

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES

UNIDAD IZTACALA U.N.A.M.

BO10/82 Ej. 3

Biología

DESARROLLO METODOLOGICO PARA LA PROPAGACION
VEGETATIVA "IN VITRO" DEL AGUACATERO.

Tesis Profesional para obtener el Título de "BIOLOGO" que presenta

SANDRA LEVINE BEREICHEZ.



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL DE EDUCACION
PROFESIONAL DE MEXICO



Agradezco a la Comisión Nacional de Frutas y Hortalizas, el haberme permitido realizar este trabajo en sus instalaciones, en especial - al Departamento de Fitoproducción de la Subdirección de Investigación y Docencia de la misma, así como al Dr. José Luis Domínguez-Vera por su valiosa asesoría, y a las personas que de una forma u otra intervinieron - en el desarrollo de este trabajo.

INDICE.-

	<u>Página.-</u>
Indice de Tablas.	III
Indice de Figuras.	IV
Resúmen.-	VI
Introducción.-	1
A) El Aguacate.-	1
1) Origen y Dispersión.	1
2) Variedades.	3
3) Producción.	4
4) Clasificación y Descripción - Botánica.-	7
a) Clasificación.	7
b) Descripción.	8
B) El Arbol Frutal.-	10
1) Propagación del Arbol Frutal	11
C) Propagación "in vitro"	13
1) Preparación del explante.	14
a) Selección	14
b) Asepsia y Esterilización	15

	<u>Página.-</u>
2) El medio de Cultivo.	16
3) Vias de Multiplicación "in vitro"	19
D) Propagación del Aguacate.	22
E) Cultivo "in vitro" del Aguacatero	23
Metodología.	26
Resultados	43
Discusión	71
Conclusiones	81
Bibliografía	85

INDICE DE TABLAS.-Página.-

Tabla No. 1.- Composición del Medio Básico de Cultivo (MB)	31
Tabla No. 2.- Variación de la Concentración de Componentes Nutricionales;- Inorgánicos y de Sacarosa en el Medio Básico con Agar.	39
Tabla No. 3.- Cuantificación de Brotes Etiolados obtenidos en Recintos Oscuros.	44
Tabla No. 4.- Porcentaje Acumulado de Contaminación Durante el Cultivo de Explantes de Aguacate.	45
Tabla No. 5.- Espectro Amplio de Combinaciones de Concentraciones Hormonales (AIB y 6BA).	48
Tabla No. 6.- Morfogénesis a Intervalos Restringidos de Combinaciones Hormonales (AIB y 6BA)	51

INDICE DE FIGURAS.-

	<u>Página.-</u>
Figura 1.- Rutas de Propagación por medio del Cultivo "in Vitro". Adaptado de: Abbot A. (1978).	20
Figura 2.- Obtención de Brotes Etiolados.	27
Figura 3.- Acercamiento a Plántulas de -- Aguacate Fuerte después de 45-días en Etiolación.	28
Figura 4.- Brotes Cosechados Después de - 45 días en Etiolación.	29
Figura 5.- Explantes Etiolados Listos para su Siembra.	31
Figura 6.- Diferentes Tipos de Frascos Ensayados para el Cultivo "in Vitro.	36
Figura 7.- Desarrollo de Brotes en Sustratos que Pueden Permitir la Aerea <u>ci</u> ón Basal.	41
Figura 8.- Desarrollo de Brotes en una Primera Etapa de Exposición a Combinaciones Hormonales.	49
Figura 9.- Desarrollo Basal en la Primera Et <u>a</u> pa de Exposición a Combinaciones - Hormonales (AIB y 6 BA)	50

	<u>Página.-</u>
Figura 10.- Estadíos de Desarrollo de Brotes	54
Figura 11.- Secuencia de Desarrollo de -- Brote.	55
Figura 12.- Brotes de la Segunda Fase de Exposición a Combinaciones Hormonales.	56
Figura 13.- Rompimiento de Dominancia Apical	57
Figura 14.- Brotes de la Segunda Etapa de Exposición a Combinaciones Hormonales (AIB y 6BA).	60
Figura 15.- Subcultivo de Yemas Terminales.	61
Figura 16.- Explante Apical Desarrollado	62
Figura 17.- Desarrollo del Brote en Medios con y sin Carbón Activado (0.75% p/v).	63
Figura 18.- Crecimientos Basales en Medios que Permiten la Aereación Basal.	68
Figura 19.- Explantes Enraizados Después de 45 Días en Cultivo.	69

RESUMEN. -

En el presente trabajo se intenta contribuir el establecimiento de las condiciones adecuadas para el cultivo "in vitro" del aguacate (Persea americana Mill) con fines de propagación vegetativa, dada la posibilidad de mejorar el cultivo utilizando portainjertos clonados.

