49	83,84
4°C,4ppmBAP+0,5ppmIBA	9	68,11	6,59	54,94	81,28
4°C,sin Hormonas	9	64,34	6,59	51,17	77,52
Medios por Hormonas					
AM,0,5ppmBAP	6	68,63	8,07	52,50	84,77
AM,1ppmBAP	6	70,42	8,07	54,28	86,55
AM,4ppmBAP+0,5ppmIAA	6	74,58	8,07	58,45	90,72
AM,4ppmBAP+0,5ppmIBA	6	81,33	8,07	65,20	90,47
AM, sin Hormonas	6	63,17	8,07	47,03	79,30
MS,0,5ppmBAP	6	59,17	8,07	43,03	75,30
MS,1ppmBAP	6	50,40	8,07	34,27	66,53
MS,4ppmBAP+0,5ppmIAA	6	73,47	8,07	57,33	89,60
MS,4ppmBAP+0,5ppmIBA	6	70,48	8,07	54,35	86,62
MS, sin Hormonas	6	48,35	8,07	32,22	64,48
WP,0,5ppmBAP	6	53,35	8,07	37,22	69,48
WP,1ppmBAP	6	48,30	8,07	32,17	64,43
WP,4ppmBAP+0,5ppmIAA	6	49,20	8,07	33,07	65,33
WP,4ppmBAP+0,5ppmIBA	6	46,05	8,07	29,92	62,18

WP, sin Hormonas	6	39,25	8,07	23,12	55,38
------------------	---	-------	------	-------	-------

Tabla 4 Análisis de Varianza para germinación de embriones cigóticos de durazno (Suma de cuadrados Tipo III). Muestra el análisis de varianza (ANOVA), donde los efectos

principales de la temperatura y medios de cultivo sobre la germinación de embriones son estadísticamente significativos ($p < 0,001$), mientras que el efecto principal de los reguladores de crecimiento no presentan un efecto significativo en la germinación de embriones ($p > 0,05$). Por otra parte la interacción entre temperatura y medios de cultivo presentan interacción con $p < 0,001$. Sin embargo el efecto de interacción entre temperatura y hormonas, y entre medios de cultivo con hormonas no es significativo con $p > 0,05$.

<i>Fuente</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Temperatura	1,63616	1	1,63616	24,08	0,0000
B:Medios	1,67288	2	0,836438	12,31	0,0000
C:Hormonas	0,527423	4	0,131856	1,94	0,1154
INTERACCIONES					
AB	0,779837	2	0,389918	5,74	0,0052
AC	0,391867	4	0,0979668	1,44	0,2314
BC	0,439951	8	0,0549939	0,81	0,5971
ABC	0,290521	8	0,0363151	0,53	0,8260
RESIDUOS	4,07758	60	0,0679596		
TOTAL (CORREGIDO)	9,81621	89			

Tabla 5 Promedio acumulado para número de raíces, de hojas y altura del tallo en plántulas provenientes de la germinación de embriones de durazno var. Diamante.

Muestra el promedio acumulado de número de raíces, de hojas y altura del tallo de plántulas generadas de la germinación de embriones de durazno var. Diamante por tratamiento. Los mayores promedios en las tres características medidas en las plantas se presentaron en el bloque a 4°C.

Temperatura	Medios de cultivo	Hormonas	Promedio N° de Raíces	Promedio N° de Hojas	Promedio Altura Tallo (cm)
18°C	AM	0	2	3,7	2,2
		0,5ppmBAP	1	6,2	1,9
		1ppmBAP	1	7,2	1,9

		4ppmBAP+0,5ppmIAA	1	8,0	1,8
		4ppmBAP+0,5ppmIBA	0	7,2	1,9
	MS	0	1	5,5	1,7
		0,5ppmBAP	0	6,1	1,9
		1ppmBAP	1	7,6	2,1
		4ppmBAP+0,5ppmIAA	0	6,5	1,7
		4ppmBAP+0,5ppmIBA	0	5,1	1,7
	WP	0	3	3,6	2,2
		0,5ppmBAP	2	8,9	2,4
		1ppmBAP	2	9,8	2,5
4ppmBAP+0,5ppmIAA		0	8,8	2,1	
4ppmBAP+0,5ppmIBA		1	9,3	2,5	
4°C	AM	0	2	6,7	2,2
		0,5ppmBAP	1	8,8	2,5
		1ppmBAP	2	10,2	2,3
		4ppmBAP+0,5ppmIAA	1	9,1	2,1
		4ppmBAP+0,5ppmIBA	1	10,0	2,2
	MS	0	2	5,6	1,9
		0,5ppmBAP	3	9,3	2,7
		1ppmBAP	2	9,6	2,9
		4ppmBAP+0,5ppmIAA	2	9,7	2,3
		4ppmBAP+0,5ppmIBA	2	10,4	2,4
	WP	0	2	5,3	2,0
		0,5ppmBAP	2	10,1	2,4
		1ppmBAP	2	9,9	2,8
		4ppmBAP+0,5ppmIAA	0	9,3	2,7
		4ppmBAP+0,5ppmIBA	0	8,3	1,8

Tabla 6 Número de raíces generadas por retoño de durazno en dos tratamientos de inducción de raíces investigados. Muestra el número de raíces por cada tratamiento. El tratamiento de inducción por 16 días presentó 100% de regeneración de raíces, mientras que el tratamiento de inducción de raíces por 8 días presentó un 83%. El promedio de raíces por retoño fue de 4,6 para el periodo de 8 días de inducción y de 5,5 para el periodo de 16 días de inducción de raíces.

