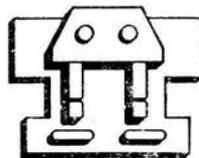




UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO

CAMPUS IZTACALA



BO 1258/96
Ej. 3

TESIS PROFESIONAL

PROPAGACION in vitro DE AGUACATE
(Persea americana Mill) Var. Fuerte.

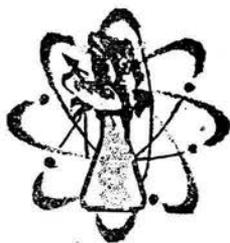
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I O L O G O

P R E S E N T A N :

GUADALUPE FABIOLA ARCOS ORTEGA

CARLOS IVAN PEREZ ROSTRO



DIRECTORA DE TESIS: BIOL. JOSEFINA GONZALEZ JIMENEZ

400282



61060

Los Reyes Iztacala, Edo. de México.

1996



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Esta tesis esta dedicada a quien es y será siempre lo que más ama mi corazón y que con su esfuerzo y sacrificio supo sacar a una familia adelante y no sólo eso, sino puso con el ejemplo el camino a seguir de sus hijos; este trabajo es un homenaje a esa persona que con su cariño y entrega me ha enseñado a nunca darme por vencido y ha logrado todo lo que me proponga. A ella como una recompensa a su amor, apoyo, comprensión y confianza incondicional y que con esto empiezo a pagar todos sus desvelos y que no sea la única gran satisfacción que le de.

Con todo el amor del mundo

GRACIAS MAMÁ

A ti Pepe por estar conmigo compartiendo los momentos importantes de mi vida y por el gran apoyo que me has brindado.

A ti Sergio, que por ser el mayor tuviste que cargar con muchas culpas y siempre estuviste al pie del cañón. Por tu amor, apoyo, comprensión y confianza incondicional.

Gracias hermano

A mi Abuelita y mi tía que se desvelo tantas veces conmigo, a ellas por su cariño, cuidados y confianza, nunca tendría con que pagarles todo lo que han hecho por mi. A David por su alegría.

A mi hermanito Pepito que con su amor y dulzura siempre ha alegrado mi vida.

A mi "Pollito" con cariño, que ha sabido ser la mejor compañera que uno puede tener y que me a aguantado tanto.

Gracias amor.

Carlos Iván Pérez Rostro

Dedico esta tesis

Al ser que más amo y el más importante de mi vida, por estar conmigo en los momentos más importantes de mi vida y ser la fuerza que me impulsa a seguir adelante, por escucharme dándome todo su cariño, apoyo y confianza incondicional; por todos sus desvelos y sobre todo por ser una mujer excepcional que siempre ha llenado de felicidad todos los momentos de mi existencia.

Con todo mi cariño

PARA "MI MAMÁ"

A mis hermanos (Maria, Miguel Angel, Silvia, Martha, Alejandro, Mario, José y Agustín; por toda una vida de lucha y sacrificio, por todo lo que me han brindado, por su confianza y gran apoyo al permitirme seguir estudiando y llegar hasta este momento. Nunca tendré con que pagarles todo lo que han hecho por mí.

Espero seguir contando con su confianza siempre.

A mi papá por su cariño y apoyo.

A mis sobrinas (Erika, Karla y Joana) por escucharme, por su cariño y por el esfuerzo que han hecho por seguir estudiando.

A Andrés, Juan Carlos, Emilio y Edgar, por su amistad, por su ayuda, por hacer esos momentos difíciles más tolerables y aguantar mis malos momentos.

A ti "Flaquito" por todo tu cariño, compañía, apoyo y paciencia

GRACIAS

Guadalupe Fabiola Arcos Ortega

AGRADECIMIENTOS

Un cariñoso agradecimiento a nuestra directora de tesis, *Biól. Josefina González Jiménez* por todo su apoyo, asesoría, comprensión y amistad.

Al Dr. Federico García Santibañes que hizo posible el poder formar parte del Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares

Al Ing. Eulogio de la Cruz Torres por su amistad, comentarios y apoyo.

Un agradecimiento especial a la futura *M. en C. Silvia Aguilar Rodríguez* por sus contribuciones en el campo de la histología y la anatomía, así como por su tiempo y apoyo, sin el cual no hubiera sido posible terminar satisfactoriamente este trabajo.

Al M. en C. José Gúzman por su valiosa aportación en el campo de microscopía electrónica de barrido.

Al Dr. Ernesto Aguirre por su apoyo y sus amables comentarios.

Por los valiosos comentarios, críticas y sugerencias a nuestros revisores de tesis:
M. en C. Ignacio Peñalosa Castro, Biol. Silvia Aguilar Rodríguez, Biol. Gerardo Ortíz Montiel y Biol. Alberto Arriaga Frias.

Al Dr. Pedro, Lupita, Juan Antonio y Lulú del departamento de Genética del Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares, por su tiempo y apoyo.

Agradecemos a todos nuestros *profesores, compañeros y amigos* quienes con su enseñanza y compañía hicieron de la escuela y de las prácticas de campo un lugar agradable.

GRACIAS

CONTENIDO

Resumen	1
Introducción	3
El aguacate.....	6
Propagación " <i>in vitro</i> " de aguacate.....	13
Antecedentes	21
Objetivos	22
Material y Método	23
Diseño experimental.....	32
Resultados y Discusión	33
<i>Etapa I</i>	33
<i>Etapa II</i> . Desinfestaciones.....	36
<i>Etapa III</i> . Medios nutritivos.....	43
Anatomía " <i>in vivo</i> ".....	54
Anatomía " <i>in vitro</i> ".....	56
Conclusiones	62
Sugerencias	63
Apéndice I	64
Apéndice II	66
Apéndice III	67
Glosario	69
Referencias	72

RESUMEN

El aguacate (*Persea americana* Mill) es un fruto que posee valiosas propiedades nutritivas, por lo que es considerado como una alternativa para la alimentación mundial. Sin embargo, su cultivo es afectado gravemente porque presenta problemas de enraizamiento, sensibilidad a salinidades altas, sequías, bajas temperaturas, ataque de patógenos, entre otros; por lo que en los últimos años se han desarrollado técnicas de propagación en donde emplean la etiolación e injerto en patrones nodriza, pero son procedimientos a largo plazo y generalmente sólo el 25% forma plántulas completas.

Dado el contexto anterior y debido a la gran necesidad de contar con una metodología adecuada para la micropropagación del aguacate y contribuir así en la búsqueda de técnicas que ayuden a resolver la problemática existente en su cultivo, se realizó el presente trabajo, que tuvo como objetivo establecer la propagación *in vitro* de la variedad Fuerte y contribuir al conocimiento de las características anatómicas del tallo, peciolo y hoja; de los explantes desarrollados *in vivo*; así como realizar la descripción anatómica comparativa de tallos "*in vitro*" y los desarrollados *in vivo*. La metodología consistió en 2 fases: una experimental y una descriptiva, en la primera se estableció un método de desinfestación, para lo cual se realizaron 8 pruebas de desinfestación, 4 basadas principalmente en hipoclorito de sodio y 4 basadas en el bicloruro de mercurio, de las cuales se obtuvo una mejor respuesta en cuanto al porcentaje de contaminación y de oxidación con una concentración de 0.05 mg/l. de bicloruro de mercurio. Por otra parte, se probaron 11 medios nutritivos basados en las sales de Murashige y Skoog (1962), adicionados con las siguientes hormonas: BAP, Kin, AIA, AIB y AG₃, en diferentes concentraciones; obteniendo los mejores resultados con el BAP a una concentración de 0.0001 mg/l. Por otra parte, se realizó un estudio anatómico que consistió en: a) descripción anatómica del tallo, peciolo y hoja de explantes desarrollados *in vivo* y b) la descripción de tallo *in vitro*, para observar cambios a nivel histológico de los explantes obtenidos de esta manera; por lo que se realizaron cortes transversales (tallo, hoja y peciolo) y longitudinales (tallo) a mano

alzada y en cryotomo (15μ). Se realizaron preparaciones permanentes empleando la técnica histológica para microscopio óptico; así mismo se realizaron observaciones en microscopio electrónico de barrido. Se obtuvo material disociado, utilizando la técnica modificada de Jeffrey. Se analizaron algunas características celulares como pared, diámetro y longitud de los elementos de vasos.

Los resultados muestran que en general no hay diferencias anatómicas significativas entre el crecimiento obtenido *in vitro* e *in vivo*. Excepto en el tallo desarrollado *in vitro*, donde se observó a nivel de cortex la presencia de zonas de alta proliferación celular, que son las que dan lugar a la formación de callo.

INTRODUCCIÓN

La micropropagación se refiere al cultivo artificial de algunas partes de las plantas, ya sea una célula, un tejido o un órgano, en condiciones de asépsia y con parámetros controlados.

Las técnicas de cultivo *in vitro* han revelado la capacidad única de algunas células vegetales de generar plantas completas. Este proceso es conocido como *totipotencialidad celular* y es la base de una gran variedad de aplicaciones prácticas de técnicas *in vitro* en la agricultura.

Las más comunes y visibles aplicaciones del cultivo de tejidos son la rápida propagación clonal y la eliminación de virus. Por lo que el cultivo *in vitro* es un medio excelente para el transporte de plantas libres de patógenos a través de las fronteras sin peligro de diseminación de patógenos. Así mismo es particularmente importante para la conservación de germoplasma de cultivares propagados vegetativamente. Además la técnica de cultivo *in vitro* permite el cultivo de una gran cantidad de poblaciones de células de planta y propágulos (embriones somáticos), contribuyendo de esta forma a aumentar la producción de una gran cantidad de especies vegetales.

Actualmente esta técnica representa un método seguro y totalmente establecido, que ha promovido un impulso repentino de la Biología y en particular de la fisiología vegetal al verse como herramienta en estudios básicos donde se han dilucidado procesos celulares, conocimientos que se han aprovechado para incrementar la producción y la calidad de los mismos, evitando en algunos casos la desaparición de ciertas especies.

Una de las especies vegetales, en donde es importante la utilización de esta técnica, es el aguacate (*Persea americana* Mill), el cual es un fruto que posee valiosas propiedades nutricionales por su contenido de grasas, proteínas, minerales y vitaminas, características que le confieren grandes posibilidades en el aumento de su consumo en la dieta humana, por lo que es considerado como una alternativa para contribuir a resolver el problema alimentario mundial (Sánchez Colín, 1994) Actualmente se está desarrollando su industrialización en la producción de alimentos, extracción de aceites y productos farmacológicos (Rodríguez, 1982).

En México, hasta hace algunas décadas, se intentaba aumentar la producción agrícola de aguacate utilizando el cultivo masivo por medio de la invasión de nuevas tierras, sin embargo, la gran dificultad que representa el manejo del huerto, ha provocado el abandono parcial o total de estas.

Los problemas principales a los que se han enfrentan los productores de aguacate son:

- a) Deterioro de los suelos por condiciones adversas (salinidad, alcalinidad y temperatura).
- b) Ataque de algunos agentes patógenos, principalmente: *Phytophthora cinnamomi* que provoca la "Tristeza del aguacate" que afecta al 70% de la superficie cultivada en México; *Oligonychus punicae* (araña roja), *Heliethrips haemorroidalis* (periquito del aguacate), y *Sphaceloma perseae* (antracnosis), que causan graves daños a los frutos, reduciendo la producción hasta en un 30%.
- c) Porte alto de los árboles, que dificulta la cosecha y propicia bajas densidades de plantación.
- d) Largo ciclo de desarrollo que implica, esperar 5 ó 7 años para poder evaluar la productividad de los individuos, lo que involucra elevados costos, requiriéndose además, grandes extensiones de terreno.

Ante esta problemática el cultivo de tejidos representa una actividad altamente rentable que ofrece la optimización de los cultivos con un nulo sacrificio de tierras y la explotación de variedades comercialmente importantes; puesto que se realiza en espacios reducidos con condiciones controlables, durante todo el año, sin faltar la calidad y fitosanidad del material propagado.

Por otra parte, tradicionalmente el aguacate es propagado vegetativamente, al injertar la variedad deseada sobre portainjertos adecuados, dependiendo de las condiciones agroecológicas, (principalmente edáficas), que imperen en el lugar donde se establecerá el cultivo. En nuestro país en la mayoría de los casos se emplea porta-injertos de árbol de la raza mexicana, que difieren genéticamente unos de otros, lo que ejerce influencia en la variedad injertada (De la Cruz, 1994).

De aquí que las técnicas *in vitro* resulten una opción en cuanto a propagación se refiere, ya que permitiría obtener tanto variedades sobre sus propias raíces, como la propagación masiva de porta-injertos resistentes a factores bióticos o abióticos adversos, con un elevado nivel de sanidad.

Por ello, es de suma importancia apoyar la investigación en este rubro con el objeto de desarrollar los sistemas de cultivo que permitan seleccionar o transferir algunos rasgos deseables y con ello clonar las plantas mejoradas.

EL AGUACATE

El aguacate (*Persea americana* Mill) es un fruto cuyo nombre procede de la palabra Nahuatl "ahuacacahuitl", que es una combinación de: "ahuacatl" (testículo) y "cahuitl" (árbol) (Memoria, 1985. CICTAMEX), recibiendo además otros nombres como: "palta" en Sudamérica, "avocado o avocado pear" en la lengua inglesa, "avocatier" en francés y "abacate" en portugués.

Este frutal es originario de México y de América Central, su zona de dispersión se extiende desde las grandes elevaciones sobre el nivel del mar (con inviernos relativamente fríos, pero sin heladas), hasta las regiones costeras de clima cálido (tanto húmedo como seco), pasando por elevaciones intermedias de condiciones climatológicas variadas, (Levine, 1982).

Se tiene conocimiento de que el aguacate ya se conocía en América desde mucho antes de la Conquista, ya que según los cronistas de esa época, el fruto era uno de los preferidos por las poblaciones indígenas de América. Fue con la llegada de los Españoles que esta especie comenzó a dispersarse hacia el Viejo Mundo (Rubí, A. M; Avitia, G. E, 1995).

El aguacate es un fruto muy valioso por su alto contenido nutritivo; ya que de acuerdo con el Instituto Nacional de Nutrición (basándose en un análisis bromatológico), una muestra de 100g de pulpa de aguacate, presenta los siguientes componentes nutritivos:

Calorías	15.2 g	Hierro	0.53 mg
Proteínas	1.6 g	Tiamina	0.09 mg
Grasa	15.6 g	Riboflavina	0.14 mg
Hidratos de carbono	4.8 g	Niacina	1.9 mg
Calcio	24.0 mg	Ácido ascórbico	14.0 mg
Fósforo	47.0 mg		

Como se puede apreciar este fruto representa una fuente importante y sana de alimentación humana y estas características lo ubican entre las frutas con mayores perspectivas comerciales dentro y fuera del país. (Memoria, 1985. CICTAMEX). Asimismo

por su contenido en grasa, es utilizado en la industria de la cosmetología para la preparación de cosméticos, lociones y jabones para el tratamiento del cuero cabelludo, pelo y piel; mientras que en medicina es considerado como antidisentérico y restablecedor del equilibrio de las funciones intestinales (Rodríguez, 1982).

Sistemática

Con respecto a su taxonomía, han surgido muchas opiniones a través del tiempo; sin embargo, la mayoría coincide con la siguiente: (Levine, 1982; Rubí, A. M; Avitia, G. E, 1995).

DIVISIÓN:	Espermatophyta
SUBDIVISIÓN:	Angiosperma
CLASE:	Dicotyledonea
ORDEN:	Ranales
FAMILIA:	Lauraceae
GÉNERO:	<i>Persea</i>
SUBGÉNERO:	<i>Persea</i>

Desde el punto de vista ecológico se agrupa al aguacate en tres razas o grupos, en razón principalmente, a algunas características morfológicas, fisiológicas y condiciones de adaptación climática, así tenemos: Raza Mexicana, Raza Guatemalteca y Raza Antillana (Cuadro1).

La hibridación ocurre fácilmente donde quiera que se encuentren mezclados árboles de las diferentes razas. (Popenoe, W. 1974).

Cuadro 1. Clasificación ecológica de aguacate.

CARÁCTER	RAZA MEXICANA	RAZA ANTILLANA	RAZA GUATEMALTECA
LOCALIZACIÓN Y ADAPTACIÓN CLIMÁTICA	Valles de México. ALTURA: 1,500 A 2,000 msn.m Semitropical.	Lugares cálidos con alta humedad relativa. ALTURA: 500 msn.m Tropical.	Castemla. ALTURA: 500 a 1,000 msn.m Subtropical.
TOLERANCIA AL FRÍO	ALTA Jóvenes: -3.5oC (variando de -3 a 4oC) Adultos: -5.5oC (variando de -4 a 7oC)	MENOR Jóvenes: -1 a -1oC Adultos: -3 a -4oC	INTERMEDIA Jóvenes: -2 A -4oC Adultos: -3 a -5oC
CONDICIONES DEL SUELO (SALINIDAD)	MENOR Sensible a suelos calcáreos y salinidad (pH óptimo: 5.5-6.5)	MAYOR Resistentes al calcio y a la salinidad (250 a 350 ppm)	INTERMEDIA
TALLO	Árboles altos, con corteza delgada y gran cantidad de lenticelas	Árbol no tan vigoroso	Árbol grande y frondoso
RAMIFICACIONES	Abundantes y delgadas; con ramificaciones "chuponas"	No produce "chuponas"	En algunas ocasiones produce "chuponas"
HOJAS	Elípticas, de 8-10cm, verdes oscuras y lustrosas, con olor a anís	Elípticas, de 26 cm, verde claro amarillento, inodoras	Anchas y largas, de 15 a 18 cm, rojizas, inodoras
BROTOS	Verde pálido o plateado, vellosos	Primero rojizos tornándose después verdes amarillosos, sin vellosidades	Vellosos
FLORES	Verde claro	Verde claro	Verde claro
ÉPOCA DE FLORACIÓN	Temprana (octubre-diciembre)	Tardía (julio-septiembre)	Media (Marzo-abril)
FRUTO	PEDICÉLO corto; COLOR: verde o casi negro; FORMA: alargada; TAMAÑO: pequeño; PESO: menor a 250g; CORTEZA: muy delgada, lisa y cerosa; %ACEITE: muy alto (12%-27%); PULPA: blanqueada verdosa, sabor semejante a anís y con fibras comunes; SEMILLA: grande con superficie lisa, cavidad holgada, e integumentos delgados. Este fruto presenta más tolerancia al frío.	PEDICÉLO corto; COLOR: rojizo; FORMA: alargada TAMAÑO: variable; PESO: de 250g a 2.5 kg; CORTEZA: delgada, lisa y brillante; %ACEITE: bajo (10%); PULPA: abundante amarilla, poco dulce y con fibras poco comunes; SEMILLA: grande con superficie rugosa, cavidad holgada, e integumentos gruesos. Este fruto tiene menos tolerancia al frío.	PEDICÉLO largo COLOR: verde claro, FORMA: redonda TAMAÑO: de mediano a grande PESO: de 125 a 2.5 kg; CORTEZA: gruesa, dura y rugosa; %ACEITE: alto (20%); PULPA: abundante, amarilla y dulce, con fibras poco comunes; SEMILLA: pequeña con superficie lisa, cavidad reducida, e integumentos delgados. Este fruto presenta más tolerancia al frío
FLORACIÓN-RECOLECCIÓN	7 meses (variando de 6 a 8)	6 meses (variando de 5 a 8)	10 a 15 meses
VIDA DEL FRUTO POSTCOSECHA	8 a 10 días	4 ó 5 días	5 meses

El cultivar Fuerte que ha permanecido mucho tiempo en producción en California y muchas regiones subtropicales es aparentemente un híbrido natural de las razas Mexicana y Guatemalteca, (Rodríguez, 1982). Esta variedad posee una marcada tendencia a la alternancia de la producción; el árbol es poco desarrollado y sus ramas se extienden hacia el costado y abajo; la baya tiene forma piriforme, peso medio de 300 gramos (entre 200 y 350 g), su epidermis es flexible y elástica, de color verde sin brillo, su mesocarpo es vistoso y no posee fibras, dándole una buena calidad culinaria, con semilla mediana de forma cónica y muy adherida a la pulpa, la cual, presenta un contenido oleoso del 22% (oscilando entre 15 y 26%). Su calidad y resistencia al transporte (que es una importante característica comercial) lo ubican entre los aguacates más difundidos en América y Europa. Frecuentemente en la producción comercial se le intercala con la variedad Topa-topa y en México con la Hass como polinizadoras.

Para hacer hincapié en el valor nutritivo de la variedad Fuerte y de los aguacates en general, se menciona a continuación el contenido bromatológico de esta variedad:

Cuadro 2. *Contenido bromatológico de la variedad Fuerte.*

COMPONENTE	PORCENTAJE
Peso medio grs	306.9
Humedad	63.8
Proteínas	2.10
Grasas	19.3
Carbohidratos	4.0
Minerales	2.7
Fibra cruda	8.1
Pulpa	79.23

Fuente: CICTAMEX (Memoria 1982-1985)

En el presente estudio se decidió trabajar con esta variedad debido a su alta resistencia a ciertas condiciones como bajas temperaturas, salinidad, sequías, entre otros, y por ser endémico de México. Levine, (1982), Sánchez y Rubí, (1994). Además, debido a las características nutritivas del fruto se encuentra dentro de las variedades más importantes de exportación por nuestro país.

Crecimiento y Desarrollo

En el proceso de crecimiento y desarrollo del aguacate, se presenta la *fase vegetativa*; en la cual se llevan a cabo 5 estados fenológicos (A, B, C, D y E), de acuerdo a la evolución y desarrollo de las yemas vegetativas. De acuerdo a Rodríguez,(1982):

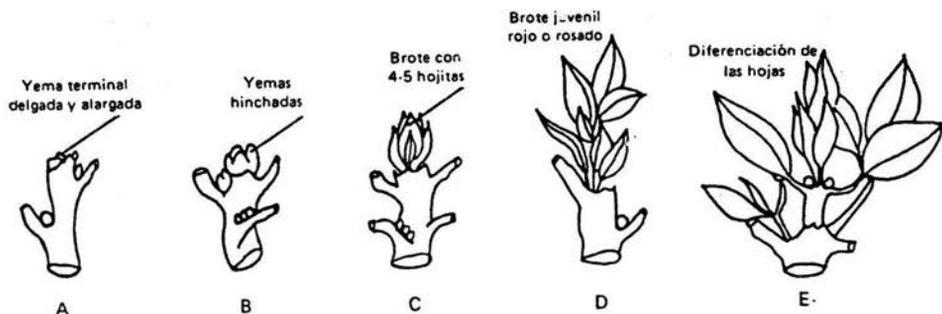
Estado A. Comienza cuando una rama ha terminado su crecimiento (con una yema terminal que se identifica por ser delgada y de forma alargada, presentando en las axilas de las hojas, yemas anticipadas), esta rama puede conservar este mismo estado si entra en un nuevo período de reposo, parcial o prolongado, según las razones de carácter interno (genético) o externo (medio ambiente) de la latencia.