Se utilizaron como fuente de explantes brotes etiolados de plantas jóvenes de la variedad Fuerte, consistentes en porciones de tallo con yema dormida. Se establecieron condiciones para la esterilización de dichos brotes, y el medio básico para su cultivo, éste último, de acuerdo a las sugerencias de DeFossard³², y a algunas consideraciones de nutrición específica para el aguacate.

La inspección de respuestas del tejido a diferentes combinaciones de concentración de Acido Indol-3-Butírico (AIB) y 6-Bencil Adenina (6BA) en el medio básico diseñado ha permitido distinguir intervalos de concentración para inducir el desarrollo de yema, la formación de callo y el desarrollo de tejido basal. Se han caracterizado los explantes que mejor responden a las condiciones de cultivo, así como algunas condiciones (luz, temperatura) que lo favorecen.

Resultados aislados prevén la posibilidad de multiplicar el material vegetativo "in vitro" mediante la inducción de brotes axilares en las yemas que responden a la brotación.

Resultados preliminares muestran que a combinaciones hormonales altas en auxina que aún promovieron el desarrollo del brote, combinando con cambios (descritos a continuación) en el medio básico, se permitió la obtención "in vitro" de --

brotos con raíces. Los cambios en el medio básico referido consistieron en la adición de carbón activado, la disminución de la concentración básica de macronutrientes y aumento en el contenido de sacarosa, así como favoreciendo características físicas determinadas, como es la utilización de sus tratos que permitieran la aereación de la zona basal del ex- plante cultivado "in vitro". Estas consideraciones, enfocadas precisamente para lograr el desarrollo radicular, han permitido obtener, aunque aún con un porcentaje bajo (12.5%), raíces de 1 a 3 cm de longitud en brotes cultivados "in vitro" después de 45 días, lo cual abre la posibilidad de producir vegetativamente "in vitro" patrones clonales de aguacatero con características ventajosas para su cultivo.

INTRODUCCION.-

A.- EL AGUACATE.-

El fruto del aguacate se consume en la mayoría de los casos, fresco, costumbre alimenticia que hace altamente aprovechable todos los principios nutritivos del aguacate.⁴⁰

La industria alimenticia usa su aceite para preparar alimentos concentrados, mientras la de los cosméticos prepara lociones y jabones para el tratamiento de cuero cabelludo pelo y piel. En medicina popular por su contenido de vitamina E es considerado como afrodisíaco; y también funciona como antidisentérico y restablecedor del equilibrio de las funciones intestinales. Infusiones calientes de sus hojas y ramas florales se suministran como expectorantes.⁴⁰

El aguacate es un fruto que posee valores nutritivos elevados⁴⁹, pudiéndose comparar con los del plátano, y -- con un valor energético que resulta mayor, por unidad de peso, al de la carne¹⁹. Representa una importante y sana -- fuente de alimentación humana, ya que su contenido en proteínas y minerales es 3 veces mayor que el de otras frutas comunes (manzana, uva), y el de aceites es muy superior que la mayor parte de las frutas frescas (hasta un 25-30%), además de ser una buena fuente de vitaminas (A, B, C, D, E.)¹²⁸

1) Origen y Dispersión.-

El género Persea consta de unas 50 especies, gran número de las cuales, como el aguacate, son nativas de México, y de la América Central, con exclusión de las Antillas, don-

de fué introducida posteriormente.²⁹ El fruto fué conocido por los españoles, durante la época de la Conquista como uno de los preferidos por las poblaciones indígenas de México, Guatemala, Honduras, Nicaragua, Venezuela, Colombia, y Ecuador según los cronistas de la época.⁴⁰ Su lugar nativo no se ha podido determinar con certeza, ya que este árbol ha sido cultivado por mucho tiempo, y pocos esfuerzos se han hecho para localizar su verdadera región de origen.
92

Su zona de dispersión es una de las más amplias en toda la América; 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 variadas condiciones climatológicas²⁴.