Tratamientos	
MS + 3mg/L IBA Ocho días	MS + 3mg/L IBA Dieciséis días

Retoño	Número de raíces x retoño	Número de raíces x retoño
1	8	4
2	4	7
3	3	1
4	8	5
5	2	1
6	5	12
7	5	8
8	7	6
9	0	5
10	0	6
11	7	4
12	6	7
Total	55	66
Media	4,6	5,5
% de Enraizamiento	83	100

Tabla 7 Análisis de Varianza para número de raíces de retoños en los tratamientos de inducción de raíces investigados. Muestra los tratamientos de inducción de raíces, no hay diferencia significativa ($p > 0,05$) en el promedio de raíces producidas por retoño de durazno en los tratamientos analizados.

Análisis de la Varianza					
Fuente	Sumas de cuad.	Gl	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
Entre grupos	5,04167	1	5,04167	0,59	0,4505
Intra grupos	187,917	22	8,54167		
Total (Corr.)	192,958	23			

Tabla 8 Porcentaje de sobrevivencia luego de nueve semanas de aclimatación de plántulas obtenidas de la germinación de embriones de durazno var. Diamante.

Grupos	Pretratamiento de frío	Número de Plantas	% arrosetamiento	% de Supervivencia
1	Si	9	33	80
2	No	9	50	50

Tabla 9 Cruces realizados variedad Diamante x variedad Florida y viceversa.

	Padre	
Madre	Variedad Diamante	Variedad Florida
Variedad Diamante	No es de interés	Cruce B
Variedad Florida	Cruce A	No es de interés

Tabla 10 Flores polinizadas en el cruce A y B, y éxito de la polinización. Muestra el número de flores polinizadas en cada cruce (cruce A actuó como padre var. Diamante y cruce B actuó como padre var. Florida), los frutos que lograron cuajar y el éxito de la polinización.

Cruces	Flores polinizadas	Frutos obtenidos	Éxito de polinización
Cruce A	185	25	14%
Cruce B	142	10	7%
Total	327	35	21%
Promedio	163,5	17,5	10,5

Tabla 11 Porcentaje de germinación de embriones obtenidos de los cruces A y B bajo el tratamiento de 4°C por 40 días en medio AM suplementado con 1ppmBAP.

Cruces	Tratamiento			Semillas sembradas	% Germinación
	Temperatura	Medio	Hormonas		
Cruce A	4°C	AM	1ppmBAP	18	72,2
Cruce B	4°C	AM	1ppmBAP	8	50

12.2 Figuras

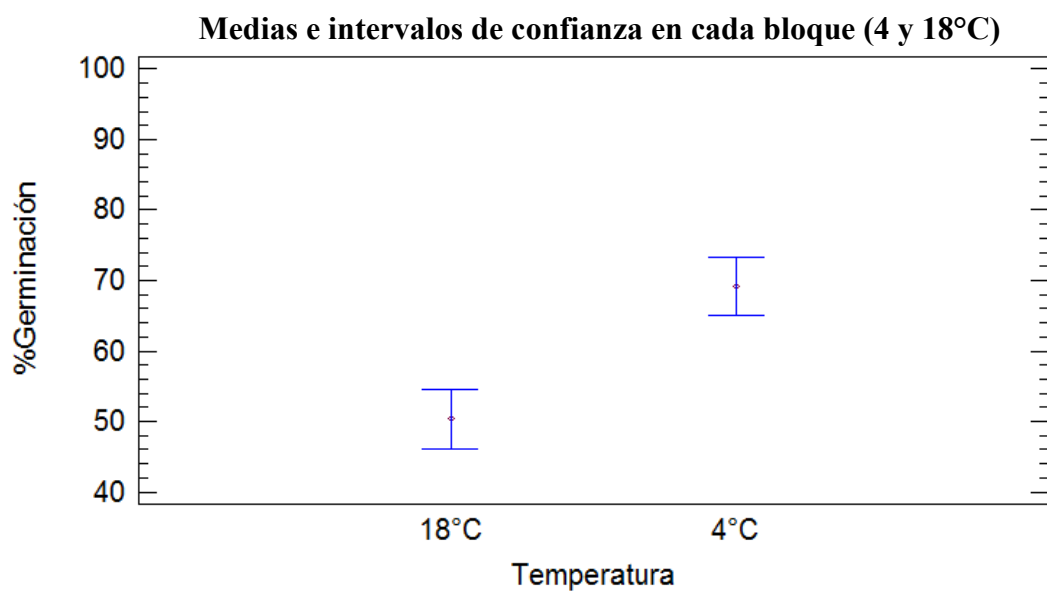


Figura 1. Separación de Medias de germinación de embriones de la var. Diamante en cada bloque (4 y 18°C).

Se observa que no hay solapamiento de los intervalos de confianza entre los bloques (4 y 18°C). A 4°C el promedio de germinación de embriones de durazno varió desde un 67% hasta un 75%, mientras que a 18°C varió de 47 a 55%.