Estado B. Corresponde a la actividad meristemática que comienza a desarrollar las yemas, presentando éstas una forma más hinchada y las escamas que las cubren empiezan a separarse (debido a la presión de la división celular que ocurre en el interior de la yema). Las yemas toman una coloración amarillenta característica, mientras los entrenudos comienzan a agostarse o están en vías de agostamiento.

Estado C. Continúa la separación de las escamas, comenzando a aparecer en el extremo del brote un número de nuevas hojitas (entre 4 ó 5), mientras las yemas anticipadas adyacentes tienden a evolucionar (pudiendo también no hacerlo). En general la dominancia de las yemas apicales es relativa en el aguacate.

Estado D. El brote juvenil ya tiene un estado avanzado, en donde las yemas originales son hojitas bastante desarrolladas, pero no son totalmente funcionales y poseen una coloración que va desde el rojo intenso al rosado.

Estado E. Se diferencian aún más las hojas, separándolas, (aunque conserven la coloración rojiza), y el limbo todavía no es totalmente funcional. en este estado finaliza la maduración de las hojas. Estas toman el color verde característico conectando así el espiral vegetativo A. (Dibujo 1).



Dibujo 1. Fases del crecimiento vegetativo.

Generalidades del Cultivo

Hasta ahora el aguacate se ha reproducido por semilla (reproducción sexual), y para establecer un cultivo comercial, se multiplica por injerto utilizando plantas procedentes de semillas. Pero dado que las plantaciones establecidas de esta manera sufren grandes variaciones en cuanto a vigor, longevidad y resistencia al frío y a las enfermedades, comunicadas precisamente, en la mayoría de los casos, por los porta-injertos que los sostienen, no hay garantía de un rendimiento aceptable de la inversión de una plantación comercial, ya que son considerables los riesgos a los que queda expuesta tal plantación por desconocerse los caracteres genéticos de las plantas procedentes de aquellas semillas. Es por ello que se ha intentado recurrir al cultivo *in vitro*, camino capaz de asegurar porta-injertos genéticamente idénticos, que garantizan las mejores condiciones posibles a la explotación.

Situación Actual del Cultivo (Producción y Comercialización)

Para México el cultivo de aguacate es muy importante, pues a nivel mundial es reconocido como el primer productor y consumidor de aguacate, con una producción de 1,100,000 toneladas en una superficie de 124 829 hectáreas, distribuidas en 16 Estados donde se maneja a nivel comercial siendo 5 los de mayor importancia. (Cuadro 3), (Sánchez y Rubí, 1994).

Cuadro 3. Principales Estados productores de aguacate.

ESTADO
Michoacán
Puebla
Estado de México
Morelos
Navarrit

Fuente: CICTAMEX (Memoria 1994)

Michoacán es el principal estado productor, con una superficie de 90,000 hectáreas y con una producción de 871 873 toneladas, lo que representa el 72% de la producción total del país

El Estado de México, también es una entidad que presenta amplios recursos tanto disponibles como potenciales, produciendo variedades mejoradas como Fuerte, Hass, Colín V33, y Bacon que son las más cotizadas (Sánchez y Rubí. 1994).

La variedad explotada que predomina, en general, es la Hass, ocupando un 95% de las plantaciones, seguida por Fuerte, Bacon, Zutano, Rincon, Choquette, Boot 7, Boot 8 y Criollos regionales.

A pesar de que la producción de México es bastante elevada, nuestro país no es un fuerte competidor en el mercado internacional, pues sólo exporta una parte de su producción, mientras que países como Israel, Sudáfrica y Chile, venden en los mercados del exterior más de la mitad de su producción. Los principales destinos del aguacate mexicano son: Francia, Estados Unidos, Canadá y Japón, dentro de los cuales, Francia es nuestro principal mercado al que se le envió el 64% del total exportado por México durante 1993.

A partir de estas condiciones y por el aumento creciente del consumo de aguacate, se deben buscar nuevas tecnologías y técnicas de propagación con el fin de resolver ésta problemática; con el propósito final de aumentar la producción, ya que cada vez la demanda de aguacate seguirá creciendo considerablemente, una vez que se logre una mejor apreciación sobre este fruto y se difunda el conocimiento sobre sus propiedades nutritivas.

PROPAGACION *in vitro* DE AGUACATE

En lo que se refiere a la propagación *in vitro* de aguacate, se han intentado propagar especies del género *Persea* como: *P. indica* (Nel, et al. 1982); *P. schideana* (González-Rosas, et al. 1985); y *P. americana* (Schroeder, 1971 y Yasseen Mohamed, 1993a); así como las siguientes variedades: Hass (Schroeder, 1971), Fuerte (Skene y Barlass, 1983), Dade, Maxima, Tower 2, Waldin y Choquete (Yasseen Mohamed, 1993); probando diferentes condiciones de cultivo, por ejemplo, entre los tipos de explantes, empleados se encuentran: Pericarpio (Schroeder, 1971), brotes y partes florales (Schroeder, 1975), segmentos de tallo (Schroeder, 1976; Nel y Kotze, 1982; Pliego-Alfaro y Murashige, 1987), ápices (Harty, 1985), embriones maduros e inmaduros (González-Rosas, et al. 1990) y ejes embrionarios (Yasseen Mohamed, 1993a)

La longitud de los explantes de aguacate utilizados ha sido de 1 mm para el cultivo de puntas (Schroeder, 1973), 3 mm en el cultivo de brotes apicales (Schroeder, 1971), 5 mm en el cultivo de ejes embrionarios (Yasseen Mohamed, 1993a), 8 mm para el cultivo de pericarpio (Schroeder, 1971), 20 mm (Skene y Barlass, 1983) y 1.5 cm en el cultivo de embriones (Llano, A. 1989). Sin embargo, Levine, 1982; reporta como mejor explante, aquel cuyas dimensiones son: 2.5-6.0 cm con 0.35 mm de diámetro para el cultivo de segmentos de tallo.

Como medios basales se han empleado diferentes fórmulas nutritivas y/o modificaciones de estas, debido a que han sobresalido por su efectividad para el desarrollo de los explantes, entre estos se encuentran:

Medio de White (1943). El cual presenta un bajo nivel de potasio y nitrógeno, es utilizado generalmente para el cultivo de callo.

Medio de Nitschs (1951). Se emplea frecuentemente para el desarrollo de algunas especies ferodependientes como: *Strelitzia reginae* y *Anthurios sp.*, entre otras (Tomado de Conger, 1987).

Estos medios han sido empleados por Skene y Barlass, (1983), en el cultivo de embriones inmaduros de árboles de aguacate pertenecientes a la variedad Fuerte y por Schroeder, (1975) en

el cultivo de yemas y partes florales, con los cuales observaron el desarrollo de callo. Schroeder, (1968) empleó el medio de Nitstchs, (1951) sustituyendo el Fe-EDTA por el citrato de hierro, en el cultivo de cotiledones de semillas de aguacate, observando la formación de callo.

Medio de Murashige y Skoog, (1962). Es una modificación del medio de White (1943) elevando el contenido de nitratos, potasio y amonio; actualmente se utiliza para una gran variedad de monocotiledóneas y dicotiledóneas . Es el más empleado en la micropropagación de *Persea sp.* por la mayoría de los investigadores (Schroeder, 1975, 1979; Nel y Kotzé, 1982; Skene y Barlass, 1983; Nel y de Lange, 1985; Llano, A, 1989; González-Rosas y Salazar García, 1984 y González-Rosas, et.al. 1990, 1991) quienes lo han utilizado en forma sólida o líquida, con algunas modificaciones, por ejemplo, Harty, (1985) duplicó la concentración de hierro del medio MS basal, para el cultivo de semillas jóvenes, observando una estimulación de la formación de brotes. Así también ha sido empleado en forma líquida con la mitad de la concentración de sus componentes nutritivos, en el cultivo de ápices de brotes (Nel y Kotzé, 1982), observando resultados favorables. y en el cultivo de embriones maduros de la variedad Fuerte (Skene y Barlass, 1983).

Las vitaminas que se utilizan más frecuentemente son:

Tiamina

Acido nicotínico (niacina)

Piridoxina (vitamina B₆)s

Acido pantoténico, s

Acido fólico,

Riboflavina (vitamina B₂)

Vitamina E

Son necesarias para llevar a cabo una serie de reacciones catalíticas en el metabolismo y son requeridas en pequeñas cantidades, sin embargo, se ha observado que algunos explantes como los embriones (al ser autótrofos) pueden ser capaces de producir sus propias necesidades vitamínicas a través de biosíntesis celular, por ejemplo en el rescate de embriones de aguacate (Skene y Barlass, 1983) se logró su desarrollo sin vitaminas.

Raghavan, (1980) (citado por Llano, A, 1989) hace notar que la tiamina-HCl ejerce su efecto en el alargamiento de raíces, mientras que la niacina o ácido nicotínico y el ácido pantoténico estimulan el alargamiento de brotes.

Generalmente la tiamina-HCl se ha utilizado en el cultivo *in vitro* de *Persea sp.* en un rango de 0.4-1 mg/l. Pliego-Alfaro y Murashige, (1987) la utilizaron a una concentración de 0.4 mg/l en la germinación de embriones. Solorzano, (1989) también la utiliza a una concentración de 0.4 mg/l en el cultivo de yemas axilares. Por otra parte Nel y Kotzé, (1982) y González-Rosas, et al. (1990) la emplearon a una concentración de 1 mg/l.

El ácido nicotínico (niacina), la piridoxina-HCl y el ácido pantótenico en la propagación *in vitro* de *Persea sp.* son empleados en un rango de 1-5 mg/l (Nel y Kotzé, 1982, González-Rosas y Salazar García, 1984; González-Rosas, et al. 1985, 1990 y Yasseen Mohamed 1993a). Mientras que, el ácido fólico, la riboflavina (B₂) y la vitamina E son raramente usadas.

Los reguladores del crecimiento (fitohormonas o fitorreguladores) son los elementos esenciales para el adecuado crecimiento, diferenciación y desarrollo del inóculo; aunque se ha reportado el crecimiento de plántulas en medios nutritivos carentes de hormonas. Deben agregarse al medio a bajas concentraciones para proseguir el desarrollo del implante.

Dentro de las *auxinas*, tenemos que el ácido-indol-3-acético (AIA) es el principal agente enraizante utilizado, pero desafortunadamente es degradado por la luz y la oxidación enzimática; llevada a cabo por enzimas AIA-oxidadas, por lo que éste es agregado en relativas altas concentraciones (1-30 mg/l). AIB es el fitorregulador que comúnmente se usa para sustituir al AIA en el cultivo de tejidos; ya que su estructura molecular es muy similar a la del AIA, además no es degradado por la oxidación enzimática. (Llano, A, 1989).

En el cultivo *in vitro* de *Persea sp.* el AIA sólo ha sido utilizado para cultivar yemas, partes y pericarpio a una concentración de 10 mg/l por Schroeder, (1956, 1968, 1975), quien reporta desarrollo de callo.

El ácido 3-indol butírico (AIB) ha sido empleada a una concentración de 0.01, 0.3, 1.0 y 3.0 mg/l en la propagación *in vitro* de *Persea sp.* (Skene y Barlass, 1983 y González-Rosas, et al. 1990); sin embargo, estos autores reportan que su adición individual no tiene efectos significativos en el crecimiento de brotes, raíces y en la germinación por lo que comúnmente se le combina con una citocinina como la cinetina o la bencil adenina (BA). González-Rosas, et al. (1990) observó que el desarrollo de brotes adventicios en embriones maduros era estimulado con

0.3 mg/l de AIB combinado con 3.0 mg/l y 1 mg/l de kinetina. Asimismo, 1 mg/l de AIB más 1 mg/l de kinetina, estimulan significativamente el crecimiento en longitud de brotes (12.5 cm). Por otra parte, se observó que concentraciones de 0.3 y 1.0 mg/l de AIB combinadas con 0.1 y 3.0 mg/l de kinetina, presentan grandes efectos en la elongación de raíces. Yasseen Mohamed, (1993a) observó el desarrollo de 2 tipos de raíz en el subcultivo de brotes provenientes de ejes embrionarios con una concentración de 2 mg/l de AIB

El ácido naftalenacético (ANA) es un regulador que tampoco es degradado por la oxidación enzimática, por lo que puede ser agregado a bajas concentraciones (0.1-2.0 mg/l). Se ha observado el desarrollo de brotes con 0.1 mg/l de ANA en el cultivo *in vitro* de ejes embrionarios de *Persea americana* Mill. (Yasseen Mohamed, 1993a) y formación de callo (Desjardin, 1958 y Schroeder, 1975) con este compuesto.

La auxina más efectiva para la formación de callo en la mayoría de los cultivos es el 2,4-D, frecuentemente en ausencia de alguna citocinina exógena. Este herbicida es un poderoso supresor de la organogénesis por lo que generalmente no puede ser usado en experimentos de iniciación de raíces y brotes. Skene y Barlass, (1983) y Pliego-Alfaro y Murashige, (1987) encontraron que a concentraciones de 0.01, 0.1 y 1 mg/l producen proliferación de callo en el cultivo de embriones inmaduros de aguacate.

En cuanto a las *citocininas* se ha determinado que las naturales presentan mayor efectividad que las sintéticas; sin embargo, en el cultivo de tejidos las más usadas son la cinetina y la bencil adenina, debido a que pueden estar disponibles un tiempo mayor puesto que no son degradadas por la citocinina-oxidasa como lo son las naturales.

La kinetina es típicamente agregada en una concentración de 0.1 mg/l para la inducción de callo. En frutales se ha empleado comúnmente para el cultivo *in vitro* de embriones en combinación con una auxina. González-Rosas y Salazar García (1984) usan grandes concentraciones de kinetina (3.0 mg/l) para estimular el desarrollo de brotes axilares en aguacate; asimismo, estos autores reportaron en 1990 que una concentración de 1.0 mg/l presenta mayores efectos que otras concentraciones.

La Bencil Adenina (BA) en el cultivo de tejidos de frutales se ha empleado en la inducción de brotación múltiple.

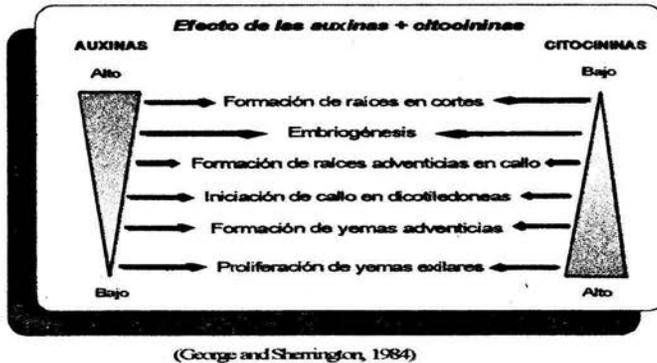
Al trabajar Skene y Barlass, (1983) con embriones híbridos de aguacate (*P. americana*) de reportan que en los embriones menores de 6 semanas la respuesta se ve inhibida, mientras que en los mayores de este tiempo, se producen brotes al estar en un medio con 0.5 mg/l de BA.

Yasseen Mohamed, (1993a) en el cultivo de ejes embrionarios reporta a concentraciones de 1, 2 y 3 mg/l de BA, la formación de brotes en 4-5 semanas, observando la formación de múltiples brotes conforme se incrementa la concentración de BA. Asimismo, observó la formación de múltiples yemas a una concentración de 0.2, 1 y 2 mg/l de Thidiazuron (TDZ) y pocos brotes a baja concentración (0.1 mg/l).

La 6-Bencil Amino Purina (BAP) ha sido utilizada a una concentración de 2 mg/l por Nel y Kotzé, (1982) quien reporta la formación de brotes.

En el cultivo *in vitro* se ha determinado que la diferenciación celular y morfogenesis son primariamente controladas por la interacción de auxinas-citocininas y en está relación se han basado algunas investigaciones del cultivo de aguacate (Figura 1).

Figura 1. Interacción auxinas/citocininas. (Tomado de Novac, 1991).



Las *giberelinas* son sustancias consideradas como fitohormonas naturales debido a que se encuentran distribuidas en pequeñas cantidades por toda la planta. En algunos casos actúan de

manera similar al A.I.A. ya que estimulan el alargamiento celular, inducen la partenocarpia y producen nueva síntesis de RNA y proteínas. Además de su papel sobre el alargamiento de los entrenudos, actúan como un factor que regula el crecimiento de éstos y el desarrollo de las hojas.

En general son pocos los autores que han empleado las giberelinas en el cultivo *in vitro* de *Persea sp.*, comúnmente se han usado en forma de GA3 (Acido Giberelico). Solorzano, (1989) reporta que una concentración de 2 mg/l incrementa substancialmente el crecimiento de yemas axilares.

También ha sido utilizado a una concentración de 0.5 mg/l por Nel y Kotzé, (1982) y 10 mg/l por Skene y Barlass, (1983).

Algunos autores le han otorgado al etileno las funciones de iniciación de yemas y diferenciación (Dodbs, J.H y L.W Roberts, 1986); sin embargo, junto con el ácido abscísico, raramente se han utilizado como suplemento en los medios de cultivo, ya que inhibe el crecimiento.

En cuanto a los aminoácidos se ha encontrado que no son esenciales para el crecimiento en cultivo de tejidos; sin embargo, proporcionan una fuente inmediata de nitrógeno y su entrada puede ser mucho más rápida que el nitrógeno en el mismo medio. También pueden actuar como agentes quelantes.

La mayoría de los investigadores emplean a la glicina, en una concentración de 2 y 3 mg/l en el cultivo *in vitro* de *Persea sp.* (Schroeder, 1968, 1971, 1975, 1977, 1979; Nel y Kotzé, 1982; González-Rosas, et.al. 1990), otros aminoácidos que han sido empleados en cantidades relativamente altas (40 mg/l) son la L-glutamina y la L-arginina (Harty, 1985).

La importancia del pH en la preparación de los medios de cultivo se detecta en el hecho de que los líquidos vitales contenidos en los seres vivos tienen valores de pH definidos, y que ciertos elementos en el exterior no se encuentran disponibles para la planta o sus explantes, fuera de ciertos rangos de pH.

En la micropropagación del género *Persea sp.* la sacarosa ha probado ser la más efectiva que otros azúcares, la cual se ha utilizado en un rango de 10g/l a 40g/l; siendo 30g/l la cantidad de uso más frecuente debido a la obtención de resultados favorables (Schroeder, 1968, 1971, 1975, 1977, 1979; Nel y Kotzé, 1982; Skene y Barlass, 1983; Levine, 1982; Solorzano, 1989; González-Rosas y Salazar García, 1984; González-Rosas, et. al. 1990 y Yasseen Mohamed, 1993a).

Como un sistema de “soporte”, se ha empleado el agar para la preparación de medios sólidos o semisólidos.

Generalmente para el aguacate se emplea el agar en un rango de 6 a 8 g/l (Skene y Barlass, 1983; Nel y Kotzé, 1982 y Schroeder, 1975, 1979).

Otros materiales utilizados como “soporte” son: vermiculita, y papel filtro en medios líquidos (Levine, 1982; Nel y Kotzé, 1982 y Skene y Barlass, 1983).

En cuanto a otros suplementos el agua de coco ha sido empleada por pocos autores con resultados favorables (Desjardin, 1958 y Schroeder, 1956, 1975). La caseína hidrolizada es un complejo de aminoácidos que es requerida principalmente para el desarrollo de embriones inmaduros. Skene y Barlass, (1983) lo han utilizado en el cultivo de estos a una concentración de 1 g/l.

El ácido ascórbico y el ácido cítrico se han utilizado como antioxidantes a una concentración de 25 mg/l (Nel y Kotzé, 1982).

El uso de carbón activado ha dado buenos resultados en el enraizamiento de explantes de aguacate, a una concentración de 10 mg/l (Pliego-Alfaro y Murashige, 1987) y de 0.75 mg/l (Levine, 1982).

El rango de temperatura frecuentemente utilizado en la propagación *in vitro* de aguacate es de 20-27°C (Gillespie, 1957; Gazit y Blumenfield, , 1970; Nel y Kotzé, 1982; 1984; Skene y Barlass, 1983; González-Rosas y Salazar García, 1984 y Barrientos-Priego, 1986)., con algunas

variaciones durante la época de invierno (30°C), así como en primavera (18°C), (Costas, 1982). Sin embargo, la mayoría de los investigadores coinciden en que la temperatura ideal es 25°C con la cual han obtenido los mejores resultados (Kadman, 1965; Gustafson y Kadman, 1970; Schroeder, 1971, 1979; Skene y Barlass, 1983; Solorzano, 1989; González-Rosas, et.al. 1990).

La intensidad luminosa reportada para el cultivo *in vitro* de *Persea sp* es de 3000 lux (Solorzano, 1989 y González-Rosas, et.al. 1990).

Para el desarrollo de raíz frecuentemente se utiliza un pretratamiento con luz parcial (González-Rosas y Salazar García, 1984) (con el cual se obtuvieron los mejores resultados), o un tratamiento previo de etiolación, el cual puede tener una duración variable, como 7-10 días (Yasseen Mohamed, 1993a), 21 días (González-Rosas, et.al. 1990), etc.

Skene y Barlass, (1983) utilizaron un fotoperíodo de 9 hrs luz con 15 hrs oscuridad, con el cual obtuvieron crecimiento de brotes y callo. Otros fotoperíodos reportados son 8 hrs luz con 16 hrs oscuridad (Nel y Kotzé, 1984); 6 hrs luz con 18 hrs oscuridad (Nel y Kotzé, 1982), con los cuales se ha obtenido crecimiento *in vitro* de brotes y raíces.

ANTECEDENTES

Consultando la bibliografía sobre el cultivo *in vitro*, encontramos que son pocos los trabajos relacionados la propagación *in vitro* de aguacate (*Persea sp*), siendo *P. americana* y *P. indica* las especies más estudiadas, sin embargo, no todos los trabajos han sido satisfactorios ya que son pocos los autores (Desjardin, 1958; Schroeder, 1973; González -Rosas, et.al 1985 y Yasseen Mohamed 1993), que reportan la obtención de plantas completas.

En cuanto a la variedad Fuerte, sólo 3 autores han trabajado con ella (Gazit y Blumenfield; 1971; Hendry-Standen, 1982 y Skene-Barlass, 1983), (Cuadro 4).

En México estos trabajos son aún mas escasos, sólo algunos autores han trabajado con la propagación *in vitro* (Levine, 1982; González -Rosas y Salazar García, 1984, 1985, 1990 y 1991; Solorzano, 1989).

En la siguiente cuadro se citan los trabajos de aguacate desarrollados con diferentes explantes así como el tipo de morfogénesis obtenida:

Cuadro 4. Tipos de morfogénesis obtenidas en los cultivos *in vitro* de aguacate.