Desde el punto de vista ecológico se ha agrupado al aguacate en 3 grupos en razón a las condiciones del medio en que se ubican.¹⁹ Así, tenemos al grupo ecológico mexicano, que prolifera en el Altiplano de México, cuyos especímenes tienden a tener un olor a anís en las hojas, el fruto suele madurar de 6 a 8 meses después de la floración, y tiene una piel fina y lisa. En el sur de México se ha observado la planta que parece ser el prototipo silvestre de esta raza. Es ésta una raza de zonas altas y los árboles tienen más resistencia al frío que los de las demás razas.- sus híbridos con otras razas, que han adquirido algunos de los caracteres sobresalientes de éstas últimas en cuanto al fruto, son apreciados comercialmente en todo el mundo.

Los árboles del grupo ecológico guatemalteco tienden a producir frutos más grandes, que necesitan más tiempo para desarrollarse totalmente a partir de la floración y que-

tienen la piel más gruesa, más dura y más rugosa que los de la raza mexicana. Los árboles silvestres de este grupo -- presentan frutos pequeños, mientras que el mayor tamaño de los frutos en los árboles seleccionados para la propagación parece indicar que ha existido la tendencia por los campesinos de las tierras altas de Guatemala a buscar éste último, lo cual no parece ser importante para México, donde la selección se había estado haciendo en base a otras caracteres (contenido de pulpa, aceite, etc.). Los árboles que pertenecen al grupo guatemalteco son menos resistentes al frío que los de la raza mexicana; las variedades cultivadas de esta raza no tienen olor a anís en las hojas.

Los árboles de algunas variedades del grupo ecológico de las Indias Occidentales o antillano, producen frutos pequeños, mientras que los de otras son muy grandes. La piel del fruto tiende a ser un poco más delgada y lisa que en la raza guatemalteca; la diferencia más notable es la -- que se refiere al período transcurrido entre la floración y la maduración del fruto. Los árboles son en extremo sensibles a las bajas temperaturas invernales, y por el contrario, parecen resistir condiciones adversas del suelo⁶⁹ y son de zona climática tropical, a diferencia de los dos grupos anteriores, que son subtropicales.⁹⁰

2) Variedades.-

Innumerables son las variedades (muchas de ellas correspondiendo a híbridos) que se conocen, sumando más de -- 800 las distribuidas de modo distinto en las áreas de cultivo del aguacate, pero pocas han encontrado el favor de los fruticultores y de los mercados. Algunas de estas variedades se mencionan a continuación, según el grupo ecológico - al que pertenecen ^{2,24,90}:

MEXICANO ^(M)	GUATEMALTECO ^(G)	ANTILLANO ^(A)	G x A	G x M
Atlixco*	Anaheim *	Baker *	*Collinad	Dorothea *
Bacon **	Benik*	Baldwin *	Collinson	Ethinger *
Benedict	Collins *	Gvar-Am	+*Choquete	Fuerte **
Duke *	Hass **	Butler *	+*Booth 7	Lula **
Sinaloa	Itzamná **	Hall *	+*Booyh 8	Monterrico
Topa-topa	MacArthur *	Pollok *		
Puebla *	Nabal *	Thompson		
Zutano **	Rincón **	Trapp *		
	Taylor	Waldin **		

* Principales y más importantes variedades ^{24,25,90,18}

+ Variedades que se cultivan en México ²⁹

La elección de variedades para la plantación de una huerta es de gran importancia económica. Comercialmente -- los aguacates más finos y de mayor aceptación son los que -- pertenecen al grupo ecológico mexicano; en segundo lugar se encuentran los del grupo ecológico guatemalteco, y por último, los del grupo ecológico antillano. Debe considerarse -- también dentro de esta clasificación a híbridos tales como -- el Fuerte (G x M) cuya elevada producción y alta comerciabilidad puede adjudicarse a que sus características degustativas y de contenido de aceites corresponden al grupo mexicano aparte de tener un alto índice de la relación pulpa-hueso.

3) Producción.-

México es el productor líder de aguacates ^{39,81} aunque la mayor parte de su producción, proveniente de tipos -- criollos en su mayoría, es consumida internamente; también -- hay grandes zonas de producción comercial en: Estados Unidos (California, Florida, Hawaii y partes bajas de Río Grande en Texas) donde se consume en forma interna gran parte de la pro

ducción; en Israel, especialmente en las áreas costeras; en Sudafrica y en Chile, principalmente en las partes bajas -- del Valle del Aconcagua⁹. Sin embargo, en términos monetarios, la producción de Estados Unidos se encuentra en primer término⁹, quizá debido a que manejan sólo variedades de calidad e importancia comercial, que se cotizan a precios más altos en el mercado.