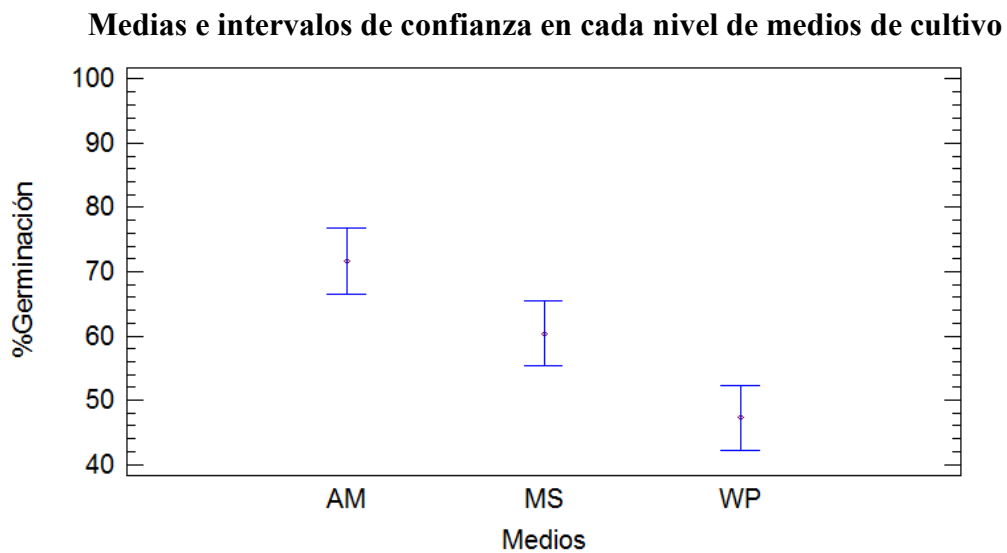


Figura 2 Medias de germinación entre los medios nutritivos investigados

Se observa que los intervalos de confianza en la germinación de embriones de durazno varían y no se solapan. El medio AM produjo germinación que varió del 69 al 70%, el medio MS varió del 55 al 67% y el medio WP que varió del 44 al 54%.

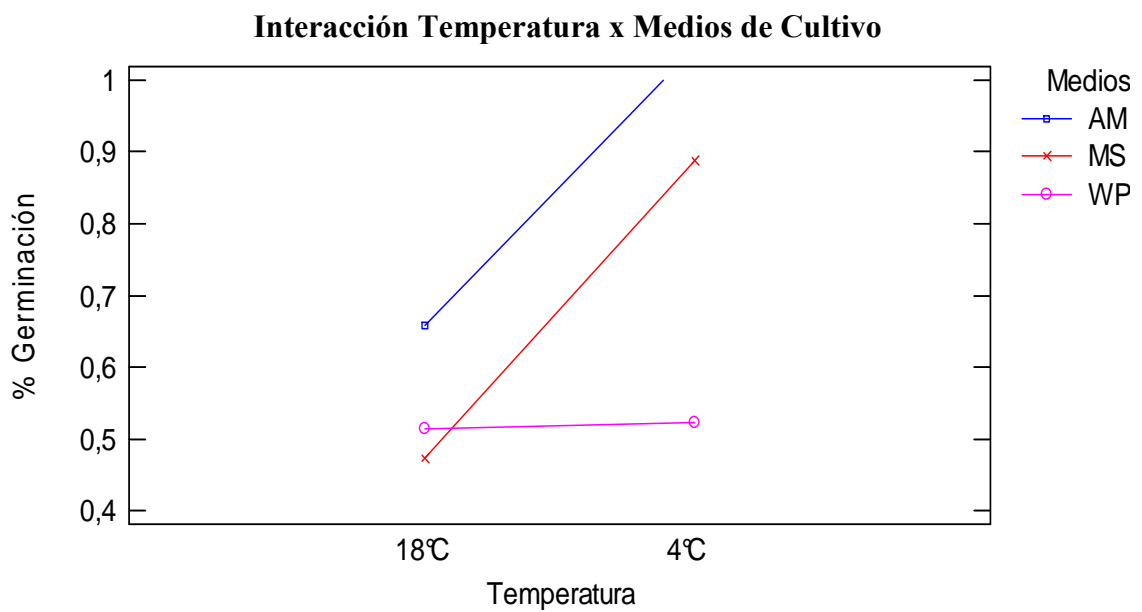


Figura 3 Interacción entre Temperatura y Medios nutritivos

Se observa una interacción positiva sobre el porcentaje de germinación de embriones de durazno var. Diamante entre la temperatura y los medios AM y MS. Cuando los embriones son sometidos al periodo de frío, se observa un incremento en el porcentaje de germinación en los medios AM y MS.

Interacción Temperatura x Medios de Cultivo

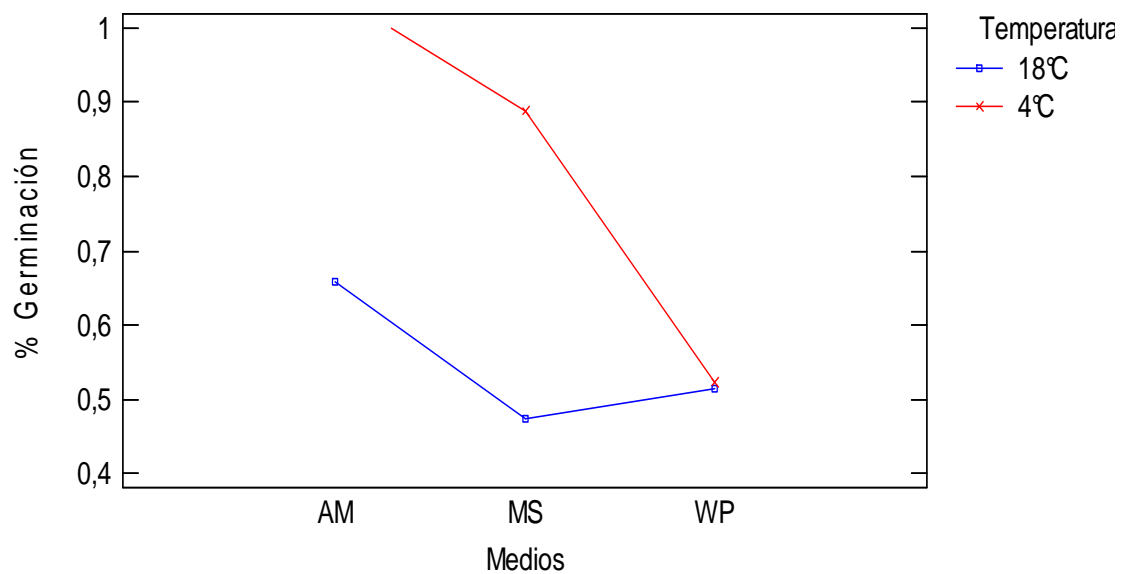


Figura 4 Interacción entre Medios y Temperatura

Se observa una interacción positiva en el porcentaje de germinación de embriones de durazno var. Diamante entre la temperatura y los medios AM y MS. Cuando los embriones son sometidos al periodo de frío, se observa un incremento en el porcentaje de germinación en los medios AM y MS.