ESPECIE VARIEDAD	EXPLANTE	REFERENCIA	TIPO DE MORFOGENESIS
<i>Persea americana</i> Raza Mexicana	Embriones maduros	Piiego Alfaro y Murashige, (1987) González-Rosas, et al. (1990)	Germinación
<i>Persea americana</i>	Ejes embrionarios	Yasseen Mohamed, Y. et al. (1993)	Plantas completas
Var. Fuerte <i>Persea americana</i>	Embriones inmaduros	Skene y Barlass, (1983) Llano, A. (1989)	Formación de yemas Embriogénesis somática
<i>Persea americana</i> Colin V-33 Raza Antillana	Puntas de yemas, y brotes axilares	Schroeder, (1976, 1979) Solorzano Vega, (1989) González-Rosas y Salazar-García (1984)	Formación de yemas Formación de yemas
<i>Persea americana</i> <i>Persea schiedeana</i> <i>Persea indica</i>		Schroeder, (1973), Desjardins, (1958) González Rosas, et. al. (1985) Nel y Kotze, (1982)	Callo Planta completa Planta completa
<i>Persea americana</i>	Tallo	Van Lelyveld, (1984)	Callo en cultivo en suspensión
<i>Persea americana</i>	Flores	Schroeder, (1975)	Callo
<i>Persea americana</i> Var. Fuerte	Mesocarpo del fruto	Schroeder, (1968, 1971) Gazit y Blumenfield, (1970)	Callo Callo
<i>Persea americana</i>	Pedúnculo	Schroeder, (1977)	Callo
<i>Persea americana</i>	Pecíolo de la hoja	Schroeder, (1977)	Callo
<i>Persea americana</i> Var. Fuerte	Cotiledón	Schroeder, (1968, 1977) Gazit y Blumenfield, (1970)	Callo Callo
<i>Persea americana</i>	Protoplastos	Blicke, et al. (1986)	Callo

Tomado de Yasseen Mohamed-Yasseen, 1993.

Los estudios anatómicos del aguacate se han enfocado principalmente en el fruto, debido a su valor comercial y en el xilema secundario por considerársele árbol maderable. Hasta la fecha no existen suficientes estudios que se orienten hacia el conocimiento anatómico de las partes vegetativas de este árbol. Entre los trabajos que se relacionan con algún aspecto anatómicos del aguacate se encuentran los de: Gómez, R. E. et.al. 1973; García, V. A. 1972; Ernest, A y Holtzhausen, L.C. 1987 y Bautista, B. S. 1989.

Los estudios anatómicos del cultivo *in vitro* del aguacate son más escasos, sólo podemos mencionar el de Nel. M, y De Lange, (1985).

Dado el contexto anterior y como una contribución a la solución de esta problemática se planteó el presente estudio el cual tuvo como objetivos:

- 1. Establecer el cultivo *in vitro* del aguacate variedad "Fuerte".**
- 2. Determinar una técnica de desinfestación adecuada para el desarrollo *in vitro* de las estacas consideradas como explantes.**
- 3. Determinar un medio de cultivo adecuado para el desarrollo *in vitro* de los explantes. Contribuir al conocimiento de las características anatómicas del tallo, pecíolo y hoja; de los explantes desarrollados *in vivo*.**
- 4. Realizar la descripción anatómica comparativa de tallos desarrollados *in vitro* e *in vivo*.**

MATERIAL Y METODO

El presente estudio se llevó a cabo en 2 fases:

A) Fase experimental.

El desarrollo experimental para el cultivo *in vitro* constó de 3 etapas:

- Etapas I* - Selección de la planta madre,
- Etapas II* - Establecimiento del cultivo
- Etapas III* - Multiplicación del tejido

B) Fase descriptiva.

Esta fase consistió en el análisis histológico.

Etapas I

I) Selección de la planta madre.

Como planta madre o fuente se seleccionaron árboles de aguacate *Persea americana* Mill. variedad Fuerte, pertenecientes al huerto "La Cruz" de la fundación Sánchez Colín CICTAMEX, S.C., localizado en el municipio de Coatepec de Harinas Estado de México. Se realizó un recorrido por todo el huerto y se seleccionaron árboles con características homogéneas en cuanto a edad, estado fenológico y suelo.

De ellos, se colectaron varetas de 10 a 12 cm pertenecientes a ramas laterales terminales ubicadas a una altura aproximada de 1.5 m de la base del tronco.

Cada vareta fue dividida en secciones y se formaron lotes de 30 explantes cada uno, los cuales se expusieron a las pruebas que se mencionan más adelante.

Etapas II

II) Establecimiento del cultivo.

En esta etapa se determinó el método de desinfección adecuado para los explantes. Con tal objeto, se realizaron los siguientes pasos:

II.1. Esterilización del material.

II.1a. El cuarto de siembra y las batas se esterilizaron con 9 lámparas de luz ultravioleta encendidas durante 24 horas.

II.1b. En el autoclave, a 20 libras de presión y 120°C se esterilizaron durante 20 min., cajas petri, medio nutritivo, gasas, material de vidrio y de disección, agua destilada y cubrebocas.

II.2. Preparación de medio nutritivo.

Como el objetivo de esta etapa fue determinar un método de desinfección adecuado para los explantes, se elaboró el medio nutritivo "N" en base a las sales descritas por Murashige y Skoog (1962), (etapa II del apéndice I).

Una vez preparado este medio, se agregaron 22 ml en tubos pyrex de 22 X 125 mm, tapándose y marcándose adecuadamente. Posteriormente se esterilizaron en el autoclave a 15 libras de presión y durante 20 min., se colocaron en una gradilla con 45° de inclinación, dejándolos enfriar durante 2 horas.

II.3. Disección de los explantes.

De las varetas de aguacate colectadas se seleccionaron como explantes, estacas de 2.5 a 3.0 cm de longitud, con 6 ú 8 mm de diámetro y con uno a tres meristemas cada uno.

II.4. Desinfección del material biológico.

Para establecer el método de desinfección de los explantes se probaron los métodos que se muestran en el cuadro siguiente:

Cuadro 5. Métodos de desinfección evaluados.

Tratamiento	Prelavado	Agua corriente	Alcohol al 70% (T)	Desinfectante (T)	Lavados c/agua estéril
F.G.	Lavado c/jabón neutro	30 min	5 min	NaOCl 20% + 2 gotas de tween 20 (20 min)	3
AB.	Lavado c/jabón neutro	30 min	5 min	NaOCl 20% + 2 gotas de tween 20 (25 min)	3
U	Lavado c/jabón neutro	30 min	10 min	NaOCl 30% + 2 gotas de tween 20 (20 min)	3
Z	Lavado c/jabón neutro	30 min	10 min	NaOCl 30% + 2 gotas de tween 20 (25 min)	3
Iván	Lavado c/jabón neutro	30 min	12 min	NaOCl 35% + 2 gotas de tween 20 (15 min)	3
S	Lavado c/jabón neutro	30 min	12 min	NaOCl 35% + 2 gotas de tween 20 (20 min)	3
P	Lavado c/jabón neutro	30 min	5 min	HgCl ₂ 0.3% (15 min)	3
P ₁	Lavado c/jabón neutro	30 min	5 min	HgCl ₂ 0.1% (15 min)	3
E	Lavado c/jabón neutro	30 min	3 min	HgCl ₂ 0.1% (15 min)	3
E ₁	Lavado c/jabón neutro	30 min	3 min	HgCl ₂ 0.05% (15 min)	3

Nota: min = minutos.

Cada prueba constó de 30 repeticiones.

II.5. Siembra de los explantes.

Este paso se realizó en el cuarto de cultivo bajo condiciones asépticas.

Cada explante se inoculó en el medio nutritivo "N" (descrito en la etapa experimental II del apéndice I), introduciendo un tercio de la porción basal.

II.6. Desarrollo de los inóculos.

Las gradillas con los inóculos se colocaron para su crecimiento, dentro de un cuarto con fotoperíodo de 16 hrs. luz y 8 hrs. oscuridad a una temperatura de 23-27°C, de acuerdo a lo citado por González (1985) y Costas (1982)

II.7 Toma de datos.

Se observó el desarrollo de cada explante anotando los resultados en cuanto a porcentaje de contaminación, oxidación y activación.

Etapa III

III. Multiplicación del tejido.

Para determinar el medio nutritivo óptimo que induzca la activación y/o desarrollo de los explantes, se evaluaron 10 medios nutritivos (Cuadro 6), y un control (sin fitohormonas), estos medios se basaron en lo recomendado a la bibliografía y en resultados preliminares obtenidos en el laboratorio (Cuadro 7).

Cuadro 6. Medios nutritivos evaluados.

<i>Nombre del medio nutritivo</i>										
	D2	B	H	R	F	I	Im	MB	K	CH
Sales de MyS *	100 ml	100 ml	100 ml	100 ml	100 ml	100 ml	100 ml	50 ml	100 ml	100 ml
MgSO ₄ *	10 ml	10 ml	10 ml	10 ml	10 ml	10 ml	10 ml	10 ml	10 ml	10 ml
FeEDTA *	5 ml	5 ml	5 ml	5 ml	5 ml	5 ml	5 ml	5 ml	5 ml	5 ml
Vitaminas *	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	(*)	1 ml	1 ml
Myo-inositol	0.1 g	0.1 g	0.1 g	0.1 g	0.1 g	0.1 g	0.1 g	0.1 g	0.1 g	0.1 g
Fitohormonas	AIA 0.02 g Kin 0.006 g	BAP 0.1 g	BAP 0.01 g	BAP 0.001 g	BAP 0.0001 g	AIB 0.1 g	AIB 0.0065 g	GA ₃ 0.001g BAP 0.002 g AIB 0.001 g	AIB Kin 0.003 g	AIB Kin 0.0001 g 0.0003 g
Sacarosa	30 g	30 g	30	30 g	30 g	30 g	30 g	30 g	30 g	30 g
Agar	6 g	6 g	6	6 g	6 g	6 g	6 g	Papel filtro	6 g	6 g
pH	5.6-5.7	5.6-5.7	5.6-5.7	5.6-5.7	5.6-5.7	5.6-5.7	5.6-5.7	5.6-5.7	5.6-5.7	5.6-5.7

, () Estas soluciones están descritas en el apéndice I (etapa II Y III experimental).

Para cada prueba se emplearon lotes de 30 explantes.

Cuadro 7. Referencias de los medios de cultivo empleados.

Medios de cultivo	Referencia
D2	Cruz, G, 1993
B	Barrera, 1994
H	Gonzalez, J. 1994
R	Nel, D.D, 1982
F	González, J, Pérez, R y Arcos, O. 1995
I	Levine, 1982
Im	González, J, Pérez, R y Arcos, O. 1995
MB	Harty, 1985
K	González-Rosas, et. al. 1990
CH	Gonzalez-Rosas, et. al. 1985

Una vez realizadas las siembras en los diferentes medios nutritivos, se colocaron en el cuarto de crecimiento con los factores extrínsecos (temperatura e iluminación) mencionados en la etapa II. Estos factores fueron controlados hasta el final del desarrollo de los inóculos, realizando los cambios periódicos del inóculo a medios nutritivos frescos.

Fase B

Análisis histológico.

En esta etapa se realizó la descripción histológica de tallo peciolo y hoja desarrollados *in vivo* y la descripción comparativa de tallo desarrollados *in vivo* e *in vitro*, para observar cambios a nivel histológico de los explantes obtenidos de esta manera. Para ello se realizaron diferentes técnicas, las cuales se describen a continuación:

Obtención de cortes para su análisis bajo microscopio óptico:

a) Cortes a mano.

Se realizaron cortes a mano alzada en los planos transversales y longitudinales de 5 tallos; estos cortes fueron aclarados por medio de la técnica de diafanización, que consistió en: se colocaron a hervir durante 4-5 minutos en una solución de NaOH 5%, posteriormente se colocaron durante 1-2 minutos en una solución de NaOCl 30%, por último se enjuagaron con agua y se montaron en gelatina-safranina y en gelatina-cristal violeta (Aguilar Rodríguez, 1995).

La descripción y análisis de los tejidos del tallo se realizó en la zona de los entrenudos de los explantes (Esquema 1).

Se obtuvieron también cortes transversales de pecíolo, empleando la técnica antes descrita.

b) Criotomo.

El estudio anatómico de la hoja se realizó en el limbo tomando la parte media de la lamina (Esquema 2).

Para lo cual se realizaron cortes transversales de 15 micras de grosor con la ayuda de un criotomo marca IEC-Minotome mantenido a -19°C . Con esta técnica se realizaron algunos cortes de hoja los cuales se llevaron a cabo tomando la parte media de la lamina (Esquema 2), también se realizaron cortes de tallo que fueron teñidos con azul de toluidina (apéndice II).

c) Obtención de material disociado

Se obtuvo material disociado, utilizando la técnica de Jeffrey modificada, para la cual se cortaron pequeños trozos de tallo y se colocaron en una solución de trióxido de cromo y ácido nítrico concentrado (apéndice II) durante 24 hrs; posteriormente se lavaron con agua corriente. Cada trozo se colocó en un portaobjetos y se machacó con el cilindro de una aguja de disección. Se tiñeron con Safranina por 1-3 minutos y se montaron en gelatina safranina (Aguilar Rodríguez 1995).

Se analizaron algunas características celulares como pared, diámetro y longitud de los elementos de vaso.

d) Inclusión en parafina.

Por otro lado, también se realizaron preparaciones permanentes empleando la técnica de inclusión en parafina de la siguiente manera:

Recién obtenidas las muestras, se fijaron en una solución de FAA (apéndice II) durante 48 hrs; posteriormente se lavaron las muestras en agua corriente durante 2 hrs., y se deshidrataron

con las siguientes soluciones de alcohol etílico: al 30%, 50%, 70%, 85%, 96% y 100%, colocando las muestras durante una hora en cada solución. Terminado el paso anterior se pasaron a una mezcla de alcohol absoluto-xilol 1:1, por 1 hr.

La inclusión del tejido se hizo en parafina para lo cual se paso el material deshidratado a mezclas de xilol-parafina 1:1 y 2:1 realizando los cambios cada hora. Después se introdujeron en parafina pura por 24 hrs.

Nota: La parafina estuvo en la estufa 48 hrs antes de usarse.

Para la orientación de las muestras estas se colocaron dentro de cajas de cartulina de 2.5 x 2.5 cm , que contenían parafina pura líquida a una temperatura de 56 °C, y se orientaron con la ayuda de una aguja de disección.

Una vez solidificada la parafina, los bloques se separaron de las cajas de cartón y con una navaja se formó una pirámide en torno a la muestra. Estas muestras de parafina se colocaron en el refrigerador durante 24 hrs., montándose posteriormente en el microtómo de rotación donde se realizaron cortes de 5 micras de espesor, los que se colocaron en un baño de flotación previamente espolvoreado con grenetina, a temperatura aproximada de 30°C.

Una vez estirados los cortes, se pasaron a los porta-objetos previamente desengrasados con alcohol y conteniendo una gota de adhesivo de Haupt (apéndice II) y 4 gotas de formaldehído al 3%, retirándose el exceso de formaldehído con una toalla de papel y colocándolos en la estufa a 45-50°C durante 12 horas.

Para eliminar la parafina los cortes se colocaron en la estufa (56-58°C) durante 20-30 min., y posteriormente se sumergieron en xilol haciendo 3 cambios de 3 min cada uno.

La técnica de tinción que se utilizó fue la de doble safranina-fenol-verde rápido-alcohol 96% (apéndice II), que consistió en lo siguiente:

- 1) Se hidrataron los cortes pasando el tejido en alcoholes de 100%, 96%, 85%, 70%, 50%, 30% y agua, dejando 3 min en cada solución.
- 2) Se sumergió en safranina saturada, durante 20 min.

-
-
- 3) Se deshidrató en alcoholes de 30, 50, 70, 85 y 96%
 - 4) Se contrastó con solución saturada de verde rápido durante 30 a 60 seg.
 - 5) Se retiró el exceso de colorante con alcohol 96%.
 - 6) Se realizaron 2 cambios a alcohol absoluto, de 3 min cada uno.
 - 7) Se hicieron 3 cambios a xilol, de 3 min cada uno.
 - 8) Se montó en bálsamo de Canadá.

Las observaciones de los tejidos tratados en las etapas anteriores se realizaron a aumentos de 10X y 40X y se tomaron fotografías de las preparaciones en un microscopio óptico marca NIKON HFX-DX.

d) Microscopía electrónica de barrido

Para la microscopía electrónica de barrido se utilizaron las siguientes técnicas, que fueron realizadas con la asesoría de la Quím. Elena Oliva en el Laboratorio del Instituto de Física de la UNAM:

Técnica CA Y FA

- 1.- Las muestras fueron fijadas en Glutaraldeído al 0.1 M., durante 2 días.
- 2.- Se hicieron tres lavados de 10 minutos cada uno, en Buffer de Fosfato al 0.1 M., con pH 7.4; para quitar el fijador.
- 3.- Tetraóxido de osmio (O_4O_3) al 0.1% durante 20 hrs.
- 4.- Buffer de Cacodidato al 1% 2 hrs.
- 5.- Dos lavados con Buffer (pH 7.4) durante 10 minutos cada uno.
- 6.- Un lavado en alcohol 50% 10 minutos
- 7.- Dos lavados en alcohol 70% 10 minutos cada uno
- 8.- Se taparon con parafilm y se metieron al refrigerador
- 9.- Se deshidrataron 10 minutos con el deshidratador de punto crítico

Una vez deshidratados se pegaron con pintura de plata en un porta-muestras, bajo el microscopio óptico, se dejaron secar y se colocaron en una caja para evitar que se humedecieran.

Mediante la técnica de *escurreo seutery* (Guzmán, J. 1995) la cual se llevó a cabo con un evaporizador, se cubrieron con oro 15 minutos antes de observarse en el microscopio electrónico de barrido.

Técnica C Y F1

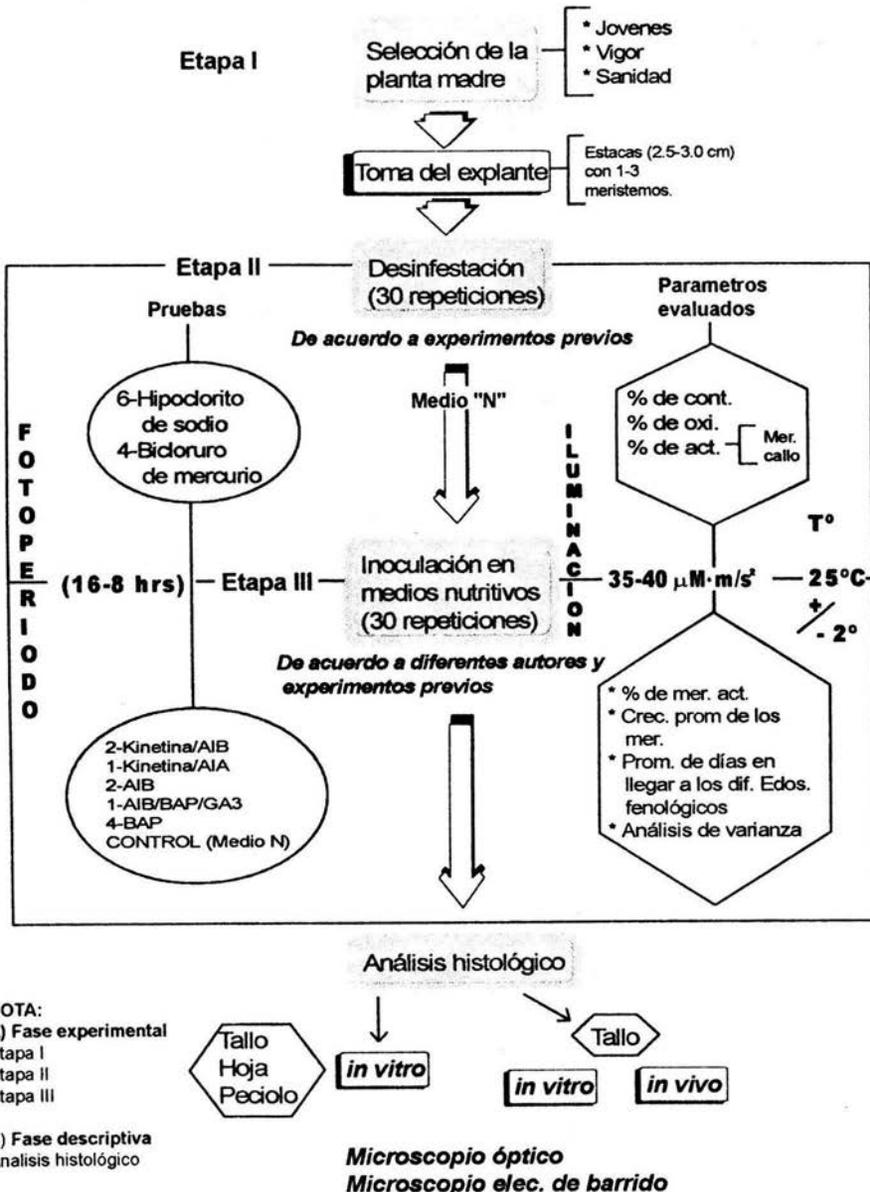
Esta técnica es básicamente la misma que la anterior sólo que en ésta después del tetraóxido de osmio se lavaron otra vez dos veces en buffer de fosfato 0.1 M. PH 7.4, durante 15 minutos cada uno; y se deshidrataron con dos lavados de alcohol 50% de 15 minutos cada uno.

Para el análisis se utilizó un microscopio electrónico de barrido marca Estereoscan mod. 440., bajo la dirección del M. en C. José Guzmán en el Instituto de materiales de la UNAM.

Las observaciones de los tejidos procesados de esta manera se emplearon aumentos de 100X, 200X, 250X, 300X y 400X.

Para las descripciones de los tejidos se emplearon las clasificaciones anatómicas de Fanh, (1974); Radford, (1978); Esau, (1985) y IAWA Committee (1989).

DISEÑO EXPERIMENTAL



RESULTADOS Y DISCUSION

FASE EXPERIMENTAL

Etapa I

En el presente estudio se decidió trabajar con la variedad "Fuerte" debido, (como se mencionó anteriormente), a su alta resistencia a ciertas condiciones extrínsecas de cultivo como bajas temperaturas, alta salinidad, sequías continuas, etc., además en esta variedad encontramos individuos considerados como "tipo" o "patrón", por ser utilizada como fuente de porta-injertos. Por otra parte, la demanda de dicha variedad se ha incrementado en los últimos años, convirtiéndose en una de las principales variedades de aguacate que exporta nuestro país junto con la variedad Hass (Sánchez y Rubí, 1994). Asimismo, la idea de utilizar la variedad Fuerte fue apoyada por dos instituciones que dedican la mayoría de su infraestructura y estudios en el mejoramiento del aguacate: La Fundación Salvador Sánchez Colín (CICTAMEX) y la Universidad Autónoma de Guanajuato, donde el 60% de los huertos se emplean en el cultivo de esta variedad.

Por otro lado, la mayoría de los autores (Kadman, 1976; Schroeder, 1975, 1976; Levine, 1982; Nel y Kotzé, 1982, 1984; Solorzano, 1989; Llano, A. 1989, etc.) establecen que la propagación *in vitro* de aguacate es afectada por varios factores, como las condiciones extrínsecas o de incubación (temperatura, luz, humedad, fotoperíodo) y las características de la planta madre o fuente, respecto a este último factor Kadman, (1976), sugiere que la edad de la planta madre es de vital importancia e influye en la capacidad de enraizamiento, y reporta un 100% de enraizamiento en plantas jóvenes de semilleros de aguacate mexicanos *in vivo* observando que esta capacidad decrece con la maduración de las plantas. Resultados similares reportan Nel y Kotzé, (1982), quienes opinan que es más fácil el enraizamiento de explantes provenientes de árboles jóvenes que de árboles maduros. Estos mismos autores en 1984, concluyen que el estado fenológico en el que se encuentre la planta madre también influye en el desarrollo *in vitro*.