Actualmente sólo Israel y Sudáfrica tienen importantes mercados de exportación que se encuentran en Europa Occidental, especialmente Francia y Gran Bretaña⁹. Para poder competir con ellos, habría que optimizar la producción, además de encontrar técnicas adecuadas de conservación del fruto que permitan el transporte hacia los centros de demanda lejanos.

Empresas incipientes de producción comercial del -- aguacate han sido establecidas en: Australia y Nueva Zelanda; en Argentina, Brasil, Venezuela, Colombia, Perú, Guatemala, El Salvador, y la gran mayoría de los otros países de América Central y del Sur; en Cuba, Jamaica, Puerto Rico, -- St. Croix, Martinica y varias otras islas del Caribe; en -- Ghana, Camerún, Mozambique, Madagascar, Kenya y otras naciones tropicales de Africa; en las Islas Canarias y Madeiras; en Marruecos, Sicilia, Grecia, Turquía y otros países del -- Mediterráneo; y en India, Malasia, Indonesia, Filipinas y -- otras partes de Asia y Oceanía Tropical³.

Como se indicó antes, en México la oferta nacional -- del aguacate está integrada en su mayor parte por tipos criollos, aunque en los últimos años, la introducción de nuevas plantaciones en las que se han empleado variedades mejoradas (Hass, Fuerte, Bacon, Booth y otras) han arrojado resultados -- positivos en el desarrollo productivo y comercial del aguacate, situación que a la fecha posibilita la integración de vo

lúmenes crecientes con calidad de exportación, ya que estas últimas variedades presentan una mayor posibilidad de conservación y por tanto, de transportar, en relación a los tipos criollos. Estos últimos, debido a las características de su fruto, pueden llegar a tener una gran demanda en el mercado internacional una vez que se les seleccione o desarrolle como variedades y se les conozca; para exportarlas se tendría que investigar las posibilidades de conservarlo¹⁵ en buen estado por un tiempo suficiente para transportarlo y comercializarlo en forma rentable.

Mundialmente, los principales factores que limitan el consumo del aguacate es la falta de familiaridad con el fruto y su alto costo; ésto último es el resultado de una producción baja, la cual está dada por diversos factores⁹ como es la sensibilidad del aguacate a los climas y condiciones extremas (por ejemplo: heladas, granizos y suelos con altos contenidos en sales⁶⁵, etc.), por lo que no se les puede cultivar en cualquier zona; su vulnerabilidad a la pudrición de la raíz¹³⁰ "Tristeza del aguacatero", razón por la cual se han perdido grandes plantaciones⁸¹ y para lo cual no se cuenta con un método de control eficaz¹³¹; el retraso en el desarrollo de cultivares de características más ventajosas que los actuales- a partir del germoplasma disponible, que es tan rico y variado (en su lugar de origen)⁹, por lo que es necesario realizar estudios a fondo, para resolver las limitantes del cultivo, con el propósito final de aumentar la producción ya que la demanda de aguacate cada vez seguirá creciendo considerablemente una vez que se logre una mayor apreciación del sabor tan especial que este fruto guarda, y se difunda el conocimiento sobre sus propiedades nutritivas⁷⁹.

En México se ha intentado aumentar la producción, pero cultivando nuevas tierras,^{28,29,39,100} y no mediante una optimización del cultivo en las zonas ya abiertas para éste. Esto se debe principalmente a que el fruticultor ha encontra

do serios problemas en el manejo de su huerto, optando por abandonar total o parcialmente, y buscando nuevas tierras sin lograr una solución adecuada. Por lo tanto se debe -- buscar la optimización de su cultivo, con el menor sacrificio de nuevas tierras, explotando variedades altamente apreciadas comercialmente -tanto en el plano nacional como internacional- y aprovechando selecciones del valioso germoplasma nacional, adaptado adecuadamente a las condiciones del territorio. Además hay que favorecer el cultivo intensivo, utilizando ejemplares ventajosos que puedan usarse como patrones para que combinados con las variedades adecuadas, se cultiven árboles compuestos (variedad-portainjertos) que permitan obtener un huerto uniforme, en el que se logren superar los problemas tan graves y difundidos en el país, como es el de la pudrición de la raíz que es causa de grandes pérdidas y baja producción en áreas cultivadas del país⁸¹ o como es la presencia de suelos salinos en las zonas bajas, con lo cual se pierden árboles que no logran prosperar en esas condiciones, etc. Una vez lograda la optimización de su cultivo el país alcanzaría una mayor competitividad productiva y comercial, y es cuando se puede pensar en aumentar la extensión del cultivo como una segunda posibilidad para incrementar la producción, para poder cumplir con la gran demanda nacional así como internacional.