Interacción no significativa entre Medios de Cultivo x Hormonas

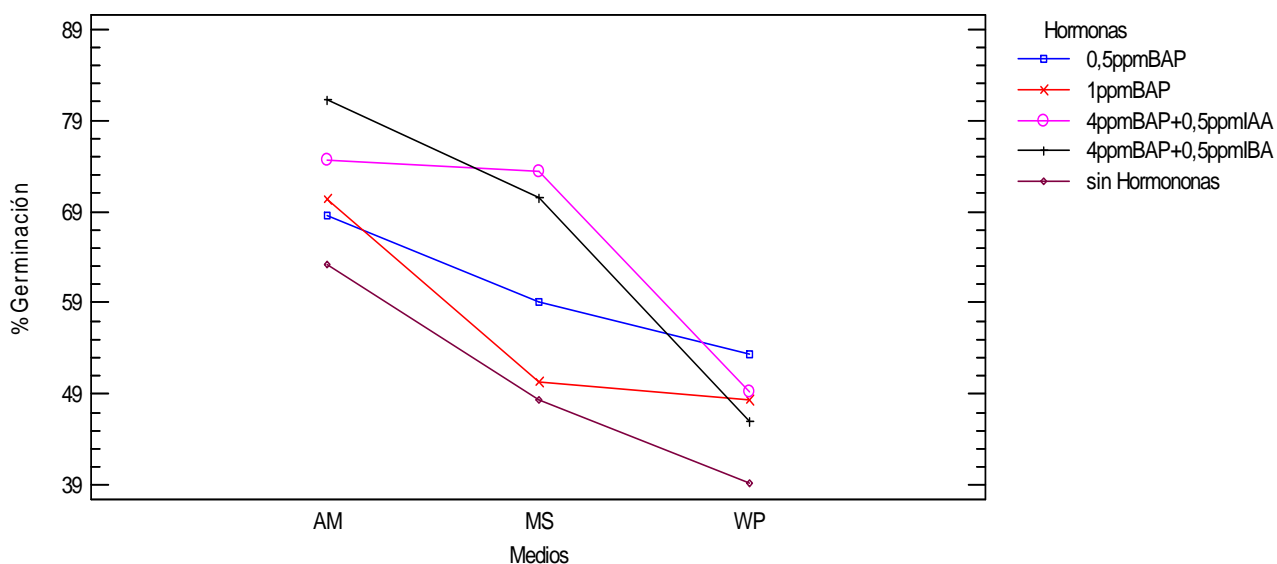


Figura 5 No interacción entre Medios de cultivo y Hormonas

Se observa la no interacción entre medios y hormonas, las concentraciones de hormonas empleadas en este trabajo tienen el mismo efecto sobre la germinación de embriones de durazno. Las diferencias encontradas en cada concentración hormonal no son estadísticamente significativas $p > 0,05$.

Interacción no significativa entre Temperatura x Hormonas

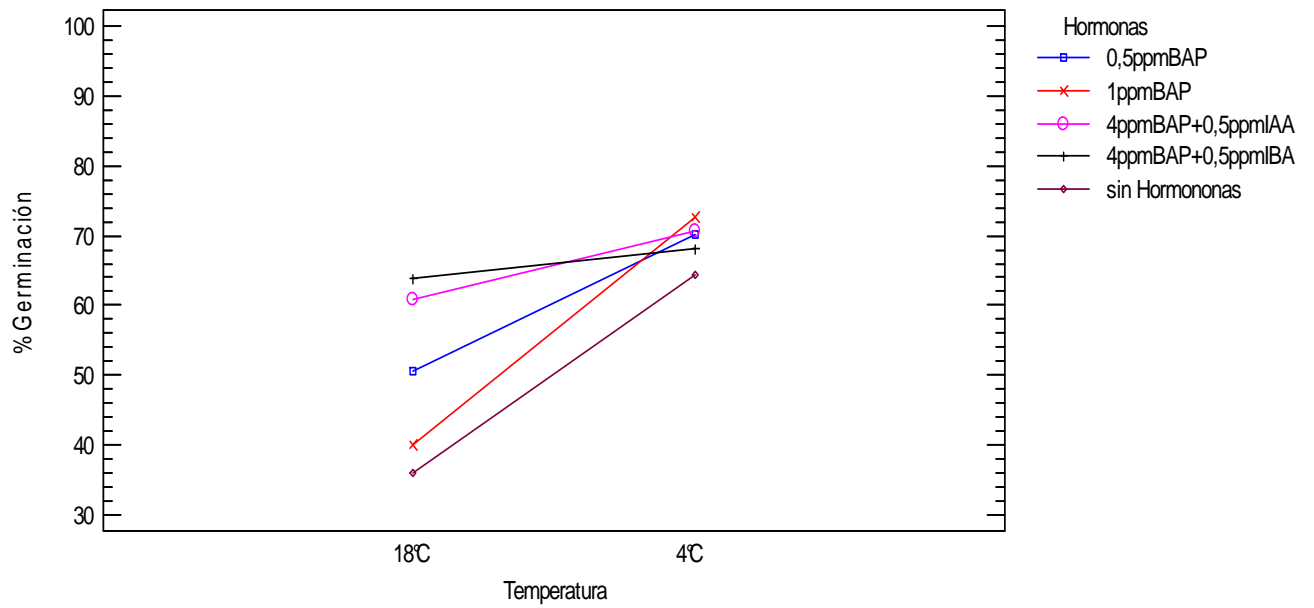


Figura 6 No interacción Temperatura x Hormonas

Se observa que la interacción entre temperatura y hormonas no es significativa ($p > 0,05$), se nota que si se va de 18°C a 4°C, el porcentaje de germinación aumenta independientemente de la concentración hormonal utilizada.