Se ha mencionado antes, que un aspecto importante en el establecimiento del cultivo *in vitro* de cualquier planta es la selección del tipo de explante, ya que de éste depende en gran medida el éxito de la micropropagación. Como mencionan Skene y Barlass, (1983) es importante seleccionar material que pueda regenerar sus propiedades de división para producir multiplicación de brotes (como meristemas o tejido meristemático) y posteriormente raíces, estos autores trabajan con embriones de *Persea americana* var. Fuerte obteniendo múltiples brotes y algunas hojas sin elongación del tallo en los embriones jóvenes y elongación de los brotes (apical y laterales) después de 40 días de cultivo. Otros factores que podemos mencionar son los cambios estacionales y la época del año en que se obtiene el explante.

En base a la información anterior, en el laboratorio de genética vegetal del Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares se realizaron pruebas preliminares para establecer el tipo de explante, el rango de temperaturas y el fotoperíodo para el cultivo *in vitro* de aguacate. (Arcos y Pérez. Informe técnico, 1994). De acuerdo a dichos resultados se determinó como plantas madre árboles de 4 años de edad, considerados los árboles más jóvenes que presentaban fructificación, haciendo posible la observación de las características del fruto. Los explantes utilizados fueron estacas de 2.5-3.0 cm de longitud, con 6-8 mm de diámetro y con 1 a 3 meristemas; siendo éstos posibles de obtener durante la mayoría del año. Así mismo, su desarrollo no implica una gran inversión de tiempo, a diferencia de los embriones maduros (González Rosas, et al. 1990) e inmaduros (Pliego Alfaro y Murashige 1987) y los ejes embrionarios (Yassen-Mohamed, 1993a) en los que su desarrollo inicia desde la germinación de la semilla, además, según Skene y Barlass, (1989), las semillas de aguacate pierden su viabilidad cuando son almacenadas por períodos largos; mientras que otros explantes (partes florales) sólo son obtenidos durante meses específicos.

En cuanto a los meristemas se determinó que los estados fenológicos del desarrollo vegetativo **A** y **B** son los más óptimos para ser inoculados, lo que puede deberse a que en el estado **A** las yemas se encuentran en reposo pero listas para iniciar inmediatamente el estado **B** en donde se da la acumulación de agua y nutrientes incrementando la capacidad de sobrevivencia por un mayor tiempo en lo que se adaptan al medio nutritivo y absorben de él

los nutrientes. Aunado a lo anterior estos estados se presentan repetidas veces a lo largo del año por lo que facilita la obtención de material biológico.

Cabe mencionar que se realizaron siembras de meristemos aislados con un tamaño de 1 a 2 mm; sin embargo, no se observó activación después de 3 a 4 semanas (Arcos y Pérez. Informe técnico, 1994), debido probablemente a que como menciona Schroeder, (1976) las plantas leñosas presentan pocas respuestas de crecimiento y su establecimiento como material clonal de meristemos apicales es difícil, estos resultados coinciden con Llano, (1989), quien menciona que la dificultad para iniciar un cultivo aumenta con la disminución del tamaño del explante y a la falta de tejido adyacente que le facilite la absorción de los nutrientes y por ende su adaptación al medio nutritivo, por lo que generalmente la complejidad del medio de cultivo aumenta a medida que disminuye el tamaño de la parte vegetal que se desea cultivar.

Nel y Kotzé, (1984), mencionan que el cultivo *in vitro* de los domos meristemáticos es difícil, pero si uno o dos primordios foliares son excluidos, el crecimiento se incrementa significativamente, lo cual se comprobó, ya que al sembrar meristemos sin primordios se obtuvo un mayor número de explantes activados (86.6%) (figura 10).

Se decidió utilizar una temperatura de 25°C +/- 2° debido a que con este rango se han obtenido resultados positivos en la mayoría de los cultivos *in vitro* de aguacate, reforzándose con la idea de reproducir las características de su entorno natural. Para el caso de el fotoperiodo (16 hrs luz 8 oscuridad) nos basamos en la misma información.

El uso de un pretratamiento para los explantes, como la etiolación ha sido sugerido por muchos investigadores para la micropropagación de aguacate: Schroeder, (1979), Nel y Kotzé, (1982); Skene y Barlass, (1983); Solorzano, (1989), etc., quienes han tenido una eficiencia mayor en cuanto al crecimiento de brotes y en la formación de raíces al utilizar dicho tratamiento. Sin embargo, en este estudio no se utilizó la etiolación como un pretratamiento por considerarse un procedimiento severo y largo pues su uso generalmente implica un tiempo de 20 a 30 días o más. Bajo el mismo rublo, González-Rosas, et al. (1985) obtiene mejores resultados con luz parcial que con oscuridad, proporcionándonos la idea de que la etiolación puede ser suprimida en las primeras fases del desarrollo *in vitro*, siendo necesaria durante el proceso de desarrollo de raíces, dado que se ha reportado que la luz puede inhibir la acción de sustancias promotoras de la formación de los primordios de raíz.

Etapa II

Como se observa en el cuadro 8 y figura 2, los métodos de desinfección donde se utilizó el hipoclorito de sodio, en cualquiera de las diferentes concentraciones (20, 30 y 35%) y tiempos (15, 20 y 25 minutos), no resultaron efectivos para los explantes, ya que se obtuvieron altos porcentajes de contaminación (60-90%), cuyo valor es muy superior al obtenido en las desinfecciones donde se utilizó el bicloruro de mercurio. Esto no concuerda con los resultados reportados por los autores que utilizan este desinfectante, aunque ellos utilizan concentraciones y tiempos menores (2 y 3%, 1-5 minutos) respectivamente, pues reportan bajos niveles de contaminación (3 ó 4%), esta diferencia se debe posiblemente a que ellos emplean otras condiciones de cultivo como el uso de diferente tipo de explante: embriones inmaduros (González-Rosas, et.al. 1990), mesocarpo (Gazit y Blumenfield, 1970), o brotes procedentes de plántulas más jóvenes (1 año) pertenecientes *P. indica* (Nel y Kotzé, 1982). Además, como fuentes de explantes utilizan plántulas crecidas en invernaderos, con las cuales se puede tener un mayor control sobre la contaminación que en las procedentes del campo, ya que estas últimas están más expuestas al contacto con organismos patógenos que se adhieren a las capas externas de sus tejidos. Por otra parte, Solorzano, (1989), obtiene un aumento en el control de la contaminación bacterial, al asperjar periódicamente agrimicina en un rango de 2 mg/l, además de usar el hipoclorito de sodio.

	Desinfecciones									
	F.G.	A.B.	U	Z	Ivan	S	P	PI	E	E1
Contam.	90.0	86.6	80.0	76.6	66.6	60.0	16.6	20.0	20.0	26.6
Oxid.	86.6	80.0	90.0	90.0	93.3	96.6	46.6	40.0	36.6	13.3

Cuadro 8. Porcentaje de contaminación y oxidación de las desinfecciones empleadas.

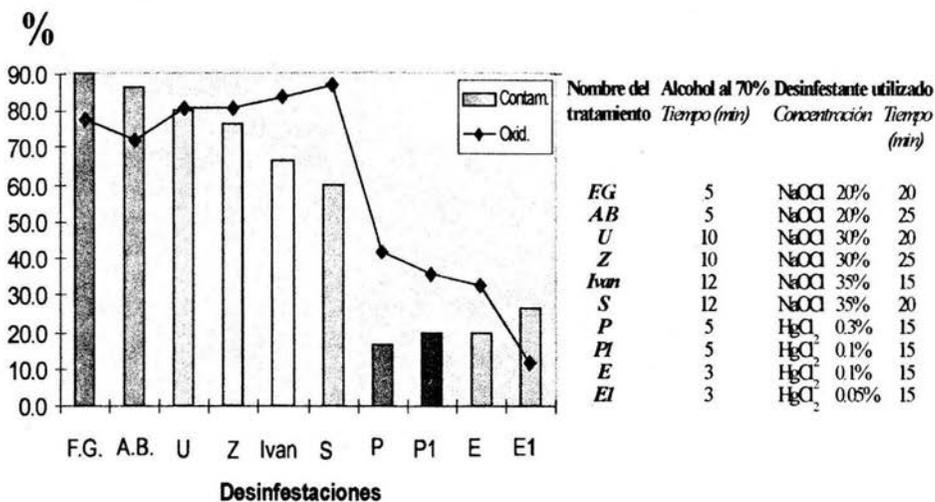
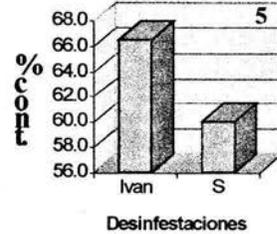
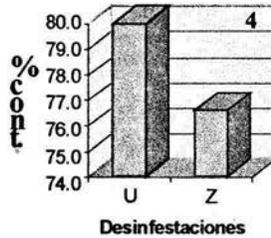
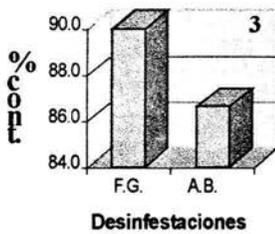


Figura 2. Porcentaje de contaminación y oxidación de las desinfecciones empleadas, donde se observa que en los tratamientos con blicloruro de mercurio (P, P1, E y E1) disminuyen significativamente estos parámetros, comparados con los tratamientos con hipoclorito de sodio (F.G, A.B., U, Z, Ivan y S).

Para hacer una comparación más significativa entre las pruebas de desinfección éstas se agruparon de acuerdo al porcentaje de hipoclorito de sodio (Figuras 3, 4 y 5) y los resultados muestran que conforme se utilizan mayores concentraciones, se tiene un mayor control sobre la contaminación (desinfecciones AB, Z y S).

Por lo contrario entre menor es el tiempo de exposición al hipoclorito de sodio, utilizando la misma concentración, mayor es la contaminación.

Nombre del tratamiento	Alcohol al 70% Tiempo (min)	Desinfectante utilizado Concentración	Tiempo (min)
FG	5	NaOCl 20%	20
AB	5	NaOCl 20%	25
U	10	NaOCl 30%	20
Z	10	NaOCl 30%	25
Ivan	12	NaOCl 35%	15
S	12	NaOCl 35%	20



Figuras 3, 4 y 5. Tratamientos con hipoclorito de sodio agrupados según la concentración y tiempo de exposición, se puede observar que generalmente a mayor concentración y tiempo de exposición al desinfectante menor es el porcentaje de contaminación.

Es importante señalar que la pérdida del material biológico se vió fuertemente influenciada por la presencia de un alto grado de oxidación, respuesta característica en el cultivo de aguacate.

Se observó que conforme se utilizan mayores concentraciones de hipoclorito de sodio, la oxidación también se incrementa, lo que posiblemente también se relacione con el tiempo de exposición al alcohol, el cual fue mayor (12 minutos) en la desinfección "S", produciendo un mayor porcentaje de oxidación. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Levine, (1982), quien observa un aumento y una aceleración de la oxidación del tejido al aumentar la concentración de alcohol (Figura 6).

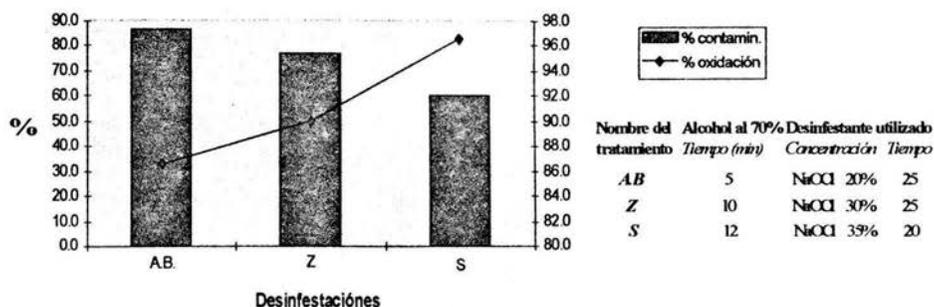


Figura 6. Porcentaje de contaminación y oxidación de las desinfecciones más representativas con hipoclorito de sodio en la cual se puede apreciar que a mayor concentración y tiempo de exposición al desinfectante el porcentaje de oxidación se incrementa, también se puede observar que existe cierta relación con el tiempo de exposición al alcohol y la oxidación.

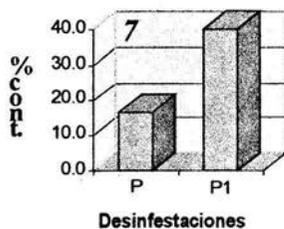
La oxidación es uno de los principales y tal vez el más grave problema que se presenta cuando se desea establecer la micropropagación de aguacate o de plantas leñosas, ya que este fenómeno se presenta cuando el explante inoculado en un medio artificial, debido tal vez al cambio brusco del ambiente, segrega como defensa, algunas sustancias como fenoles, que transforman el pH del medio, por lo que al parecer los explantes necesitan una mayor cantidad de energía al querer absorber las sustancias nutritivas, lo que permite la reproducción de patógenos oportunistas aumentando la contaminación. Para controlarla algunos investigadores emplean antioxidantes como el ácido ascórbico y el ácido cítrico con resultados positivos, por ejemplo: Hendry, N. S y Standen, J. V, (1982), emplearon una solución con 200 mg/l de ácido ascórbico y 300 mg/l de ácido cítrico, logrando una notable disminución de la oxidación en yemas apicales de aguacate var. Duke y Fuerte. Ziv, M y Haley, A.H, (1983), disminuyeron considerablemente la oxidación en la propagación de *Strelitzia reginae*, (una planta ornamental que presenta altos niveles de oxidación), al tratar a los explantes con una solución con 100 mg/l de ácido ascórbico y 150 mg/l de ácido cítrico durante 24 hrs. Estos autores reportan que una exposición mayor a 24 hrs producen efectos negativos en la oxidación. Por otra parte, Solorzano, (1989) obtuvo un control total sobre la

oxidación en aguacate var. Colin V-33 y West Indian, a través de la aplicación de metasulfato como un pretratamiento. Sin embargo, en nuestras pruebas preliminares nosotros obtuvimos un mayor porcentaje de oxidación en los explantes tratados con una solución de ácido ascórbico (200 mg/l) y ácido cítrico (300 mg/l), por lo que se decidió no emplearlos (Arcos, y Pérez. Informe técnico, 1994).

En todas las desinfecciones de hipoclorito de sodio (F.G, AB, U, Z, Iván y S) no se observó activación de los meristemos debido a la pérdida del material casi inmediata post-siembr, dentro de las primeros 3 días; lo que se considera consecuencia de la alta contaminación presente y de ciertos daños observados en el tejido (principalmente en las partes más sensibles como las yemas).

Por estas razones se decidió cambiar el hipoclorito de sodio, ya que según Levine, (1982) y González-Rosas, et.al. (1991) es tóxico para el aguacate, y emplear el bicloruro de mercurio, el que es sugerido por Ziv, M y Haley, A.H, (1983), para plantas leñosas que presentan problemas de oxidación al cultivarlas *in vitro*.

En el cuadro 8 y la figura 7, se observa que la concentración sugerida por Ziv (0.3%) disminuye notablemente la contaminación 16.6%, y permite el crecimiento por un tiempo en comparación con una concentración menor (0.1%) en la desinfección P1. Sin embargo, observamos que esta concentración (0.3%) ocasiona un alto porcentaje de oxidación (46.6%) de todas los tratamientos con bicloruro de mercurio (Cuadro 8), lo que nos llevó a disminuir el tiempo de exposición del alcohol a 3 minutos y la concentración de él bicloruro de mercurio a 0.05% (desinfección E1); logrando con esto disminuir los porcentajes de oxidación (13.3%) y mantener el porcentaje de contaminación en un rango bajo aceptable (26.6%), (Figuras 7, 8 y 9).



Nombre del tratamiento	Alcohol al 70% Tiempo (min)	Desinfectante utilizado Concentración	Tiempo (min)
P	5	HgCl ₂ 0.3%	15
P1	5	HgCl ₂ 0.1%	15
E	3	HgCl ₂ 0.1%	15
E1	3	HgCl ₂ 0.05%	15

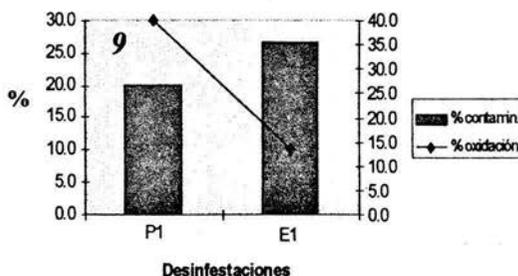
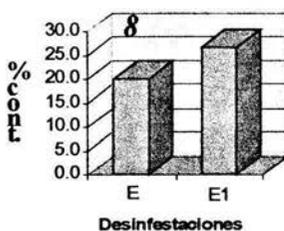


Figura 7, 8 y 9. Porcentaje de contaminación y oxidación de las desinfecciones con bicloruro de mercurio, donde se observa que la contaminación disminuye al incrementar la concentración del bicloruro de mercurio (tratamientos P y P1), sin embargo, la oxidación es mayor, por lo que se puede apreciar que existe una relación entre el tiempo de exposición al OH 70% y la oxidación, ya que a menor tiempo de exposición al OH 70% menor es la oxidación.

De lo anterior podemos sugerir que a mayores concentraciones de bicloruro de mercurio menor contaminación y a menores tiempos de exposición etílicas menor oxidación.

Cabe destacar que el bicloruro de mercurio al 0.05% favoreció la activación de los meristemos y permitió la formación de masas celulares "callo" en un mayor porcentaje (86.6% y 97.1% respectivamente), (Cuadro 9), que las otras concentraciones de bicloruro de mercurio usadas, (Figura 10) lo que nos hizo sugerir que el tipo de desinfectante empleado en este estudio tuvo una influencia directa sobre la activación de los explantes.

Desinfestaciones					
Activación		P	P1	E	E1
Callo		16.6	52.8	72.7	97.1
Act.	C/P	20.0	26.6	36.6	50.0
merist.	S/P	30.0	36.6	40.0	86.6

Cuadro 9. Porcentaje de activación del callo y meristemas empleando las desinfestaciones con bicloruro de mercurio.

Nombre del tratamiento	Alcohol al 70% Tiempo (min)	Desinfestante utilizado Concentración	Tiempo (min)
P	5	HgCl ₂ 0.3%	15
P1	5	HgCl ₂ 0.1%	15
E	3	HgCl ₂ 0.1%	15
E1	3	HgCl ₂ 0.05%	15

Nota: C/P= con primordios foliares
S/P= sin primordios foliares

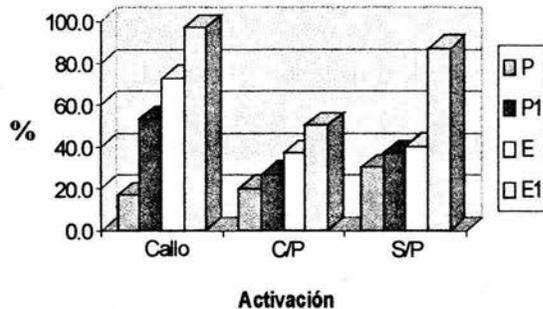


Figura 10. Porcentaje de activación del callo y meristemas donde se puede apreciar que la activación de callo y de los meristemas es mayor en los explantes sin primordios foliares y cuando se utilizan concentraciones menores de OH 70% y de bicloruro de mercurio.

Por otro lado, la concentración de 0.3% (desinfestación P) indujo un retardo en la activación de los explantes en comparación con las otras desinfestaciones, encontrando respuestas de activación a los 15 días, mientras que con la concentración de 0.05% se presentó a los 8 días; lo que puede ser una respuesta provocada por la alta oxidación que se presenta con esta concentración, ya que la oxidación o la producción de radicales libres que se lleva a cabo en este proceso puede intervenir en la acción de las sustancias promotoras del crecimiento.

Etapa III

Como se puede observar en el cuadro 6 de la metodología, para la preparación de los medios nutritivos se utilizaron las sales de Murashige y Skoog, (1962), ya que se ha citado que éstas son las más adecuadas para el cultivo de dicotiledóneas. Así mismo se reportan en la mayoría de los artículos consultados el uso exitoso de las mismas cuando se realiza la propagación *in vitro* de diferentes variedades de aguacate como: Dade, Ducke, Maxima, Tower, Waldin, Choquete e inclusive Fuerte.

En cuanto al uso de las hormonas y su equilibrio, según Skoog y Miller, (1962), una alta concentración de citocininas comparada con la de auxinas producen mayor desarrollo de brotes *in vitro*. Esta idea ha sido apoyada por los resultados reportados en la mayoría de los estudios relacionados al cultivo *in vitro* en donde sin ser las mismas concentraciones o tipo de hormonas el balance para producir brotes depende de un mayor nivel de citocininas (Amaranto, Rosa, Petunia, etc).

Algunos investigadores reportan que la mejor combinación para el cultivo *in vitro* e *in vivo* de aguacate es la adición de kinetina más AIB, Schroeder, (1975), Llano, A, (1989); González-Rosas-Salazar, (1984); González-Rosas, et.al. (1985, 1990). Por otro lado el uso de AIA/Kinetina es citada por Schroeder (1975), para el cultivo de yemas y partes florales.

Al emplear estas combinaciones de fitohormonas en nuestros resultados se observó por un lado, que la concentración de 0.0001 g/l de AIB más 0.0003 g/l de Kinetina, que corresponden al medio "CH", producen resultados positivos en cuanto al porcentaje de activación (53.3%), al desarrollo de brotes (75%), y de crecimiento (54 mm en 56-60 días); además de obtenerse una menor oxidación (cuadros 10 y 11), (Figuras 11, 12 y 13), comparadas con las concentraciones de 0.001 g/l de AIB más 0.003 g/l de Kinetina (medio K). Sin embargo, González-Rosas, et.al. (1990), obtuvieron con estas concentraciones plántulas completas incrementando el desarrollo de la raíz, y nuestras plántulas después de 50-60 días, además de presentar un alto porcentaje de pérdida de material por oxidación, no desarrollaron raíz.

Por otro lado, en cuanto a la relación de AIA/Kinetina, empleada en el medio D2 se determinó que está no fue efectiva para los explantes, ya que sólo se obtuvo la formación abundante de callo a lo largo y en la base del tallo, sin presentarse activación de los meristemos (Figura 13), lo que hace pensar que esta última respuesta es consecuencia de la baja proporción de citocinina-auxina.