Figura 7 Germinación de embriones híbridos cruce A.

Se observa la germinación de embriones del cruce A 6 días después de que fueron sometidos a un periodo de frío a 4°C por 40 días en medio AM suplementado con 1ppmBAP.

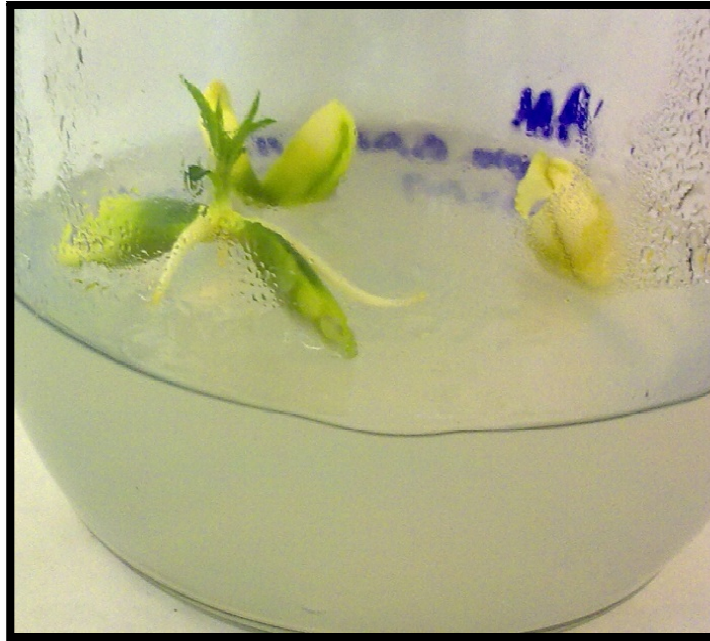


Figura 8 Germinación de embriones híbridos Cruce B.

Se observa la germinación de embriones del cruce B 6 días después de que fueron sometidos a un periodo de frío a 4°C por 40 días en medio AM suplementado con 1ppmBAP.



Figura 9 Enraizamiento de retoños de durazno después del tratamiento de inducción de raíces por 8 días en MS con 3mgL^{-1} de IBA

Se observa retoños de durazno enraizados, 6 semanas después de haber sido trasplantados en medio MS basal, los cuales fueron sometidos a inducción de raíces por 8 días en medio MS suplementado con 3mgL^{-1} de IBA.



Figura 10 Enraizamiento de retoños de durazno después del tratamiento de inducción de raíces por 16 días en MS con 3mgL^{-1} de IBA

Se observa retoños de durazno enraizados, 6 semanas después de haber sido trasplantados en medio MS basal, los cuales fueron sometidos a inducción de raíces por 16 días en medio MS suplementado con 3mgL^{-1} de IBA.



Figura 11 Retoño de durazno enraizado que fue sometido al tratamiento de inducción de raíces por 16 días en medio MS con 3mgL^{-1} de IBA

Se observa retoño de durazno enraizado, 6 semanas después de haber sido trasplantado en medio MS basal, proveniente del tratamiento de inducción de raíces por 16 días en medio MS suplementado con 3mgL^{-1} de IBA. Retoño fue sometido al proceso de aclimatación estandarizado en este trabajo.



Figura 12 Aclimatación de plántulas provenientes de la germinación de embriones de durazno var Diamante in vitro

Se observa planta aclimatada con arrosamiento temporal proveniente de embriones que no fueron sometidos a tratamiento de frío, los espacios entre nudos casi no se distinguen, las hojas se disponen muy juntas.