Ya que el aguacate es una planta de difícil enraíce y debido a que el desarrollo y funcionamiento radicular requiere de oxígeno y el medio con agar no es o más satisfactorio para cubrir esta necesidad, se preparó un medio líquido (MB) propuesto por Nel y Kotzé, (1982) y Skene y Barlass, (1983), pero los resultados obtenidos con este medio no se consideraron satisfactorios, ya que el crecimiento fue muy lento, (Figuras 12 y 13) tal vez debido a la presencia de ácido giberélico AG₃ que según Llano, (1989) presenta un efecto retardador del crecimiento e inhibición de raíz. Aunque Solorzano, (1989), observa un sustancial incremento en el crecimiento al adicionar esta hormona en combinación con Benzil Adenina (BA), por lo que podemos pensar que probablemente la combinación con la BA fue lo que determinó sus resultados.

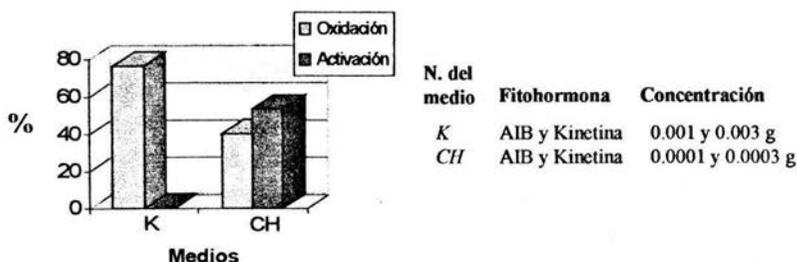


Figura 11. Porcentaje de activación, y oxidación de los medios K y CH los cuales contienen diferentes concentraciones de AIB y Kinetina, donde se observa que la activación es menor con menores concentraciones de estas fitohormonas.

MEDIOS	D I A S									M I L I M E T R O S
	7	14	21	28	35	42	49	56		
D2	NO HAY CRECIMIENTO									
F	7 S=0.18	13 S=0.44	25 S=0.57	34 S=0.58	40 S=0.80	46 S=0.18	52 S=0.58	61 S=1.08		
R	5 S=0.61	10 S=0.44	15 S=0.60	24 S=0.38	32 S=0.55	43 S=0.40	48 S=0.86	57 S=0.89		
H	3 S=0.0	7 S=0.58	13 S=0.95	22 S=1.51	30 S=0.73	41 S=0.36	47 S=0.63	55 S=0.66		
CH	3 S=0.18	6 S=0.66	13 S=0.40	20 S=0.64	28 S=0.41	39 S=0.37	45 S=0.45	54 S=0.36		
MB	2 S=0.45	2 S=0.55	6 S=0.40	12 S=0.61	16 S=0.40	24 S=0.50	33 S=0.18	46 S=0.18		
B	2 S=0.0	2 S=0.40	6 S=0.44	14 S=0.64	17 S=0.73	23 S=0.58	32 S=0.62	45 S=0.58		
CONTROL	2 S=0.37	3 S=0.73	4 S=1.05	10 S=1.03	15 S=1.01	19 S=0.76	28 S=0.64	39 S=0.56		

Cuadro 10. Crecimiento promedio (mm) de los meristemas a través del tiempo (días) para cada medio

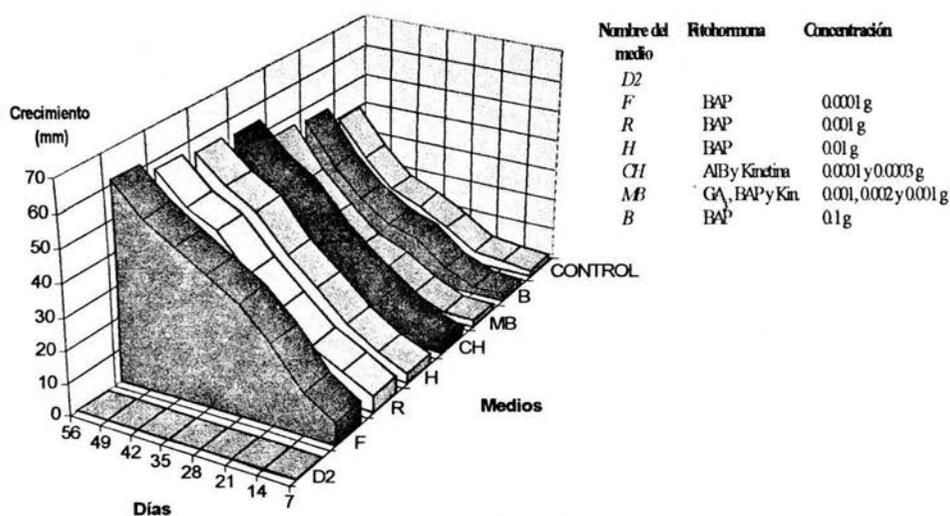


Figura 12. Crecimiento promedio (mm) de los meristemas a través del tiempo (días) para cada medio, donde se observa un mayor crecimiento en el medio F en comparación con los demás medios probados.

Edos. Fenológicos							
MEDIOS	CALLO	EDO. B	EDO. C	EDO. D	EDO. E		
D2	8 $S=0.55$	No se presentó activación					D
F	13 $S=0.75$	8 $S=0.31$	15 $S=0.31$	23 $S=0.18$	34 $S=0.49$		I
R	13 $S=0.55$	10 $S=0.41$	17 $S=0.55$	28 $S=0.63$	39 $S=0.74$		A
H	7 $S=0.65$	13 $S=0.41$	19 $S=0.49$	31 $S=0.78$	40 $S=0.75$		S
CH	8 $S=0.53$	14 $S=0.54$	21 $S=0.49$	35 $S=0.45$	44 $S=0.66$		
MB	18 $S=0.77$	22 $S=0.41$	32 $S=0.43$	44 $S=0.66$	57 $S=0.71$		
B	16 $S=0.68$	24 $S=0.63$	32 $S=0.52$	45 $S=0.64$	60 $S=0.88$		
CONTROL	12 $S=0.37$	22 $S=0.87$	33 $S=0.46$	47 $S=0.44$	65 $S=1.09$		

Cuadro 11. Tiempo promedio (días) en que se obtuvo el callo y los diferentes estados fenológicos para cada medio.

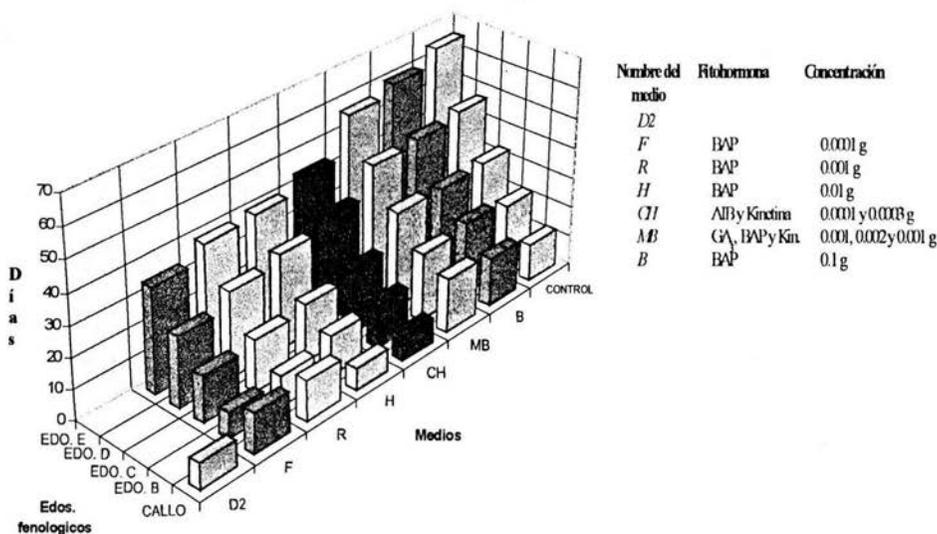


Figura 13. Tiempo promedio (días) en que se obtuvo el callo y los diferentes estados fenológicos para cada medio, donde se observa que se obtiene cada uno de los edos. fenológicos en menor tiempo con el medio F, sin embargo el callo se presenta más rápido en el medio H que contiene una mayor concentración de BAP.

De acuerdo a lo reportado por González-Rosas-Salazar García, (1984) y Kadman y Gustafson, (1970), al emplear AIB para el cultivo de embriones y embriones etiolados, respectivamente, a niveles entre 7-10 mg/l, se producen plantas de la var. Ducke con un

desarrollo de raíz y callo alto (60-70%). Sin embargo, como se observa en la figura 14, al inocular microcortes de Fuerte en medios adicionados con AIB a concentraciones de 0.1 y 0.0065 mg/l (medios I e Im) obtuvimos resultados negativos. Cabe destacar que a mayor concentración de AIB (medio I) se produce una mayor pérdida de material debida a la alta oxidación.

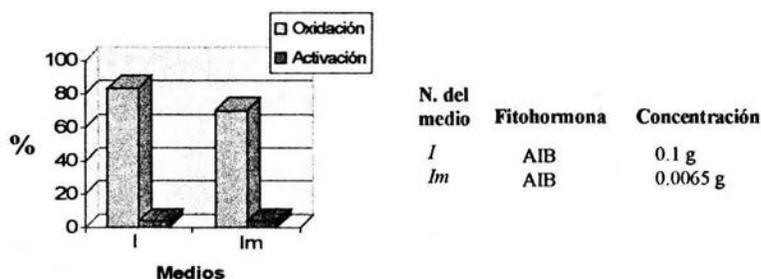


Figura 14. Porcentaje de activación y oxidación de los medios adicionados con diferentes concentraciones de AIB, en los que se observan resultados negativos en la activación ya que el crecimiento es casi nulo y la oxidación muy alta.

Al no encontrar respuestas satisfactorias al utilizar el uso combinado de citocininas y de auxinas individuales, se considero el uso de citocininas, seleccionando diferentes concentraciones de BAP, ya que estudios preliminares reportados por el laboratorio de cultivo de tejidos de la Universidad de Guanajuato encontró que dicha fitohormona inducía la activación de los meristemos de aguacate Fuerte (Barrera, 1995). Aunado a esto, se consideró que las yemas apicales en reposo son sitio de síntesis de inhibidores provocando una propagación difícil, debido al predominio de la dominancia apical por lo que el uso de factores del crecimiento, como las citocininas y específicamente el BAP, pueden suprimir la dominancia apical, permitiendo a las yemas laterales desarrollar brotes que pueden ser subcultivados en un medio para enraizar o propagarse, logrando la obtención de plántulas completas.

Los resultados descritos en el Cuadro 12 (Figura 15), muestran que todas las concentraciones de Benzil Amino Purina (0.1, 0.01, 0.001 y 0.0001 g/l) produjeron

resultados positivos para el desarrollo de los explantes; ya que indujeron la división de las células meristemáticas.

	Medios								
	B	H	R	F	I	Im	K	CH	
Oxidación	50	36.6	33.3	13.3	83.3	70	76.6	40	
Activación	46.6	60	76.6	86.6	3.3	3.3	0	53.3	

Cuadro 12. Porcentaje de activación y oxidación de los medios empleados.

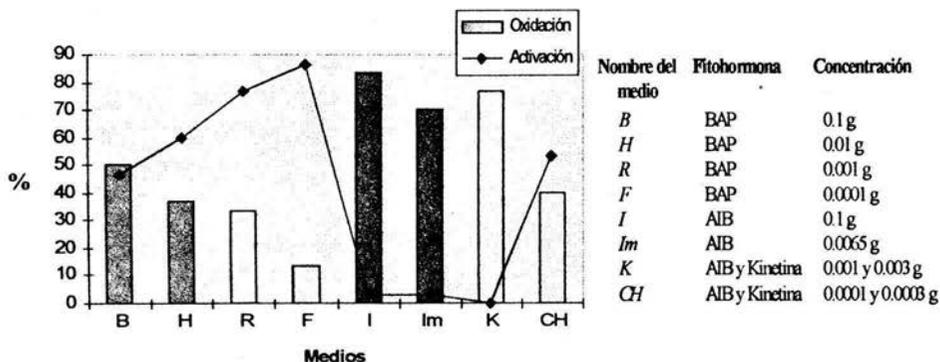
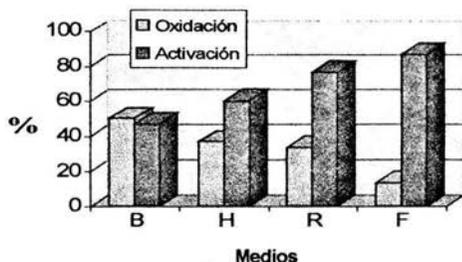


Figura 15. Porcentaje de activación y oxidación de los medios empleados donde se observa que los medios adicionados con BAP producen los mejores resultados ya que hay mayor activación y menor oxidación.

Al comparar los efectos producidos con los medios que contienen BAP (Figura 16) se observa que con el medio "F", que contiene una concentración de 0.0001 g/l, se producen los mejores resultados, en cuanto al porcentaje de activación (86.6%), así como el porcentaje de brotes (90%) (cuadro 13, figura 18) y estimulación del crecimiento, produciéndose en tiempos reducidos en comparación con los otros medios ("B", "H" y "R"), ya que en el medio F la estimulación del crecimiento inició a los 8 días mientras que en los otros medios fue necesario esperar 24, 13 y 10 días respectivamente, (Cuadro 11).



Nombre del medio	Fitohormona	Concentración
B	BAP	0.1 g
H	BAP	0.01 g
R	BAP	0.001 g
F	BAP	0.0001 g

Figura 16. Porcentaje de activación y oxidación de los medios adicionados con diferentes concentraciones de BAP en el que se denota que el medio F presenta el mayor porcentaje de activación y menor oxidación comparado con los demás medios.

Además en este medio el porcentaje de oxidación fue menor (Figura 16), permitiendo la producción de plántulas vigorosas con meristemos en estado fenológico "E" con hojas fotosintéticas de buen aspecto, las cuales se formaron en 34 días y alcanzaron una longitud de 61 mm en 56 días, pero sin un sistema radicular, (Cuadro 10, figuras 12, 13 y 17),(Foto 1 y 2).

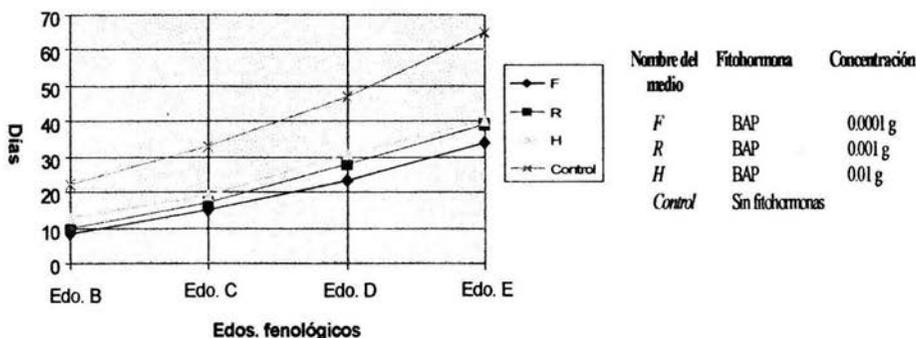


Figura 17. Medios donde se obtuvo la respuesta más rápida (días) para cada estado fenológico, observese que con la menor concentración de BAP (medio F) se obtiene más rápido el Edo. fenológico E.

Una característica propia del aguacate cuando es cultivado *in vitro* es la formación de múltiples brotes, lo que se pudo verificar en este estudio y de acuerdo al análisis de varianza y la prueba de Tukey (apéndice III) se encontraron diferencias significativas respecto al número de brotes entre los medios R y F respecto al control N, los cuales contienen BAP; lo que indica que las concentraciones de 0.001 y 0.0001 g/l, proporcionan un buen desarrollo de brotes y sugiere que los dos medios son los más óptimos para el desarrollo de brotes, sin embargo, el medio R produce mayor brotación y oxidación en comparación con el medio F, por lo que este último se consideró como el óptimo para inducir la organogénesis foliar (Cuadro 13, figura 18).

Medios	% Brotes
F	90
R	86.6
H	83.3
B	80
CH	75
MB	73.3
K	63.3
CONTROL	56.6

Cuadro 13. Porcentaje de brotes obtenidos en los medios probados.

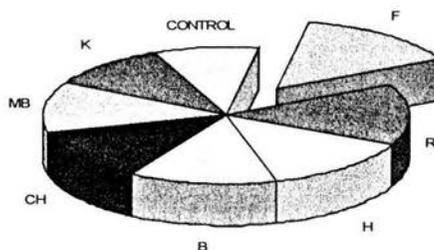


Figura 18. Porcentaje de brotes obtenidos en los medios probados, observese que el medio F presenta el mayor porcentaje.

Nuestros resultados no concuerdan con la idea generalizada de que esta citocinina no es recomendable para el cultivo *in vitro* de aguacate por no considerarse efectiva, como lo menciona González-Rosas, et.al (1991). Sin embargo algunos investigadores también obtienen resultados positivos como Barrera, 1995 y Nel y Kotzé, (1982) quienes reportan que se pueden obtener a partir de una yema axilar 60 explantes en 8 semanas, al ser transferido cada brote a un medio fresco con 2 mg/l de BAP.

Así mismo, para que las auxinas induzcan la formación de raíces adventicias requieren de la presencia de una citocinina.

La sensibilidad de una planta es determinante en los efectos de una hormona, inclusive más que la concentración a que se encuentre ésta en los tejidos, lo que indica que los explantes presentaron la misma sensibilidad al BAP y a la combinación de AIB/Kinetina, ya que con estas hormonas se obtienen las mismas respuestas (desarrollo de brotes, formación de plántulas sin sistema radicular y callo) aunque en diferentes proporciones y con diferentes características en cuanto a color de hojas, vigor número de brotes y tiempo.

Una respuesta observada con todos los medios fue la formación de masas celulares "callo" a lo largo del tallo y con un desarrollo mayor en la base de este (Foto 1 y 2). La formación de este en el medio control (sin fitohormonas) nos sugiere dos aspectos: que el callo puede crecer sin la presencia de hormonas específicamente citocininas, ya que estas son principalmente las responsables de la división celular que da origen a la formación del callo o bien que los explantes poseen las concentraciones endógenas de hormonas necesarias para la formación de callo.

Previos reportes indican que los tejidos de casi todas las partes de aguacate pueden ser cultivados como masas de callo *in vitro* y pueden ser mantenidos hasta por 15 años o más (Schroeder, 1968, 1971, 1977 y 1979) a través de subcultivos. Teóricamente el callo puede generar plantas completas, ya que con algunos reguladores del crecimiento estas células pueden ser inducidas para formar lo que se conoce como pro-embriónes o embriónes somáticos. Sin embargo, la diferenciación del callo en estructuras organizadas no ha sido bien establecida; el problema principal radica en establecer las condiciones óptimas ambientales y nutricionales esenciales para su continuo crecimiento. Según Gazit y Blumenfeld, (1970) en altas temperaturas y en oscuridad ocurre el mejor crecimiento. Contrario a estos planteamientos nosotros obtuvimos un buen desarrollo en presencia de luz.

La presencia de callo en los explantes nos da la posibilidad de generar raíces y de esta manera obtener plántulas completas transfiriendo los explantes obtenidos a partir del medio "F" a un medio para enraizar, con las concentraciones adecuadas de hormonas del crecimiento; para lo cual es necesario realizar una serie de pruebas en estudios posteriores.

En base a todos los resultados obtenidos podemos establecer que la ausencia de sistemas radicular en nuestros explantes, que puede estar vinculada (como lo reporta

Peñaloza, 1982) con la ausencia o presencia de ciertas sustancias diferentes a las auxinas que inhibieron la formación de raíces, las cuales pueden estar presentes o ausentes en ciertas épocas del año, ya que según González-Rosas, et.al 1985, 1990, los explantes tomados en invierno fueron los que generaron raíces; lo cual no se pudo verificar ya que en invierno se presenta la floración en los árboles de aguacate que sirvieron de fuente de explantes y en el transcurso de este estudio se observó que los explantes tomados poco antes, durante y poco después de la floración no responden a los tratamientos, presentando altos niveles de oxidación (100%) que conlleva a la pérdida de los explantes más rápido; resultados similares se han obtenido por Barrera (comunicación personal). Esto puede deberse a que durante la floración ocurren varios cambios fisiológicos en los árboles de aguacate, que generan la producción o ausencia de sustancias, o bien la desviación de nutrientes que impiden el desarrollo de las yemas vegetativas.

Después de realizar varios subcultivos, de las plántulas obtenidas sin un sistema radicular se observó a los 60 días aproximadamente la pérdida de hojas con la subsiguiente muerte de los explantes respecto a esto, una hipótesis a sido establecida por Guillespie, (1957), quien establece que la retención de hojas o abscisión es mediada por el gradiente de las auxinas a través del peciolo de la hoja, si la producción de las auxinas por la hoja cae a bajo del nivel de auxinas del tallo da como resultado la activación de las células de la pared de abscisión en la base del peciolo y la hoja se pierde, esto indica que los niveles de auxinas presentes en el tallo de los explantes era menor a la que empezaron a producir las nuevas hojas, en base a esto se colocó a los explantes a un medio con 6.5 mg/l de AIB según lo reportado por Kadman y Gustafson, (1970) y Nel y Kotzé, (1982), obteniendo resultados negativos. En base a estos resultados se puede buscar una relación de auxinas que mantengan los niveles endógenos de auxinas en los explantes.

En investigaciones previas se ha reportado que el enraizamiento de los explantes de aguacate está asociado con la retención de las hojas. Reuveni y Raviv, (1980), observaron que los explantes que retenían sus hojas por un periodo largo enraizaron más rápido, mientras que los explantes que se les quitaron las hojas no enraizaron. Por lo que el desarrollo de hojas en nuestros explantes es importante y es necesaria la retención de las

mismas, ya que esto podría facilitar la posterior formación de raíces; debido a que son el sitio de síntesis (como reporta Peñaloza, 1982), de las auxinas y de ciertos cofactores que en combinación con éstas, estimulan la formación de raíces. Por otra parte, a través de la fotosíntesis que se lleva a cabo en las hojas, las plántulas pueden acumular carbohidratos como sacarosa y almidón en la base de los explantes, lo que ha sido reportado como un factor muy importante en el enraizamiento. Además a través del proceso fotosintético se producen en las hojas las sustancias nutritivas indispensables para el metabolismo de las plántulas.



Foto. 1. Estados fenológicos del desarrollo vegetativo de aguacate, obtenidos "in vitro" en el medio control "N" (sin fitohormonas).



Foto. 2. Estados fenológicos del desarrollo vegetativo de aguacate, obtenidos "in vitro" en el medio F adicionado con Benzil Amino Purina (BAP).

FASE DESCRIPTIVA

Anatomía de aguacate “ *in vivo*” Var. Fuerte.

Tallo

Epidermis uniseriada, con células hialinas de forma tabular y/o cuadrada, cubiertas por una capa cuticular lisa continua; sobre la superficie de la epidermis presenta tricomas unicelulares de forma cónica y se presentaron algunas células en proceso de diferenciación de estos.

Corteza formada por varias capas (10 a 12) no uniformes de células de colénquima poco especializado con gran cantidad de cloroplastos, formando un cilindro continuo por debajo de la epidermis; enseguida se localizaron 10 a 15 hileras compactas de células de parénquima con forma rombohédrica y rectangular (Esquema 1. Foto “A”).

Distribuidos por toda la corteza se observaron cristales prismáticos y en forma de drusas; entre estas células se localizaron idioblastos formados por una sola célula con contenido de aceite, que se distinguen por su forma circular y su mayor tamaño (Foto).

Las fibras de esclerenquima asociadas al floema primario se encuentran dispuestas en paquetes circulares y triangulares; y se localizan exclusivamente hacia afuera en dirección a la corteza (Esquema 1. Foto “B”).

En los tejidos conductores se observó crecimiento secundario poco desarrollado.

Vasos: Los poros son ovalados y ligeramente angulares, solitarios y agrupados en hileras radiales de 2-8, ocasionalmente también se encuentran en racimos pequeños de 3-4 células; son pequeños y con pared delgada, su diámetro tangencial es de 35 μm en promedio ($S=4.33$). Los elementos de vaso son cortos con longitud promedio de 226 μm ($S=51.47$), platina de perforación simple.

El parénquima axial es apotraqueal escaso y difuso (Esquema 1, “C”).

Las fibras son de tipo libriforme y cortas, con una longitud promedio de 1564 μm (S=503.72).

La médula se localiza en la parte central del tallo y esta formada por células parenquimáticas de forma rombohedrica, con paredes, delgadas y no lignificadas. En este tejido también se localizaron gran cantidad de gránulos de almidón (Esquema 1," D").

Hoja.

La epidermis adaxial es uniseriada, y la epidermis abaxial es multiseriada formada por dos hileras de células. El arreglo de las células es compacto, variando en forma tamaño y arreglo según su posición en la hoja.

La pared externa de la epidermis presentó una cutícula gruesa. En las células epidérmicas existen estructuras cristalinas compuestas en forma de drusas. Los tricomas son unicelulares con la pared celular delgada y se localizan sin un arreglo definido en la epidermis superior e inferior.

El mesófilo es bifacial, esta diferenciado en parénquima empalizado con 2 hileras de células de forma alargada de apariencia tubular y con arreglo compacto, por debajo de este hay de una a dos capas de parénquima de transición con un arreglo poco compacto y estas capas están interrumpidas en ocasiones por células de parénquima esponjoso, el cual es multiseriado con células isodiamétricas sin arreglo definido, no compacto y con espacios intercelulares entre ellas. Distribuidas entre el parénquima empalizado se localizan grandes cavidades secretoras (Esquema 2, "A").

Pecíolo

Esta formado por una epidermis uniseriada con células epidérmicas poco compactas, de forma cúbica y rectangular, con una capa cuticular continua que cubre todas las células y penetra en las paredes anticlinales de las mismas.

Los tricomas son unicelulares, con pared celular delgada, y se localizan alrededor de toda la superficie epidérmica.

Debajo de la epidermis existe colénquima de tipo laminar y debajo de este se localiza colénquima de tipo angular.

Por abajo del colénquima hay parénquima formado por células de forma ovalada con pared celular muy delgada y de diferentes tamaños las cuales constituyen la mayor proporción de los tejidos del peciolo.

Presenta un haz fibrovascular de tipo colateral, en forma de arco (Esquema 2 "C").

Anatomía "in vitro"

En general, no se encontraron cambios morfológicos significativos en el tallo de los explantes desarrollados *in vitro*.

Se observó el mismo arreglo morfológico, pero a nivel de la corteza e intercaladas entre el colénquima y el parénquima se encontraron zonas aisladas de alta proliferación celular (con función meristemática), originada de la desdiferenciación del colénquima (Esquema 3. "C-D"). Las células de esta zona son de forma irregular tendientes a ser circulares; con pared delgada. Algunas de estas células están dispuestas unas sobre otras (de manera similar a las del cambium) (Esquema 3. "D"). Cerca de cada zona se observó la activación de una lenticela por donde se dá la salida de callo (Esquema 3. "E").

A nivel del xilema se encontró que los poros son ovalados y pequeños con un diámetro tangencial en promedio de (41 μm) (S=3.95). Los elementos de vaso son cortos con una longitud promedio de (303 μm) (S=59.56).

Las fibras son medianas con una longitud promedio de (1691 μm) (S=352.98), (Figura. 19).

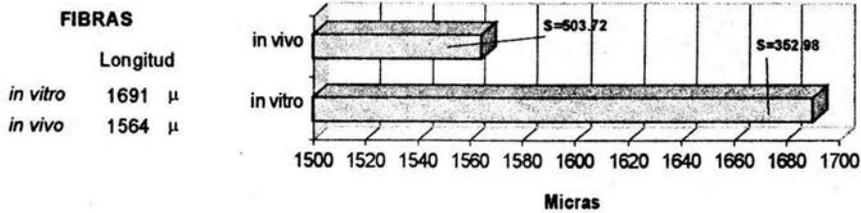
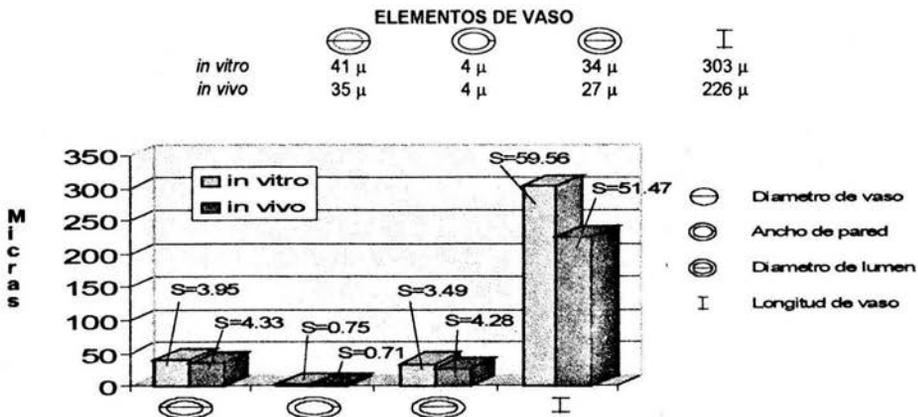


Figura 19. Longitud de fibras de los tallos *in vitro* e *in vivo* donde se observa que las fibras de tallos *in vitro* son ligeramente mayores.

De lo anterior deducimos que en las estructuras analizadas (tallo, peciolo y hoja) *in vivo* e *in vitro* se presentan los tres sistemas tisulares (epidérmico, fundamental y vascular); así como la disposición anatómica reportada por Bautista, (1989) para la variedad Fuerte, lo que nos ayudo a confirmar la ausencia de modificaciones anatómicas en las estructuras estudiadas.

Con respecto al xilema se observó sólo una diferencia no significativa en cuanto al diámetro de los vasos, pared, longitud de los elementos de vaso y longitud de fibras, los cuales fueron ligeramente mayores en los tallos de los explantes desarrollados *in vitro*, como se observa en el cuadro 14 y figura 20).



Cuadro 14, Figura 20. Comparación entre los elementos de vaso del tallo *in vitro* e *in vivo*, donde se observa una diferencia no significativa en cuanto a las medidas de estos.

Las zonas identificadas en el tallo a nivel de la corteza con alta proliferación celular (Esquema 3, foto "C-D") son originadas por la desdiferenciación del colénquima y del parénquima, de la corteza debido a que, por ser el colénquima poco especializado se puede desdiferenciar en parénquima adelgazando sus paredes engrosadas. Así mismo, las células parenquimáticas se caracterizan por conservar su capacidad para dividirse y pueden recobrar su actividad meristemática cuando el medio se altera artificialmente.

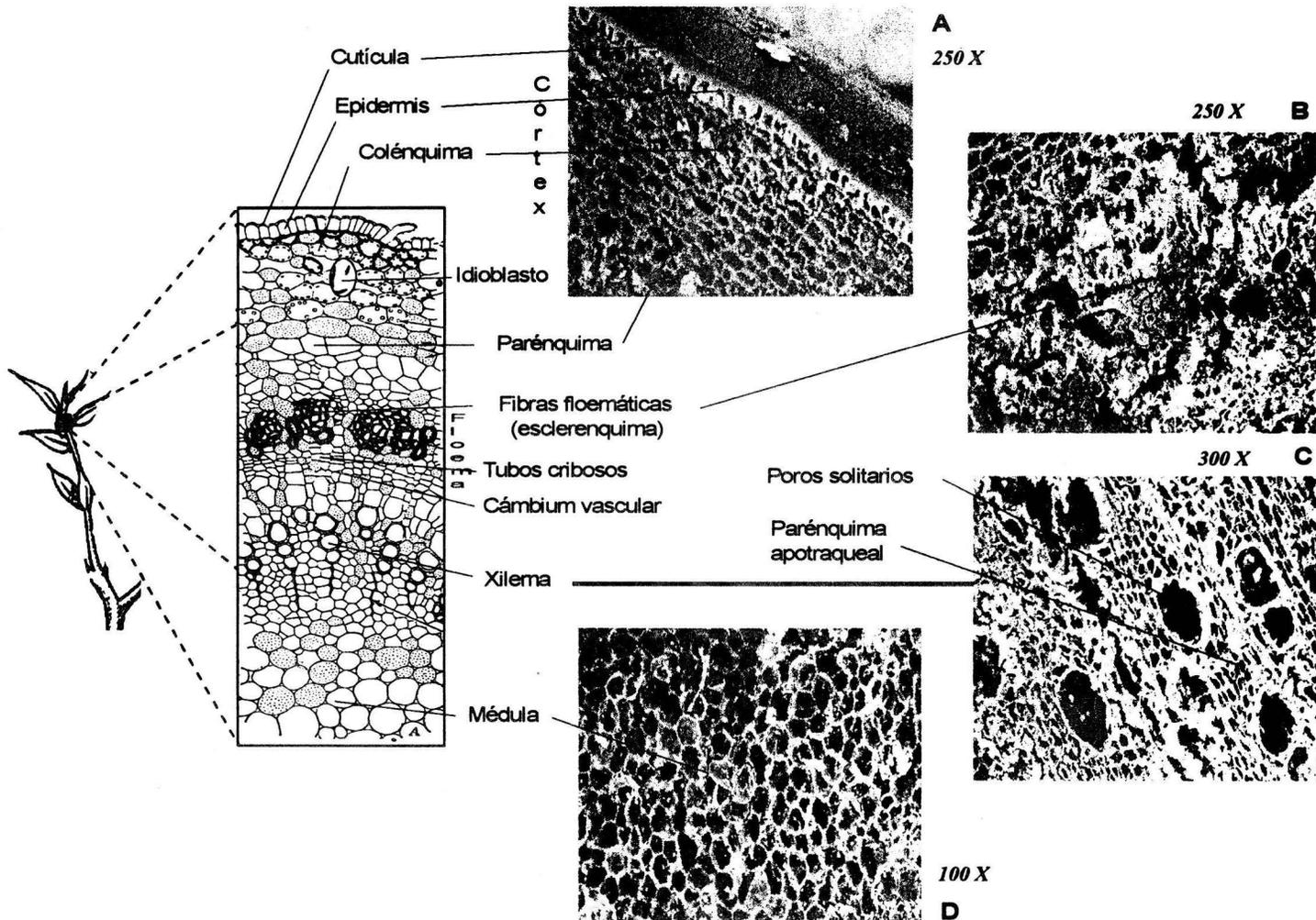
Dada la presencia de estas zonas, deducimos el callo se origina en la corteza a partir de ciertas zonas cambiales que se forman en este sitio (Esquema 3 foto "C-D"), como lo mencionan Ernest y Holtzhausen, (1987), quienes realizaron un estudio anatómico en plántulas desarrolladas *in vitro* observando que varias células del cortex y de la medula originan el callo, sin embargo en nuestro estudio no se observó la formación de callo en la medula.

Aunque, Kadman y Ben-Yaácov, (1965), afirman que no existe ninguna conexión entre el callo y el enraizamiento en el cultivo *in vitro* de aguacate, se sugiere que al provenir las células que conforman el callo de zonas meristemáticas, este puede llegar a formar plantas completas u órganos aislados como las raíces si se somete tejido a medios con altas concentraciones de auxinas, como lo sugiere Schroeder, (1956, 1968, 1971, 1975, 1976 y 1977).

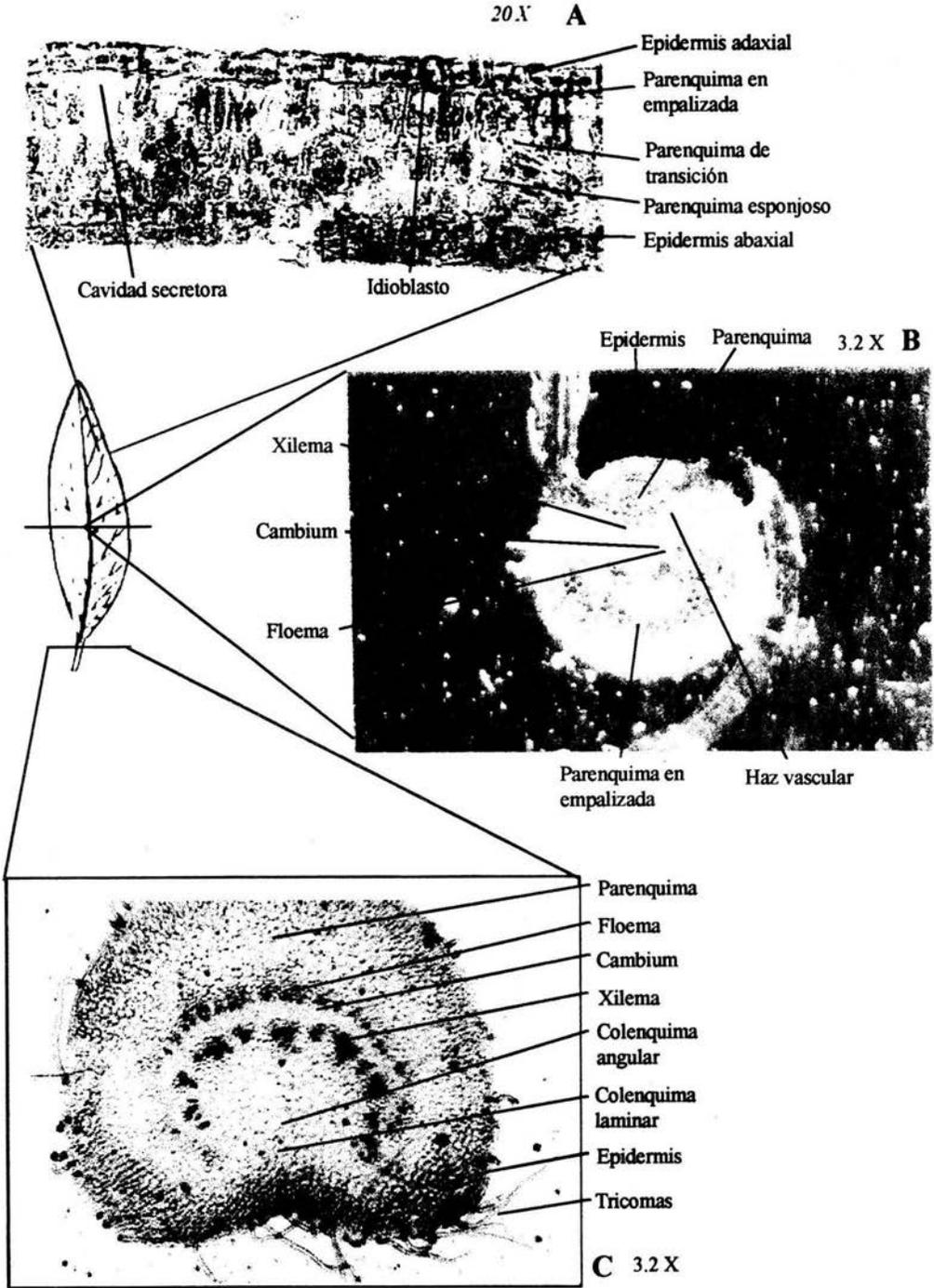
La activación de las lenticelas, (Esquema 3, "E-F") sólo en los explantes cultivados *in vitro*, nos sugiere que las hormonas como las citocininas que inducen la división celular, aceleran la activación de éstas.

A través de las lenticelas se puede dar una mayor comunicación entre el medio nutritivo y el explante, facilitando la difusión de nutrientes y factores del crecimiento hacia el explante así pueden ayudar al desarrollo de raíces.

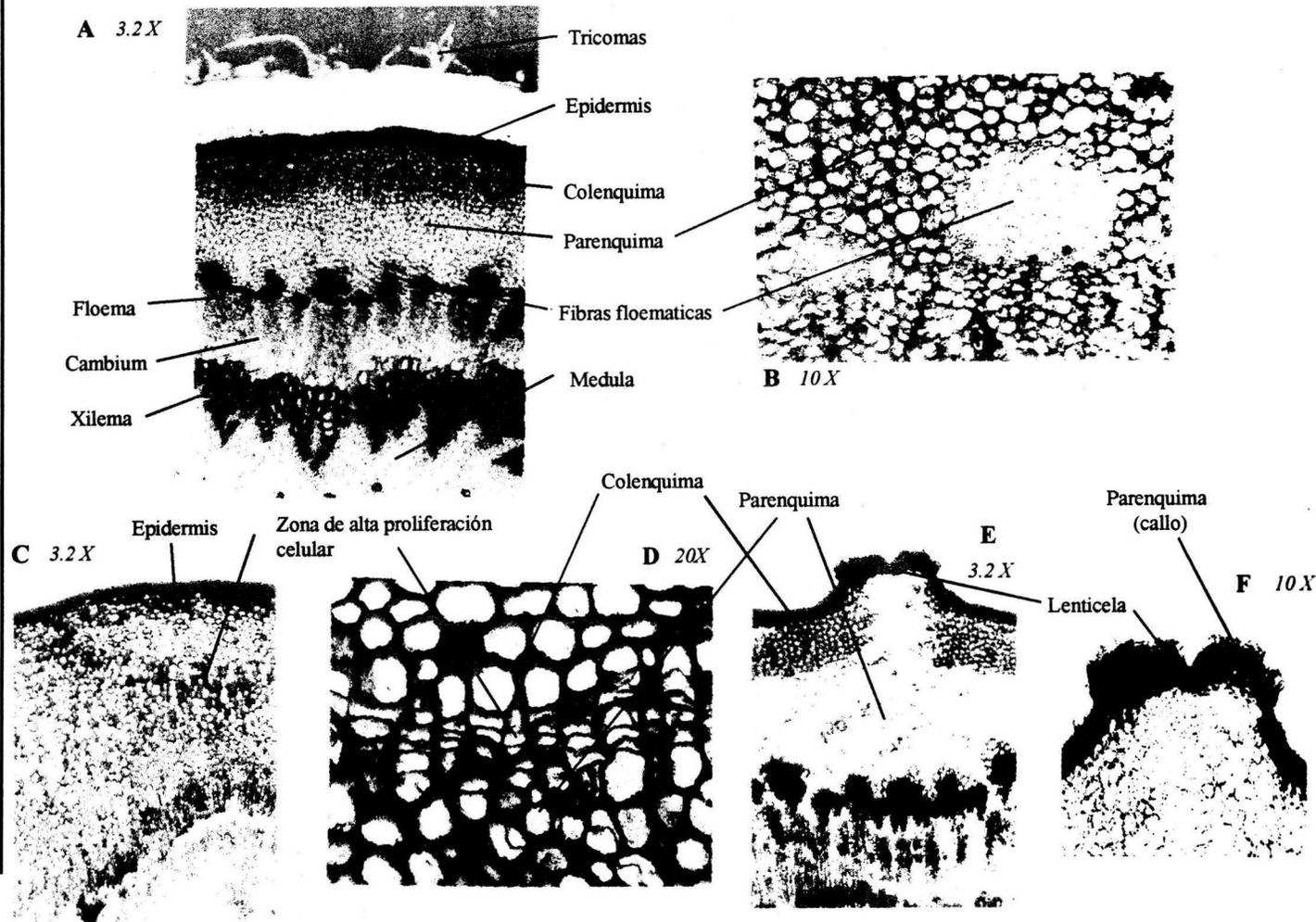
Esquema I. Anatomía general del tallo de aguacate var. Fuerte "in vivo" observado transversalmente en el microscopio electrónico de barrido, (técnica CA).



Esquema 2. Anatomía general de la hoja y peciolo de aguacate var. Fuerte "in vivo" observado transversalmente en el microscópio óptico.



Esquema 3. Comparación de los tallos de aguacate var. Fuerte "in vivo" e "in vitro" observado transversalmente en el microscópio óptico y electrónico.



CONCLUSIONES

En base a los objetivos planteados se puede concluir que:

- El tipo de explante óptimo son estacas de ramas laterales terminales con una longitud de 2.5-3.0 cm y 6-8 mm de diámetro y con 1-3 meristemos.
- Los estados fenológicos vegetativos A y B son los adecuados para inocular los explantes.
- El método de desinfección que permite la activación y disminuye la contaminación consiste en agitación en alcohol etílico al 70% durante 3 minutos, seguido de agitación en bicloruro de mercurio (HgCl₂) al 0.05% durante 15 minutos.
- El medio de cultivo que permite el mejor desarrollo de brotes, de primordios foliares y masas celulares "callo" en un menor tiempo es el "F" basado en las sales minerales de Murashige y Skoog, (1962) y adicionado con benzil amino purina (BAP) a una concentración de 0.0001 g/l.
- Las condiciones extrínsecas favorables para el cultivo *in vitro* de la variedad "Fuerte" son: una temperatura de 25°C +/- 2°C y fotoperíodos de 16 hrs luz /8hrs oscuridad.
- La adición individual de AIB no tiene efectos significativos en el crecimiento de los explantes de aguacate, variedad Fuerte.
- Las combinaciones de kinetina (0.0003 g/l) + AIB (0.0001 g/l), inducen efectos significativos en el desarrollo "*in vitro*" de aguacate, variedad Fuerte.
- Una concentración de 0.06g/l de kinetina +0.02 g/l de AIA estimula la formación de masas celulares "callo".
- La presencia de hojas y masas celulares "callo" en el tallo estimulan el desarrollo de raíces.
- No se observaron diferencias anatómicas significativas en el tallo del desarrollo "*in vitro*" e "*in vivo*".
- El callo tiene su origen a nivel de la corteza a través de la dediferenciación de las células del tejido de colénquima poco especializado.
- El medio nutritivo designado como el más óptimo (medio F) con una concentración de 0.0001 g/l de BAP, no provocó cambios a nivel histológico en los tallos cultivados "*in vitro*".

SUGERENCIAS

En base a los resultados de este trabajo y a la bibliografía consultada se propone lo siguiente con el fin de inducir la formación de raíces:

En base a la concentración de BAP considerada en este trabajo como la más adecuada, realizar un gradiente de concentraciones para optimizarla.

0.001 g/l ← 0.0001 g/l → 0.00001 g/l

Realizar un pretratamiento de desinfecciones a los arboles madre, con el fin de disminuir la contaminación mediante la aplicación de fungicidas y bactericidas.

Una vez obtenido el estado fenológico "E" y el callo, inocular a los explantes en medios de cultivo líquidos que contengan auxinas (AIB, ANA AIA y 2,4-D, en un rango de 5-10 ppm) e inocular en medios que contengan las anteriores auxinas en combinación con BAP a la concentración resultante del primer punto. Al mismo tiempo mantener la base de cada explante en oscuridad.