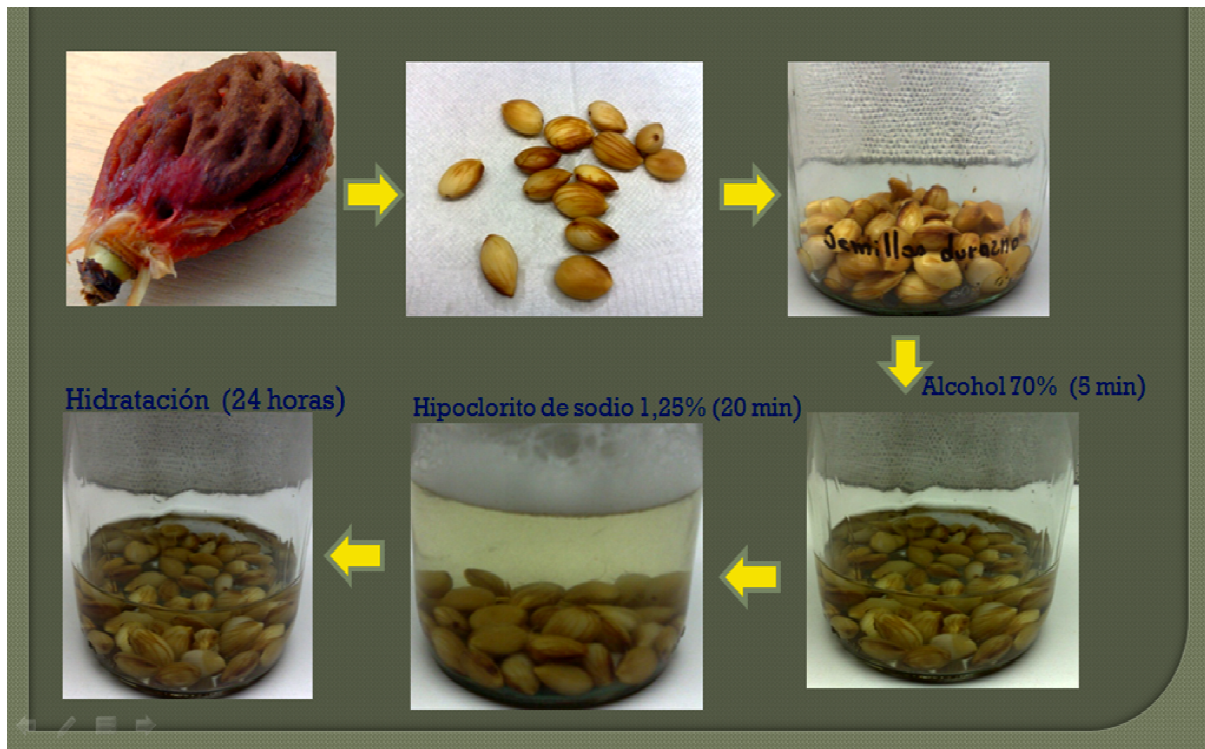


Figura 13 Aclimatación de plántulas provenientes de la germinación de embriones de durazno var Diamante in vitro.

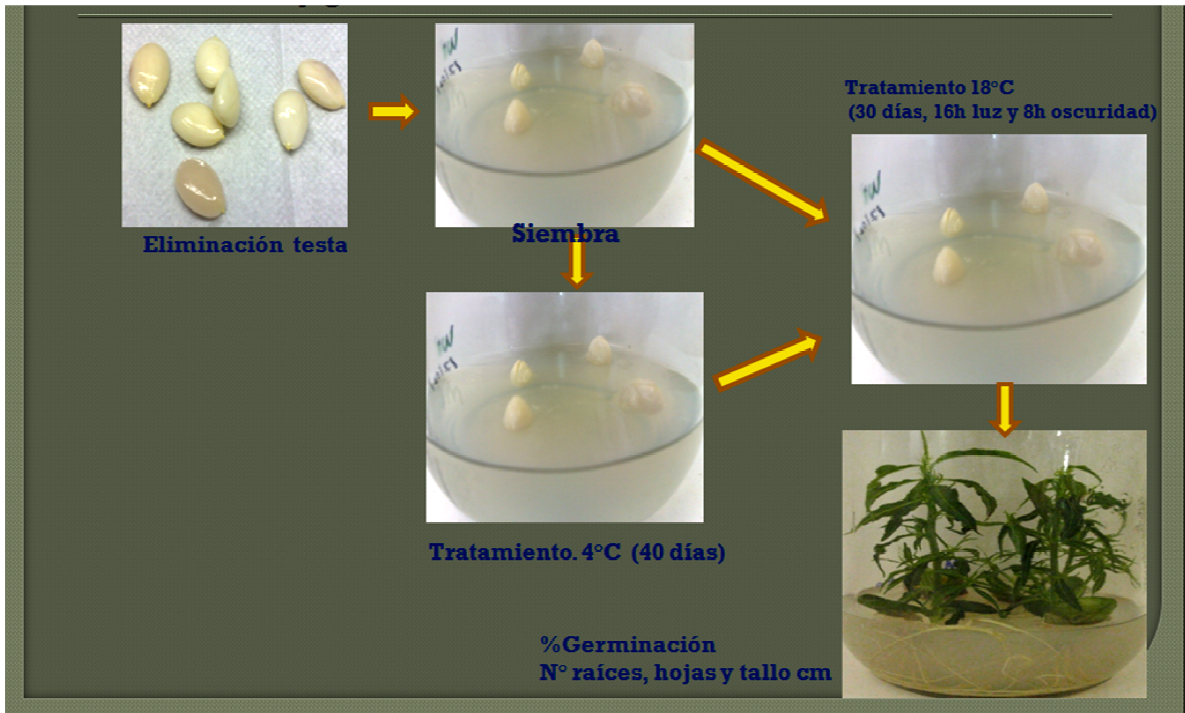
Se observa plantas aclimatadas normales provenientes de embriones que fueron sometidos al tratamiento de frío a 4°C por 40 días, los espacios entre nudos son grandes.

13. Anexos

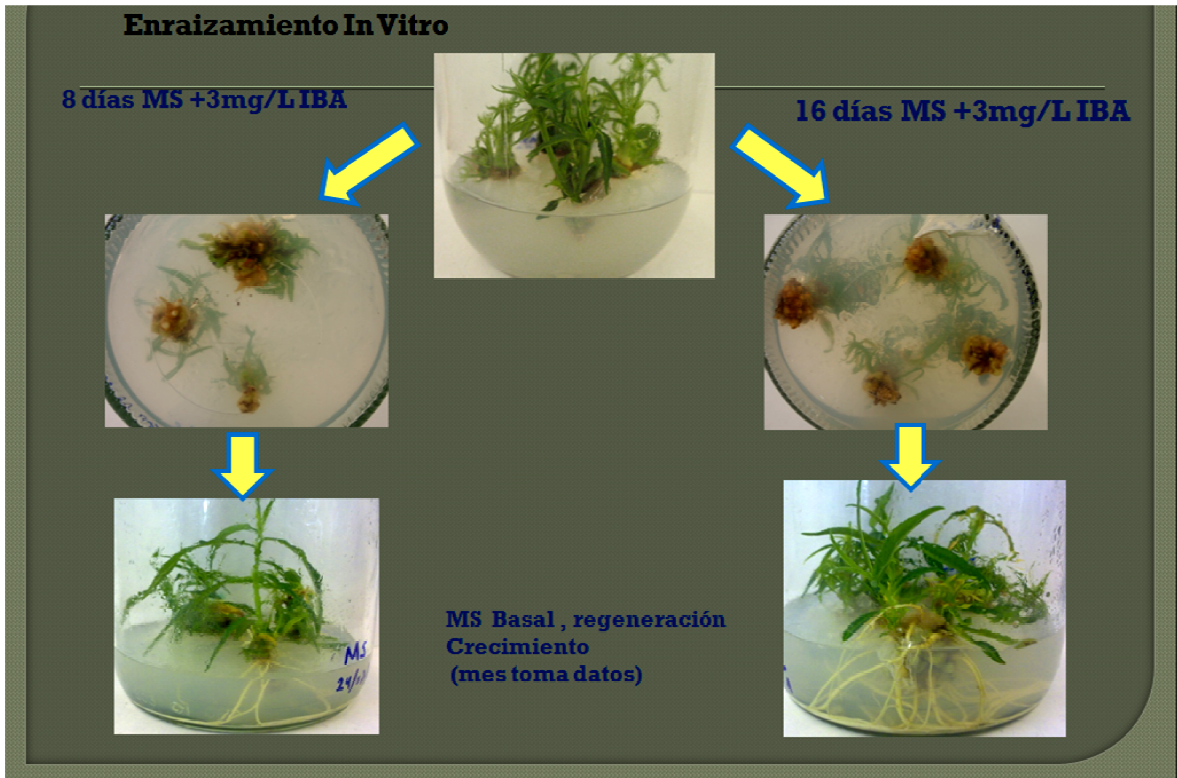
Anexo1 Desinfección de semillas de durazno var. Diamante.