Una vez obtenido el estado fenológico "E" y el callo, colocarlos a temperatura bajas (en un rango de 15 a 20°C), fotoperíodo de día corto (8 hrs luz/ 16 hrs oscuridad) e iluminación parcial.

APENDICE I

ETAPA EXPERIMENTAL II

Medio de Murashige y Skoog, 1962.

Para la elaboración de los medios nutritivos, se prepararon soluciones stock de los siguientes elementos:

*Solución I (Sales minerales) **

Se disolvió cada una de las siguientes sales en 200 ml de agua destilada. Posteriormente, todas ellas se incorporaron en un frasco ámbar estéril, formando una mezcla homogénea de 2000 ml.

NH ₄ NO ₃	33.0 g	MnSO ₄ 4H ₂ O	0.446 g
KNO ₃	38.0 g	ZnSO ₄ 7H ₂ O	0.172 g
CaCl ₂ 2H ₂ O	8.8 g	KI	0.0166 g
KH ₂ PO ₄	3.4 g	NaMoO ₄ 2H ₂ O	0.005 g
H ₃ BO ₃	0.124 g	CuSO ₄ 5H ₂ O	0.0005 g

*Solución II (Sulfato de magnesio) **

MgSO₄ 7H₂O 3.7 g en 100 ml de agua destilada.

*Solución III (FeEDTA) **

(1) Na ₂ EDTA	0.745 g
(2) FeSO ₄ 7H ₂ O	0.557 g

Se disolvió el reactivo (1) en 20 ml de agua destilada estéril caliente, y el (2) en 20 ml de agua destilada estéril, se mezcló (1) y (2) dejándose enfriar y por último se aforaron con agua destilada estéril a 100 ml.

*Solución IV (Vitaminas) **

Glicina	200 mg
Ácido nicotínico	50 mg
Piridoxina (HCl)	50 mg
Tiamina (HCl)	10 mg

Se disolvió cada una de ellas en 20 ml de agua destilada, se mezclaron y se aforaron a 100 ml.

Nota: Las soluciones anteriores fueron guardadas en frascos ámbar y mantenidas bajo refrigeración.

Solución V

Agar	6 g
Sacarosa	30 g

Se disolvieron en 500 ml de agua destilada , agitándose hasta hervir.

Medio "N".

Para preparar un litro de medio, se agregaron las siguientes cantidades de las soluciones anteriores:

Solución I	100 ml
Solución II	10 ml
Solución III	5 ml
Solución IV	1 ml
Myo-inositol	0.1 g disuelto en 20 ml de agua destilada.

- Se aforó con agua destilada a 500 ml, ajustando el pH a 5.6-5.7.
- Dicha solución se mezcló perfectamente con 500 ml de la solución V.
- Se agregaron 25 ml de la mezcla anterior a tubos de ensaye y se esterizaron en el autoclave.
- Se dejaron enfriar y se procedió a sembrar en ellos.

ETAPA EXPERIMENTAL III

Vitaminas (Medio MB).

(*)

Fosfato monobásico de sodio	0.150 g
Sulfato de adenina	0.080 g
Ac. ascórbico	0.025 g
Glicina	0.002 g
Ac. nicotínico	0.001 g
Piridoxina	0.001 g
Tiamina	0.001 g
Pantotenato de calcio	0.001 g

Cada una se disolvió en 20 ml de agua, se mezclaron y se aforaron a 200 ml.

APENDICE II

FASE DESCRIPTIVA

Análisis histológico

FAA:

Formol	100 ml
Alcohol etílico al 96%	500 ml
Ac. acético glacial	50 ml
Agua destilada	350 ml

Adhesivo de Haupt:

- 1 gr de gelatina en 100 ml de agua tibia (35°C)
- 2.9 gr de cristales de fenol o 0.5 gr de benzoato de sodio
- 13 ml de glicerina (opcional)

Se disuelve la gelatina en 100 ml de agua tibia (35°C), una vez disuelta se agregan los cristales de fenol y la glicerina, se agita bien y se filtra. Esta solución debe mantenerse en refrigeración.

Safranina (Fenol)

Safranina O	0.5 gr
Sulfato de amonio	130 gr
Fenol	0.1 gr
Agua	1 lt

Disolver la safranina en 500_700 ml de agua; se añade el sulfato de amonio, el fenol y el agua.

Verde Rápido (Alcohol 96%)

Verde rápido	0.75 gr
Alcohol 96%	250 ml

Mezclar y agitar durante 20-30 min en un agitador magnético y filtrar.

Azul de Toloidina

Azul de toluidina	0.5 gr
Solución amortiguadora	100 ml

Para preparar la solución amortiguadora se disolvieron 9.5 ml de acetato de sodio (concentración de 16 mg por cada 20 ml de agua destilada) y 7.0 ml de ácido clorhídrico en 500 ml de agua destilada.

Solución de Jeffrey

Acido nítrico concentrado	10 g
Trióxido de cromo	10 g

Se mezclan y se diluyen en 80 ml de agua destilada.

APENDICE III

Análisis de varianza

Fuente de Variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados (Sc)	Cuadrado Medio (CM)
Debida al tratamiento	K-1	$\sum \frac{T_i^2}{n_i} - \frac{T_{..}^2}{N}$	$\frac{Sc \text{ trat.}}{k-1}$
Debida al error	N-K	Sc total - Sc trat.	$\frac{Sc \text{ error}}{N-k}$
TOTAL	N-1	$\sum \sum Y^2_{ij} - \frac{T_{..}^2}{N}$	

Notación :

- N = Número total de repeticiones ú observaciones
 K = Número de grupos o tratamientos a comparar
 T_i = Suma total de observaciones que se les aplica al j-ésimo tratamiento (total por tratamiento)
 n_i = Número de observaciones por tratamiento
 Y_{ij} = La i-ésima observación con el j-ésimo tratamiento
 T_{..} = Suma total de todas las observaciones

Medios Nutritivos

	B	H	R	F	MB	K	CH	CONTROL	
T_i	74	80	93	110	66	60	68	55	T _{..} =606
X	2.466	2.666	3.1	3.666	2.2	2.0	2.26	1.8	

Calculos :

$$SC_{\text{trat.}} = \left[\frac{(110)^2}{30} + \frac{(80)^2}{30} + \frac{(74)^2}{30} + \frac{(93)^2}{30} + \frac{(66)^2}{30} + \frac{(60)^2}{30} + \frac{(68)^2}{30} + \frac{(55)^2}{240} \right] - \frac{(606)^2}{240} = 1607.622 - 1530.15 = 77.512$$

$$SC_{\text{total}} = 625 + 752 + 297 + 376 + 6 = 2056 - \frac{(606)^2}{240} = 2056 - 1530.15 = 525.85$$

$$Sc_{\text{error}} = 525.85 - 77.512 = 448.338$$

$$Cm_{\text{trat.}} = \frac{77.512}{7} = 11.073$$

$$Cm_{\text{error}} = \frac{448.338}{232} = 1.932$$

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de Cuadrados (SC)	Cuadrado Medio (CM)	
Debida al tratamiento	7	77.512	11.073	F calculado $F_o = 5.7313$
Debida al error	232	448.338	1.932	F de tablas $F^{05} = 2.01$ 7,232
TOTAL	239	525.85		

Se concluye que no existen diferencias significativas entre los tratamientos
 $5.7313 > 2.01 \Rightarrow F_{oc} > F_t^{05}$

Prueba de Tukey :

	XN	XK	XMB	XCH	XB	XH	XR	XF
CONTROL	--	0.2	0.4	0.46	0.66	0.86	1.3*	1.86*
K	-0.2	--	0.2	0.26	0.46	0.66	1.1*	1.66*
MB	-0.4	-0.2	--	0.06	0.26	0.46	0.9	1.44
CH	-0.46	-0.26	0.06	--	0.20	0.40	0.84	1.40*
B	-1.46	-0.46	-0.26	-0.20	--	0.2	0.63	1.2*
H	-0.86	-0.66	-0.46	-0.40	-0.2	--	0.43	1
R	-1.3	-1.1	-0.9	-0.84	-0.63	-0.43	--	0.56
F	-1.86	-1.66	-1.46	-1.40	-1.2	-1	-0.56	--

$$DMSR = Q_{8,232} \frac{C_{merror}}{n}$$

$$4.29 \frac{1.932}{30} = 1.088$$

GLOSARIO

Adventicios. Desarrollo proveniente de puntos de origen inusuales, como los tejidos de yemas y raíces salidos de callo ó embriones originados de otras partes que no son los cigotos.

AIA. Acido Indol Acetico. Fitohormona perteneciente a las auxinas.

AIB. Acido Indol Butirico. Fitohormona. perteneciente a las auxinas.

Ápice. Estructura que consiste del meristemo de la yema apical más primordios, usualmente miden de 0.1-1.0 mm de largo.

BAP. Benzil Amino purina. Ftohormona perteneciente a las citocininas

Callo. Proliferación de masas inorganizadas de células indiferenciadas de plantas.

Célula somática. Cualquier célula diploide del cuerpo que no interviene en la gametogénesis.

Clon. El término puede referirse a un cultivo derivado de una sola célula por mitosis ó a un grupo de plantas propagadas vegetativamente y asexualmente, esto significa que todos los individuos han sido derivados de una propagación repetida de un solo individuo.

Cotiledón. Primera o dos primeras hojas del embrión en la semilla que generalmente funcionan como órganos de almacenamiento y absorción.

Cultivo de tejidos. El mantenimiento ó crecimiento de tejidos, *in vitro*, en el sentido que puede producir diferenciación y preservación de la arquitectura y/ó función.

Desinfectante. fungicidas, fumigantes, bactericidas u otros productos químicos que se usan como tratamientos preventivos o curativos para fitopatógenos.

Diferenciación. Proceso donde las células adquieren una morfología específica de acuerdo a su función.

Diploide. Número cromosómico de $2n$, es decir con dos juegos de cromosomas. El tejido somático es normalmente diploide.

Drupa.- Fruto con hueso, con exocarpio liso, mesocarpio pulposo y endocarpio leñoso y pétreo.

Embriogénesis. El proceso de iniciación y desarrollo del embrión.

Embriogénesis somática. En cultivo de plantas, el proceso de iniciación y desarrollo del embrión proveniente de células vegetativas ó no gaméticas.

Estéril. (a) Sin vida. (b) Inhabilidad de un organismo a producir gametos funcionales.

Explante. Célula, tejido u órgano tomado de su sitio original y transferido a un medio artificial para su crecimiento y mantenimiento.

Fijación. Método citogenético que mata y conserva a las células en la división meiótica o mitótica, para estudiar microscópicamente cada etapa, fase o subfase del proceso de multiplicación celular.

Foliar. estructuras botánicas que forman o semejan hojas. También se designa así a los primordios foliares o meristemos apicales que desarrollan hojas.

Fotoperíodo. Es el número de horas luz y horas oscuridad necesarias para la inducción de la floración y consecuentemente los óptimos resultados, sea en producción, calidad u otros caracteres.

GA₃. Acido Giberelico. Fitohormona perteneciente a las giberelinas.

Germoplasma. Conjunto del material genético de una especie e inclusive de varias especies, razas, grupos, individuos o en general la colección más completa de la variabilidad genética en las poblaciones para constituir "bancos genéticos" que sirven como fuentes de materiales.

Herbácea. Plantas u órganos constituidos por tejidos suaves, no lignificados, semejantes a las hierbas.

Híbrido. Primera generación filial (F1) de la cruce entre dos progenitores genéticamente diferentes, que pueden ser líneas puras, variedades, o razas, especies y aún géneros.

Hipocotilo. La primera parte del eje embrionario de una semilla que se halla abajo de los cotiledones. Su extremo o radícula es la que forma la raíz.

Hormona. Sustancia orgánica, producida en una parte de la planta, pero transportada a otra donde afecta los procesos fisiológicos o del desarrollo.

Indiferenciado. Estado en células vegetales, en donde no existe una función definida y por lo tanto tampoco una morfología definida.

Inducción. Iniciación de una estructura (célula, tejido u órgano) a un proceso *in vitro*.

Injerto. Material vegetativo (yema, estaca, etc) que se inserta en otro denominado patrón o porta-injerto. Ambos; injerto y portainjerto, son genotípicamente diferentes; aportando el primero, caracteres de rusticidad, adaptación, resistencia a condiciones adversas, etc.

In vivo. Es un organismo vivo como un animal o una planta en su ambiente natural.

In vitro. Parte ó un todo de un organismo cultivado dentro de un recipiente de vidrio en un medio artificial.

Inoculación. Introducir un organismo o parte de él denominado inóculo en un medio artificial.

Kin. Kinetina ó Cinetina. Fitohormona perteneciente a las citocininas.

Libre de patógenos. Libre de organismos dañinos (bacterias, virus, etc).

Meristemo. Tejido en multiplicación celular activa para formar y diferenciar los órganos de una planta (hoja, ramas, flores, frutos, semillas, etc.).

Meristemo de la yema apical. Tejido indiferenciado, localizado en la punta de la yema, generalmente aparece como un domo-brillante como una estructura distal al más joven primordio de la hoja y mide menos de 1 mm de largo cuando se extrae.

Micropropagación. Propagación clonal *in vitro* de plantas de puntas de yemas o explantes nodales, usualmente con un acelerada proliferación de yemas durante los subcultivos.

Morfogénesis. (a) La evolución de una estructura de un estado indiferenciado ó diferenciado. (b) El proceso de crecimiento y desarrollo de estructuras diferenciadas.

Organogénesis. Un proceso de diferenciación por el cual los órganos de las plantas son *de novo* formación ó de estructuras preexistentes. En biología del desarrollo, este termino se refiere a la diferenciación de un sistema de órgano proveniente del tallo ó de células precursoras.

Pedúnculo. Estructura botánica que sostiene a una inflorescencia.

Plántula. Pequeña planta en sus primeras fases del desarrollo que generalmente cuenta con tallo, hojas y raíces.

Primordio. Rudimento de un órgano vegetal en los comienzos de su desarrollo.

Propagación clonal. Reproducción asexual de plantas que son consideradas genéticamente uniformes.

Propagación *in vitro*. Propagación de plantas en ambientes artificiales controlados, usando frascos de cultivo de plástico ó de vidrio, técnicas asépticas y un medio de crecimiento definido.

Propagación vegetativa. Reproducción de plantas usando un proceso asexual que envuelve el cultivo de las partes de una planta como un tallo, cortes de hojas etc..

Regeneración. En cultivo de plantas, una respuesta morfogénica a un estímulo que resulta en la producción de órganos, embriones ó toda la planta.

Subcultivo. Proceso por el cual el tejido ó explante es transferido a medios nuevos de cultivo.

Técnica aséptica. Procedimiento usado para prevenir la introducción de hongos, bacterias, virus, micoplasma u otro microorganismo en los cultivos de células, tejidos u órganos. Aunque estos procedimientos son usados para prevenir la contaminación microbiana en cultivos. Estos pueden o no excluir la introducción de moléculas infecciosas.

Totipotencialidad. Característica de una célula de formar todos los tipos celulares de un organismo adulto conservado las características del progenitor.

Vareta. Una porción terminal de ramas con yemas vegetativas latentes que se utilizan para propagar por injertación.

REFERENCIAS

- ◆ Abbott, A. J. 1978. PRACTICE AND PROMISE OF MICROPROPAGATION OF WOODY SPECIES. *Acta Horticulturae* 79. Reino Unido. 113-127.
- ◆ Aguilar, R. S. 1995. Técnicas de laboratorio para el estudio de plantas embriofitas: En Tejero Díaz. PLANTAE. INTRODUCCIÓN AL ESTUDIO DE LAS PLANTAS CON EMBRIÓN. UNAM Campus Iztacala. 509.
- ◆ Arcos, O. G y Pérez, R. C. 1994. INFORME TÉCNICO. Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares. México 15.
- ◆ Barnard, R. O; Cillie, G. E. y Kotzé, J. M. 1991. DEFICIENCY SYMPTOMS IN AVOCADOS. S. African Avocado Growers' Assoc. Yb. (14): 67-71.
- ◆ Barrera, 1995. COMUNICACIÓN PERSONAL. Universidad de Guanajuato.
- ◆ Barrientos, A; Priego, M. W y Barrientos, P. F. 1986. ROOTING OF AVOCADO CUTTINGS (*Persea americana* Mill) vs. FUERTE AND COLIN V-33. California Avocado Soc. Yb. (70): 157-163.
- ◆ Bautista, B. J. 1989. ESTUDIO ANATÓMICO COMPARATIVO DEL AGUACATE (*Persea americana* Mill) CRIOLLO MEXICANO, FUERTE Y HASS. Tesis de Maestría. Conafrut. 112.
- ◆ Bernier, G; Havelange, A; Houssa, C; Petitjean, A y Lejeune, P. 1993. PHYSIOLOGICAL SIGNALS THAT INDUCE FLOWERING. *The Plant Cell*. (5): 1147-1155.
- ◆ Bidwell, R. G. 1990. FISIOLÓGIA VEGETAL. Ed. A.G.T. México. 380.
- ◆ Blicke, 1986. En: Yasseen Mohamed-Yasseen, 1993.
- ◆ Borys, J. M. W; Barrera, G. L y Luna, L. J. 1985. SOME ROOT. CHARACTERISTICS OF AVOCADO (*PERSEA AMERICANA* MILL.) SEEDLINGGS OF THE WEST INDIAN AND GUATEMALAN RACES. California Avocado Soc. Yb. (69): 111-121.
- ◆ Botha, T. F. C y Wehner y Kotzé, J. M. 1991. *IN VITRO* SCREENING OF TOLERANCE TO *Phytophthora cinnamomi* IN AVOCADO ROOTSTOCKS. World Avocado Congress II. Abstracts. Calif. U.S.A. 256.
- ◆ Bowling, D. J. 1976. UPTAKE OF IONS BY PLANT ROOTS. Chapman and Hall. Ltd. London.

-
-
- ◆ Brokaw, W. H. 1982. CLONAL ROOTSTOCKS: PERSONAL OBSERVATIONS AND A PEEK INTO THE FUTURE. *California Avocado Soc. Yb.*(66): 81-92.
 - ◆ Butenko, R. G. 1964. THE HISTORY THE DEVELOPMENT METHODS FOR CULTIVATION EXCICED PLANT TISSUE. *Plant tissue culture and plant morphogenesis. Univ. Mic. Int.* 30-32.
 - ◆ Caplin, S. M y Steward, F. C. 1952. INVESTIGATIONS ON THE GROWTH AND METABOLISM OF PLANT CELLS. I. EVIDENCE FOR GROWTH INHIBITORS INVESTIGATIONS IN CERTAIN MATURE TISSUE. *Annals of Botany, N. S.* XVI (64): 197-213.
 - ◆ Carmi, A y Van Standen, J. 1983. ROLE OF ROOTS IN REGULATING THE GROWTH RATE AND CYTOKININ CONTENT IN LEAVES. *Plant Physiol* (73): 76-78.
 - ◆ CICTAMEX, S. C. 1982-1985. TRES AÑOS DE ACTIVIDADES DEL CENTRO DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS Y TECNOLÓGICAS DEL AGUACATE EN EL ESTADO DE MEXICO. *Memoria. Coatepec Harinas México.*280.
 - ◆ Conger, B. V. 1987. CLONING AGRICULTURAL PLANTS VIA *IN VITRO* TECHNIQUES. C. R. C. Press. United States. 1-35,51-134.
 - ◆ Cooke, C. R. 1977. TISSUE CULTURE PROPAGATION OF AFRICAN VIOLETS. *HortScience.* 12(6): 549.
 - ◆ Costas, G y Raj Kumar, D. 1982. SOME ASPECTS OF SHOOT AND ROOT GROWTH OF AVOCADO UNDER LOWLAND TROPICAL CONDITIONS. *California Avocado Soc. Yb.* (66): 127-144.
 - ◆ Cruz, G. M. T. 1973. RESPUESTAS DE CRECIMIENTO DEL CULTIVO DE TEJIDOS DEL MERISTEMO RADICULAR DE *Zea mays* A DIVERSAS SUSTANCIAS QUIMICAS. *Revista de la Soc. Mex. De Historia Natural.* Tomo XXXIV: 35-42.
 - ◆ Cruz, G. M. T. 1994. COMUNICACIÓN PERSONAL. Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares.
 - ◆ Cutting, J. G y Van Vuuren, S. P. 1988. ROOTING LEAFY NON-ETIOLATED AVOCADO CUTTINGS FROM GIBBERELLIN-INFECTED TREES. *Scientia Horticulturae.* (37): 171-176.
 - ◆ Chasan, R. y Virginia, W. 1993. MECHANISM OF PLANT REPRODUCTION: QUESTIONS AND APPROACHES. *The Plant Cell.* (5): 1139-1146.
 - ◆ Debergh, P. C y Zimmerman, R. H. 1991. MICROPROPAGATION TECHNOLOGY AND APLICACION. *Kluwer Academic Publishers. Netherlands.* 192-197.
-
-

-
-
- ◆ DeFossard, R. 1976. TISSUE CULTURE FOR PLANT PROPAGATORS. University of New England Printery. Australia.
 - ◆ De la Cruz, T. E. 1994. COMUNICACIÓN PERSONAL. Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares.
 - ◆ De la Cruz, T. E y Reyes, J. C. A. 1992. CARACTERIZACIÓN AGROCLIMÁTICA DEL MUNICIPIO DE COATEPEC HARINAS, MEXICO. Memoria, CICTAMEX. S. C. Coatepec Harinas, México. 47-54.
 - ◆ De La Cruz, T. E y Rubí, A. M. 1992. PERSPECTIVAS DEL COMERCIO INTERNACIONAL DEL AGUACATE. UNA REVISIÓN. Memoria. CICTAMEX. S. C. Coatepec Harinas, México. 195-204.
 - ◆ Desjardins, P. R. 1958. CALLUS TISSUE GROWTH ON AVOCADO STEM SEGMENTS CULTURED ON ARTIFICIAL MEDIA. California. Avocado. Soc. Yb. (42): 99-101.
 - ◆ Devlin, M. R. 1975. FISIOLOGÍA VEGETAL. Ed. Omega. Barcelona. 468.
 - ◆ Dodds, J. H y L. W. Roberts. 1986. EXPERIMENTS IN PLANT TISSUE CULTURE. Nutritional Components of Tissue Culture Media. Cambridge University Press. England. Pp. 35-53; 248-263.
 - ◆ Eggers, E. R y Halma, F. F. 1937. ROOTING AVOCADO CUTTINGS. California. Avocado. Asoc. Yb. (21): 121-125.
 - ◆ Ernst A. A y Holtzhausen, L. C. y. 1987. CALLUS DEVELOPMENT A POSSIBLE AID IN ROOTING AVOCADO CUTTINGS. S. African Avocado Growers' Assoc. Yb. (10): 39-41.
 - ◆ Esau, K. 1960. ANATOMY OF SEED PLANTS. 2a edición. De John Wiley, Sons Inc. USA. 550.
 - ◆ Esau, K. 1985. ANATOMÍA VEGETAL. 3a edición. Ed. Omega. Barcelona. 779.
 - ◆ Estrada, F. E; Peralta, Z. L y Rivas, M. P. 1982. MANUAL DE TÉCNICAS HISTOLÓGICAS. AGT EDITOR, S. A. México. 140.
 - ◆ Fahn, A. 1978. ANATOMÍA VEGETAL. Ed. Blume. Madrid. 643.
 - ◆ Fleming, J. A y Kuhlemeier, C. 1994. ACTIVATION OF BASAL CELLS OF THE APICAL MERISTEM DURING SEPAL FORMATION IN TOMATO. The Plant Cell. (6): 789-798.
-
-

-
-
- ◆ Gamborg, O. L y Wetter, L. R. 1975. ESTABLISHMENT OF NITROGEN FIXING ASSOCIATION BETWEEN *Rhizobium* AND SOYBEAN TISSUE CULTURE: Appendix I. Plant Tissue Culture Methods. 90.
 - ◆ García, V. A. 1972. ESTUDIO CITOLÓGICO DEL "Chinini" (*Persea schideana*). Agrociencia. Serie B. México. (8): 67-71.
 - ◆ Gazit, S y Blumenfeld, A. 1971. TISSUE CULTURES OF CALLUS DERIVED FROM AVOCADO FRUIT. California Avocado Soc. Yb. (55): 105-109.
 - ◆ Gillespie, H. L. 1957. STEM-ROOTING VARIETAL CLONES BY MEANS OF "JUVENILE GROWTH PHASE" LEAFY-STEM NURSE CUTTINGS. California. Avocado. Soc. Yb. (41): 94-96.
 - ◆ Gómez, R. E; Soule, J y Malo, E. S. 1971. AVOCADO AIR LAYERS A STUDY OF SEVEN VARIETIES DURING A YEARS CYCLE. Proc. of the Tropical Region. American Society for Hort Science. XIX Annual Meeting. (15): 113-120.
 - ◆ Gómez, R. E; Soule, J y Malo, E. S. 1973. ANATOMICAL ASPECTS OF AVOCADO STEM WITH REFERENCE TO ROOTING. Proc. of the Tropical Region American Society for Hort Science XIX Annual Meeting. (15): 23-28.
 - ◆ González, J. J. 1993. IRRADIACIÓN DE MERISTEMOS *IN VITRO* PARA INDUCIR MUTACIONES EN PLANTAS DE ORNATO (*Petunia híbrida*). Tesis de Licenciatura (Biología). México, D.F. 140.
 - ◆ González, J. J; Pérez, R. C y Arcos, O. G. 1995. INFORME TÉCNICO. Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares. México. 16.
 - ◆ González, J. J. 1995. COMUNICACIÓN PERSONAL. Instituto nacional de Investigaciones Nucleares.
 - ◆ González, R. H y Salazar, G. 1984. ROOT INDUCTION AND VEGETATIVE DEVELOPMENT FROM AVOCADO PLANTULES (*Persea americana* Mill.). California Avocado Soc. Yb. (68): 167-171.
 - ◆ González, R. H; Salazar, G. S y Vázquez, V. 1985. PROPAGATION *IN VITRO* OF "CHININI" (*PERSEA SCHIDEANA* NEES). California Avocado Soc. Yb. (69): 125-131.
 - ◆ González, R. H; Llano, A. B y Salazar, G. S. 1990. EFFECT OF INDOL BUTIRIC ACID, KINETIN AND BENZYL AMINO PURINE ON THE GERMINATION, SHOOT DEVELOPMENT AND ROOT FORMATION IN AVOCADO EMBRYOS CULTIVATED *IN VITRO*. California Avocado Soc. Yb. (74): 201-205.
-
-

-
-
- ◆ González, R. H; Ramírez, R. G; Rodríguez, O. J. L y Salazar, G. S. 1991. PRELIMINARY RESULTS ON *IN VITRO* SELECTION FOR TOLERANCE TO CHLORIDE EXCESS IN AVOCADO. WORLD AVOCADO CONGRESS II. ABSTRACTS. 149.
 - ◆ González, R. H; Meléndez, H J y Morales, D. P. 1992. CULTIVO DE EMBRIONES PARA LA SELECCIÓN DE GENOTIPOS TOLERANTES A CONDICIONES DE AGOBIO. En: Memorias XIV Congreso Nacional de Fitogenética. Universidad Autónoma de Chiapas. Tuxtla Gutiérrez, Chis. México. 132.
 - ◆ Gustafson, C. D y Kadman, A. 1970. EFFECT OF SOME PLANT HORMONES ON THE ROOTING CAPACITY OF AVOCADO CUTTINGS. California Avocado Soc. Yb. (53): 97-100.
 - ◆ Guzmán, J. 1995. COMUNICACIÓN PERSONAL. Instituto Nacional de Investigaciones en Materiales UNAM.
 - ◆ Harry, J. F y Donald, D. R. 1984. BOTÁNICA GENERAL. 11 edición. Ed. CECSA. México. 272.
 - ◆ Hartmann, H. T y Kester, D. E. 1987. PROPAGACIÓN DE PLANTAS. Ed. CECSA. México. 597-605.
 - ◆ Hartmann, W. 1982. THE IMPORTANCE OF SELECTION FOR AN ECONOMICAL PRODUCTION OF THE GERMAN PHIM HAUSZWETSCHKE. Abstracts XXIst International Horticultural Congress. Germany. 1201.
 - ◆ Harty, P. 1985. PROPAGATION OF AVOCADO BY TISSUE CULTURE: DEVELOPMENT OF A CULTURE MEDIUM FOR MULTIPLICATION OF SHOOTS. S. African Avocado Growers Assoc. Yb. (8): 70-71.
 - ◆ Hass, A. R. C. 1937. FURTHER PROGRESS IN THE ROOTING OF FUERTE AVOCADO CUTTINGS. California Avocado Assoc. Yb. (21): 130-132.
 - ◆ Helgeson, J. P. 1980. PLANT TISSUE AND CELL SUSPENSION CULTURE. En: Tissue Culture Methods for Plant Pathologists. Ingram D.S. y Hegeson J.P. (ed.): 19-25. Blackwell Scientific Publication of new clones of woody fruit plants. Comb. Proc. Pl. Prop. Soc. (26): 113-115.
 - ◆ Hendry, N. S y Staden, J. V. 1982. ATTEMPTS AT PROPAGATION OF AVOCADOS USING VARIOUS TECHNIQUES. S. African Avocado Growers Assoc. Yb. (5) :71-73.
 - ◆ Herbert, L. G. 1957. STEM-ROOTING VARIETAL CLONES BY MEANS OF "JUVENILE GROTH PHASE". LEAFY-STEM NURSE CUTTINGS. California Avocado Soc. Yb. (41): 94-96.
-
-

-
-
- ◆ Huala, E y Sussex, M. I. 1993. DETERMINATION AND CELL INTERACTIONS IN REPRODUCTIVE MERISTEMS. *The Plant Cell*. (5): 1157-1165.
 - ◆ Hussey, G. 1978. THE APPLICATION OF TISSUE CULTURE TO THE VEGETATIVE PROPAGATION OF PLANTS. *Science Progress*. (65): 185-208.
 - ◆ IAWA Committee 1989. IAWA LIST OF MICROSCOPIC FEATURES FOR HARD WOOD DIAMETER AND RAY WIDTH. *IAWA BULL.* n. s. 10: 219-332.
 - ◆ Juscafresa, B. 1978. ARBOLES FRUTALES. CULTIVO Y EXPLOTACIÓN COMERCIAL. 7a edición. Ed. AEDOS. España. pp. 6-7, 903-906.
 - ◆ Kadman, A. 1976. EFFECT OF THE AGE OF JUVENILE STAGE AVOCADO SEEDLINGS ON THE ROOTING CAPACITY OF THEIR CUTTING. *California Avocado Soc. Yb.* (59): 58-60.
 - ◆ Kadman, A. y Ben Yaacov, A. 1965. A REVIEW OF EXPERIMENTS ON SOME FACTORS INFLUENCING THE ROOTING OF AVOCADO CUTTINGS. *California Avocado Soc. Yb.* (49): 67-72.
 - ◆ Kadman, A y Gustafson, C. A. 1970. THE USE OF POTASSIUM SALT OF INDOLE BUTYRIC ACID (KIBA) IN ROOTING AVOCADO CUTTINGS. *California Avocado Soc. Yb.* (53): 96-99.
 - ◆ Kanichi Mori. 1971. PRODUCTION OF VIRUS-FREE PLANTS BY MEANS OF MERISTEM CULTURE. *JARQ* 6 (1): 1-7.
 - ◆ Kenneth, C. T. 1989. TISSUE CULTURE TECHNIQUES FOR HORTICULTURAL CROPS. Ed. Van Nostrand Reinhold. New York. 57-67.
 - ◆ Kyte, L. 1987. PLANTS FROM TEST TUBES: AN INTRODUCTION TO MYCROPROPAGATION. Timber press. Portland, Oregon. 5-20.
 - ◆ Lelyveld, V. 1984. En Yasseen Mohamed-Yasseen, 1993.
 - ◆ Levine, S. 1982. DESARROLLO METODOLÓGICO PARA LA PROPAGACIÓN VEGETATIVA *IN-VITRO* DEL AGUACATE. Tesis de Licenciatura. (Biología). ENEP: Iztacala. UNAM. 97.
 - ◆ Lindsey, K y Jones, M. G. 1989. BIOTECNOLOGÍA VEGETAL AGRÍCOLA. Ed. Acribia. España. 6-7.
 - ◆ López, L. L y De la Cruz, T. E. 1992. SE HACE DINERO CULTIVANDO AGUACATE. UNA INTERROGANTE. Memoria, CICTAMEX. S. C. Coatepec Harinas, México. 185-194.
-
-

-
-
- ◆ Lovatt, J. C. 1993. PHYSIOLOGY OF REPRODUCTION OF CITRUS AND AVOCADO. VI Curso de Actualización Frutícola "Temas Selectos para el Desarrollo de la Fruticultura". Fundación Sanchez Colín. CICTAMEX; S.C. Coatepec de Harinas, México. 118-143.
 - ◆ Llano, A. B. E. 1989. EFECTO DE CITOCININAS Y AUXINAS EN EMBRIONES DE AGUACATE (*Persea americana* Mill. RAZA MEXICANA) CULTIVADOS *IN VITRO*.. Tesis de Maestría. Univ. Aut. de Chapingo, México. 5-82.
 - ◆ Margara, J. L. 1988. MULTIPLICACIÓN VEGETATIVA Y CULTIVO *IN VITRO*. Ed. Mundi -prensa 10-23.
 - ◆ Medford, J. J. 1992. VEGETATIVE APICAL MERISTEMS. The Plant Cell. (4): 1029-1039.
 - ◆ Morel, G y Martín. 1964. LA CULTURE *IN VITRO* DU MERISTEME APICAL. Reveu de cytologie al de biologie vegetale. Tomo XXVII: 307-314.
 - ◆ Morel, G y Weltomore, R. 1951. FEM CALLUS TISSUE CULTURE. American Journal of Plant Tissue (38): 141-143.
 - ◆ Moreno, N. P. 1987. GLOSARIO BOTÁNICO ILUSTRADO. Inst. Nac. de Inv. sobre Rec. Botánicos. CECSA. México. 300.
 - ◆ Murashige, T. 1974. PLANT PROPAGATION THROUGH TISSUE CULTURE. Ann. Rev. Plant. Physiol. (25): 135-166.
 - ◆ Murashige, T y Skoog, F. 1962. A REVISED MEDIUM FOR RAPID GROWTH AND BIO-ASSAYS WITH TOBACCO TISSUE CULTURES. Physiol. Plant. (15): 473-497.
 - ◆ Naylor, E. E y Johnson, B. 1937. A HISTOLOGICAL STUDY OF VEGETATIVE REPRODUCTION IN *Saintpaulia ionantha*. Amer. Jour. Bot. (24): 673-678.
 - ◆ Nel, D. D, Kotzé, J. M. y Snyman, C. P. 1982. *IN VITRO* PROPAGATION OF (*PERSEA INDICA* .) California Avocado Soc. Yb. (66): 167-168.
 - ◆ Nel, D. D y Kotzé, J. M. 1982. TISSUE CULTURE OF AVOCADO. California Avocado Soc. Yb. (66): 68-70.
 - ◆ Nel, D y Kotzé, J. M. 1984. THE ROLE OF TISSUE CULTURE IN THE AVOCADO PLANT IMPROVEMENT SCHEME. S. African Avocado Growers Association, Yb. (7): 25-26.
 - ◆ Nel, M y De Lange, J. H. 1985. SHOOT TIP GRAFTING OF AVOCADO FOR VIRUS AND VIROID ELIMINATION. S. African Avocado Growers Assoc. Yb. (8) : 66-69.
-
-

-
-
- ◆ Nitsch, J. P y Nitsch, C. 1969. HAPLOID PLANTS FROM POLLEN GRAINS. *Science*. (163): 85-87.
 - ◆ Novak, F. J. 1991. PLANT TISSUE CULTURE TECHNIQUES FOR MUTATION BREEDING. A training manual. IAEA laboratories-Seibersdorf. Austria. 194.
 - ◆ Okamuro, J. K y Bart, G. W. 1993. REGULATION OF ARABIDOPSIS FLOWER DEVELOPMENT. *The Plant Cell*. American Society of Plant Physiologist. (5): 1183-1193.
 - ◆ Ortiz, R. V. 1994. COMUNICACIÓN PERSONAL. Universidad de Guanajuato.
 - ◆ Patt-Alora, K. A y Thomson, W. W. 1992. ULTRAESTRUCTURE OF AVOCADO: RIPENING, CHILLING, INJURY AND ISOLATION OF IDIOBLAST OIL CELL. Second World Avocado Congress. USA. 417-425.
 - ◆ Peñaloza, C. I. 1982. INFLUENCIA DE EXTRACTOS DE PLANTAS DE FÁCIL Y DIFÍCIL ENRAIZAMIENTO SOBRE LA FORMACION DE RAICES EN ESTACAS. Tesis de Licenciatura (Biología). Iztacala, UNAM. 2-55.
 - ◆ Pierik, R. L. (1975). VEGETATIVE PROPAGATION OF HORTICULTURAL CROPS IN VITRO WITH SPECIAL ATTENTION TO SHRUBS AND TREES. *Acta Horticulturae* 54, Propagation in arboriculture. Netherland. 71-82.
 - ◆ Pliego-Alfaro y Murashige, T. 1987. POSSIBLE REJUVENATION OF ADULT AVOCADO BY GRAFTING ONTO JUVENILE ROOTSTOCKS *IN VITRO*. *Hort. Science*. (22): 1321-1324.
 - ◆ Pliego-Alfaro y Murashige, T. 1988. SOMATIC EMBRYOGENESIS IN AVOCADO. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. (12): 61-66.
 - ◆ Popenoe, W. 1974. MANUAL OF TROPICAL AND SUBTROPICAL FRUITS. Hafner Press. U.S.A. 9-78.
 - ◆ Purseglove, J. W. 1987. TROPICAL CROPS DYCOTYLEDONS. Ed. Longman. Scientific & technical. Singapore. 248-263.
 - ◆ Radford, A. E; Dickison, W. C; Massey, R. J y Bell, R. 1974. VASCULAR PLANT SYSTEMATICS. arper Row Publishers New York. 83-144; 167-209.
 - ◆ Raghavan, 1980. En Llano, A. 1989.
 - ◆ Reuveni, O y Raviv, M. 1980. IMPORTANCE OF LEAF RETENTION TO ROOTING OF AVOCADO CUTTING. *J. Amer. Soc. Hort. Sci. Israel*. 106(2): 127-130.
-
-

-
-
- ◆ Robles, S. R. 1982. TERMINOLOGÍA GENÉTICA Y FITOGENÉTICA. 2a edición. Ed. Trillas. México. 163.
 - ◆ Rodríguez, S. F. 1982. EL AGUACATE . A. G. T. México. 9-54.
 - ◆ Rojas, G. M. 1979. FISIOLÓGÍA VEGETAL APLICADA. 2a edición. Ed. McGraw-Hill. México. 262.
 - ◆ Romero, L y Díaz de Losada. 1974. REPRODUCTION VEGETATIVA O ASEJUAL DEL AGUACATE. California Avocado Soc. Yb. (56):171-175.
 - ◆ Rubí, A. M y Avitia, G. F. 1995. HISTORIA DEL AGUACATE. CICTAMEX. Coatepec Harinas. Méx. 35.
 - ◆ Rubí, M. A. 1989. DETERMINACIÓN DEL TIPO FLORAL DE SELECCIONES SOBRESALIENTES DE AGUACATE OBTENIDAS POR CICTAMEX. Memoria. Coatepec Harinas. Mexico. 43-48.
 - ◆ Salunkhe, D. K y Desai, B. B. 1984. POSTHARVEST BIOTECHNOLOGY OF FRUITS. C.R.C. Press. United States. 1:24-42.
 - ◆ Sánchez, C. S y Rubí, A. M. 1994. SITUACIÓN ACTUAL DEL CULTIVO DE AGUACATE EN MEXICO. CICTAMEX. S. C. Coatepec de Harinas, México. 17-32.
 - ◆ Schiefelbein, J. W y Philip, N. B. 1991. THE DEVELOPMENT OF PLANT ROOTS: NEW APPROACHES TO UNDERGROUND PROBLEMS. The Plant Cell. (3): 1147-1154.
 - ◆ Schroeder, C. A. 1956. GROWTH OF AVOCADO FRUIT TISSUE ON ARTIFICIAL MEDIA. California Avocado Soc. Yb. (40): 165-168.
 - ◆ Schroeder, C. A. 1968. THE LONGEVITY OF AVOCADO TISSUE *IN VITRO*. California Avocado Soc. Yb. (52): 128-130.
 - ◆ Schroeder, C. A. 1971 THE RESPONSE OF AVOCADO PERICARP TISSUE TO TEMPERATURE AND LIGHT *IN VITRO*. California Avocado Soc. Yb. (54): 85-89.
 - ◆ Schroeder, C. A. 1973. APICAL AND OTHER RESPONSES OF TISSUES OF AVOCADO IN ASEPTIC CULTURE. California Avocado Soc. Yb (56): 138-141.
 - ◆ Schroeder, C. A. 1975. RESPONSE OF AVOCADO FLOWER BUDS AND FLORAL PARTS CULTURE *IN VITRO*. California Avocado Soc. Yb. (58): 66-73.
-
-

-
-
- ◆ Schroeder, C. A. 1976. RESPONSES OF AVOCADO STEM PIECES IN TISSUE CULTURE. *California Avocado Soc. Yb.* (60): 160-163.
 - ◆ Schroeder, C. A. 1977. LONGEVITY OF PLANT TISSUE CULTURES. *California Avocado Soc. Yb.* (61):72-74.
 - ◆ Schroeder, C. A. 1978. EFFECT OF ULTRA VIOLET RADIATION ON AVOCADO FRUIT EXPLANTS *IN VITRO*. *California Avocado Soc. Yb* (62): 131-133.
 - ◆ Shroeder, C. A. 1979. ETIOLATION AND AVOCADO BUD ELONGATION IN VITRO. *California Avocado Soc. Yb.* (63):86-89.
 - ◆ Sedgley, M. 1980. ANATOMICAL INVESTIGATION OF ABCISSSED AVOCADO FLOWERS AND FRUITLETS. *Annals of Botany.* (46): 771-777.
 - ◆ Shizuka, O. 1994. SCANNING ELECTRON MICROSCOPY OF SHOOT DIFFERENTIATION *IN VITRO* FROM LEAF EXPLANTS OF THE *African violet*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture.* (36):157-162.
 - ◆ Skene, K. G. M y Barlass, M. 1983. *IN VITRO* CULTURE OF ABCISSSED IMMATURE AVOCADO EMBRYOS. *Annals of Botany.* (52): 667-672.
 - ◆ Smit, G. L y Hake, S. 1992. THE INITIATION AND DETERMINATION OF LEAVES. *The Plant Cell.* (4): 1017-1027.
 - ◆ Solorzano, V. D. 1989. PROPAGATION *IN VITRO* OF ROOTSTOCK OF AVOCADO. *California Avocado Soc. Yb.* (73): 149-151.
 - ◆ Steward, F. C y Caplin, S. M. 1952. INVESTIGATIONS ON THE GROWTH AND METABOLISM OF PLANT CELLS. III EVIDENCE FOR GROWTH INHIBITORS IN CERTAIN MATURE TISSUE. *Annals of Botany.* XVII: 615-625.
 - ◆ Street, H. E. 1977. PLANT TISSUE AND CELL CULTURE. *Botanical Monographs.* Vol. 11. University California Press. California.
 - ◆ Szymkowiak, J. E y Sussex, I. 1992. THE INTERNAL MERISTEM LAYER (L3) DETERMINES FLORAL MERISTEM SIZE AND CARPEL NUMBER IN TOMATO PERICLINAL CHIMERAS. *The Plant Cell.* (4): 1089-1100.
 - ◆ Tamaro, D. 1984. TRATADO DE FRUTICULTURA. Ed. G. G. Barcelona. 338-342.
-
-

-
-
- ◆ Villalobos, A. V. 1986. MANUAL DE CULTIVO DE TEJIDOS. Universidad Autónoma de Chapingo. Méx. 65-85.
 - ◆ Wayne, W. D. 1993. BIOESTADÍSTICA. 3a edición. Ed. Limusa. México. 322-337.
 - ◆ Weaver, R. 1980. REGULADORES DEL CRECIMIENTO DE LAS PLANTAS EN LA AGRICULTURA. Ed. Trillas. México. 622.
 - ◆ Wenczel, G. 1980. RECENT ADVANCES IN APPLIED TISSUE CULTURE OF POTATO, RAPE AND RYE. Ed. Ciferri. Holanda. 56-70.
 - ◆ White, P. R. 1943a. HANDBOOK OF PLANT TISSUE CULTURE. Ed. Academic Press. 50-62.
 - ◆ Yasseen, Mohamed-Yasseen. 1993. MORPHOGENESIS OF AVOCADO *IN VITRO*. A REVIEW. California Avocado Soc. Yb. (77): 101-105.
 - ◆ Yasseen, Mohamed-Yasseen. 1993a. *IN VITRO* PROPAGATION OF AVOCADO (*Persea americana* Mill). California Avocado Soc. Yb. (77): 107-111.
 - ◆ Young, L. V. 1961. VEGETATIVE PROPAGATION IN AVOCADOS BY MEANS OF MARCOTTAGE AND THE ROOTING OF CUTTINGS. California Avocado Soc. Yb. (45): 63-66.
 - ◆ Zhang R, Letham, D. S; Choon, W. O; Nooden, L. D y Parker, Ch. W. 1987. CYTOKININ BIOCHEMISTRY IN RELATION TO LEAF SENESCENCE. The metabolismo of 6-benzilaminopurine in soybean leaves and the inhibition of its conjugation. Plant Physiol. (83): 334-340.
 - ◆ Ziv, M y Halevy, A. H. 1983. CONTROL OF OXIDATIVE BROWNING AND *IN VITRO* PROPAGATION OF *Strelitzia reginae*. HortScience. 18 (4):434-436.
-
-