Anexo 2 Siembra y germinación de embriones de durazno var. Diamante.

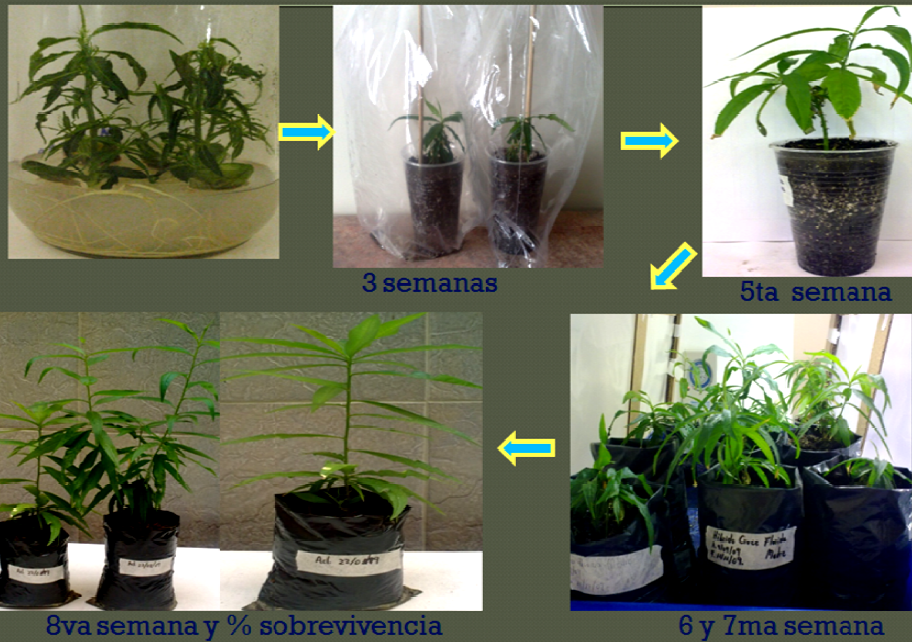


Anexo 3 Enraizamiento de retoños de durazno con dos periodos de inducción de raíces.



Anexo 4 Aclimatación de plántulas de durazno generadas a partir de la germinación de embriones de durazno var. Diamante in vitro

Aclimatación



Anexo 5 Porcentaje de germinación de embriones y parámetros de crecimiento de plántulas obtenidas de los embriones germinados de durazno var. Diamante después de 30 días de permanecer en el cuarto de cultivo.

Temperatura	Medios de cultivo	Hormonas	% Germinación	N° de Raíces	N° de Hojas	Altura (cm)
18°C	WP	0	16,70	2,50	3,50	2,60
18°C	WP	0	50,00	2,46	3,31	2,08
18°C	WP	0,5ppmBAP	25,00	1,00	11,50	2,50
18°C	WP	0,5ppmBAP	83,30	2,00	9,00	2,35
18°C	WP	1ppmBAP	21,40	1,67	15,67	3,00
18°C	WP	1ppmBAP	66,70	1,88	8,25	2,44
18°C	WP	4ppmBAP+0,5ppmIAA	40,00	0,00	8,50	1,78
18°C	WP	4ppmBAP+0,5ppmIAA	75,00	0,44	11,17	2,31

18°C	WP	4ppmBAP+0,5ppmIBA	33,30	1,50	9,50	3,00
18°C	WP	4ppmBAP+0,5ppmIBA	70,00	0,29	9,14	2,21
18°C	MS	0	18,75	1,67	6,67	2,33
18°C	MS	0	25,00	1,00	2,00	1,10
18°C	MS	0,5ppmBAP	18,70	0,00	5,67	1,60
18°C	MS	0,5ppmBAP	62,50	0,60	5,60	2,25
18°C	MS	1ppmBAP	25,00	0,67	8,67	2,50
18°C	MS	1ppmBAP	33,30	0,50	8,25	2,00
18°C	MS	4ppmBAP+0,5ppmIAA	55,50	0,00	6,20	1,50
18°C	MS	4ppmBAP+0,5ppmIAA	62,50	0,80	6,52	1,60
18°C	MS	4ppmBAP+0,5ppmIBA	37,50	0,00	4,33	1,67
18°C	MS	4ppmBAP+0,5ppmIBA	91,70	0,73	5,58	1,65
18°C	AM	0	25,00	2,00	3,20	2,40
18°C	AM	0	80,00	2,50	2,50	1,88
18°C	AM	0,5ppmBAP	25,00	1,00	5,50	2,00
18°C	AM	0,5ppmBAP	85,00	1,71	6,88	1,94
18°C	AM	1ppmBAP	30,00	0,67	8,50	1,83
18°C	AM	1ppmBAP	65,00	1,69	6,46	1,77
18°C	AM	4ppmBAP+0,5ppmIAA	50,00	0,90	6,40	1,45
18°C	AM	4ppmBAP+0,5ppmIAA	81,20	1,00	7,69	1,62
18°C	AM	4ppmBAP+0,5ppmIBA	65,00	0,00	5,92	1,88
18°C	AM	4ppmBAP+0,5ppmIBA	85,00	1,00	4,33	9,83
18°C	WP	0	35,00	3,00	3,86	2,00
18°C	WP	0,5ppmBAP	50,00	2,88	6,13	2,25
18°C	WP	1ppmBAP	41,66	1,20	5,40	2,10
18°C	WP	4ppmBAP+0,5ppmIAA	60,00	0,23	6,69	2,31
18°C	WP	4ppmBAP+0,5ppmIBA	50,00	0,38	9,13	2,38
18°C	AM	0	50,00	1,50	5,40	2,40
18°C	AM	0,5ppmBAP	62,50	1,20	6,30	1,90
18°C	AM	1ppmBAP	45,00	0,67	6,56	2,06
18°C	AM	4ppmBAP+0,5ppmIAA	65,00	0,00	9,92	2,23
18°C	AM	4ppmBAP+0,5ppmIBA	75,00	0,00	9,79	1,82
18°C	MS	0	25,00	1,25	5,75	1,63
18°C	MS	0,5ppmBAP	43,75	0,43	7,14	1,79
18°C	MS	1ppmBAP	33,33	0,75	6,00	1,88
18°C	MS	4ppmBAP+0,5ppmIAA	58,30	0,00	6,86	1,86
18°C	MS	4ppmBAP+0,5ppmIBA	66,66	0,00	5,50	1,75
4°C	WP	0	15,00	1,00	6,67	1,87
4°C	WP	0	75,00	2,17	4,08	2,21
4°C	WP	0,5ppmBAP	11,80	1,00	11,50	2,25
4°C	WP	0,5ppmBAP	95,00	2,68	9,47	2,61
4°C	WP	1ppmBAP	15,00	0,67	10,67	4,00
4°C	WP	1ppmBAP	90,00	1,94	9,78	2,33
4°C	WP	4ppmBAP+0,5ppmIAA	11,80	0,00	12,50	2,75

4°C	WP	4ppmBAP+0,5ppmIAA	66,70	0,63	7,25	1,81
4°C	WP	4ppmBAP+0,5ppmIBA	15,00	0,00	6,67	1,83
4°C	WP	4ppmBAP+0,5ppmIBA	58,00	0,43	7,29	1,50
4°C	MS	0	81,25	1,62	4,08	2,00
4°C	MS	0	75,00	2,17	4,08	1,42
4°C	MS	0,5ppmBAP	75,00	2,44	10,78	2,78
4°C	MS	0,5ppmBAP	80,00	2,33	9,00	3,06
4°C	MS	1ppmBAP	67,00	2,63	12,25	3,56
4°C	MS	1ppmBAP	75,00	2,25	7,92	2,67
4°C	MS	4ppmBAP+0,5ppmIAA	92,00	0,73	11,27	2,45
4°C	MS	4ppmBAP+0,5ppmIAA	85,00	2,76	8,76	2,24
4°C	MS	4ppmBAP+0,5ppmIBA	67,00	1,75	12,75	2,63
4°C	MS	4ppmBAP+0,5ppmIBA	85,00	2,47	9,12	2,24
4°C	AM	0	64,00	1,29	8,57	2,86
4°C	AM	0	85,00	2,18	6,53	2,09
4°C	AM	0,5ppmBAP	75,00	1,22	8,89	3,11
4°C	AM	0,5ppmBAP	83,00	0,80	8,30	2,10
4°C	AM	1ppmBAP	95,00	1,75	13,17	3,58
4°C	AM	1ppmBAP	100,00	1,21	8,05	2,16
4°C	AM	4ppmBAP+0,5ppmIAA	80,00	0,88	9,88	2,44
4°C	AM	4ppmBAP+0,5ppmIAA	90,00	0,88	9,33	1,86
4°C	AM	4ppmBAP+0,5ppmIBA	83,00	0,40	9,30	2,25
4°C	AM	4ppmBAP+0,5ppmIBA	100,00	1,95	9,60	2,23
4°C	WP	0	43,75	2,00	5,14	2,00
4°C	WP	0,5ppmBAP	55,00	2,91	9,18	2,27
4°C	WP	1ppmBAP	55,00	1,91	9,36	2,27
4°C	WP	4ppmBAP+0,5ppmIAA	41,66	0,00	8,00	2,40
4°C	WP	4ppmBAP+0,5ppmIBA	50,00	0,00	11,00	2,08
4°C	AM	0	75,00	1,25	8,00	1,79
4°C	AM	0,5ppmBAP	81,25	1,77	9,54	2,31
4°C	AM	1ppmBAP	87,50	2,50	8,79	2,07
4°C	AM	4ppmBAP+0,5ppmIAA	81,25	1,54	9,46	2,04
4°C	AM	4ppmBAP+0,5ppmIBA	80,00	1,44	8,69	2,09
4°C	MS	0	65,00	3,38	8,62	2,35
4°C	MS	0,5ppmBAP	75,00	4,11	8,22	2,22
4°C	MS	1ppmBAP	68,75	2,55	8,73	2,41
4°C	MS	4ppmBAP+0,5ppmIAA	87,50	1,57	9,07	2,18
4°C	MS	4ppmBAP+0,5ppmIBA	75,00	2,67	9,25	2,21