4.- Clasificación y Descripción Botánica.-

a) Clasificación.-

La clasificación botánica que corresponde al aguacate es la siguiente: ¹⁹

División: Espermatophita.
Subdivisión: Angiosperma
Clase: Dicotyledonea
Orden: Laurales.
Familia: Lauraceae.
Género: Persea.

Pertenece a la misma familia el laurel del Mediterráneo, Laurus nobilis L.; el laurel de California, Umbellularia californica Nutt., el sassafrás americano, Sassafras varifolium Kuntze; el alcanforero Cinnamomum camphora L. Ness y Eberm; el árbol de la canela, Cinnamomum zeylanicum Bl. - guardando todos estos cierta importancia comercial en diferentes partes del mundo.²⁵

Prevalecen en la actualidad las teorías que dividen en 2 especies el aguacatero cultivado^{9,40,92}.

- P. americana Mill.- (P. gratissima Gaertn.).- Perteneciendo a ella todas las variedades de la raza o grupos ecológicos guatemaltecos y antillano, es decir, el aguacate común más diseminado en el trópico bajo americano.

- P. drymifolia Charm y Schecht.- (P. americana, var. drymifolia, Mez.). Aquí se incluyen los pequeños aguacates pertenecientes a las tierras altas mexicanas que ahora se cultivan en muchos otros sitios. Al frotar sus hojas emanan un olor a anís que no se presenta en P. americana Mill.

La clasificación anterior resulta controvertida y todavía no definida, aunque no han faltado genetistas y taxónomos que, con base en evaluaciones genéticas y ecológicas-

consideran la segunda (drymifolia) una ecoespecie, o aún un ecotipo o variedad de la misma especie americana Mill.^{9,40}

Otras especies del género Persea, que en su conjunto se conocen con el nombre de "aguacatillo" son P. cinerascens Blake, P. chamissonis Mez., P. liebmanni Mez., y P. Schiedeana Ness; las últimas tres han sido probadas como posibles patrones en el injerto del aguacatero intentando lograr plantas con resistencia a algunas enfermedades de las raíces, pero sin resultados prácticos hasta el momento¹⁸

b) Descripción -

El aguacate es una planta leñosa de porte generalmente elevado, perenne, de 6 a 20 metros de altura, con corteza áspera y a veces surcada longitudinalmente, corona de ovoide-globosa a piramidal (dependiendo de la variedad y grupo ecológico) y densamente foliada.⁹⁰

El aparato radical constituido por una raíz columnar primaria, que se desarrolla a profundidades que muchas veces superan los 4 metros, notablemente ramificada en haces secundarios y terciarios horizontales, que en su conjunto resultan profundamente introducidos en el suelo. No forman pelos radiculares visibles, y la absorción la realizan a través de los tejidos de muchas ramificaciones secundarias.^{40,82}

Las hojas son alternas, se aglomeran en las puntas de las ramas, son pecioladas, simples, oval-oblongas o elípticas, de base acunada u obtusa, coriáceas, penninervias, de haz verde oscuro y con brillo escaso en la madurez, el envés es opaco.⁴⁰

La flor es perfecta y se encuentran reunidas en racimos axilares. Presenta 12 estambres, el ovario es simple con un solo capelo y un solo óvulo, el cáliz y la corola -- son del mismo color y sólomente se distinguen por su posición. Aunque organográficamente son hermafroditas, la autofecundación resulta obstaculizada, ya que los órganos reproductores no llegan a madurar contemporáneamente (dicogamia), por lo que la planta se conduce como si fuera dioica, y normalmente la reproducción se asegura por fecundación -- cruzada. ^{2, 24, 72.}

El fruto es una drupa carnosa, piriforme, ovalada, -- redonda o elíptica, consituido por una sola semilla cubierta de una pulpa gruesa de consistencia suave cuando madura, coloreada en amarillo claro al interior y verduzco hacia el exterior. El fruto de las variedades cultivadas es variable en tamaño, peso, forma, color, contenido de grasas (des de 3 hasta un máximo de 30% para la raza antillana y la mexicana, respectivamente) ^{2, 128}

La semilla formada por 2 cotiledones en cuyo interior se localiza el embrión, se encuentra revestida por una cubierta formada por 2 capas, algunas veces fuertemente adherida a los cotiledones u otras veces suelta, ⁴⁰

B.- EL ARBOL FRUTAL.

La experiencia en fruticultura indica que el árbol frutal óptimo es aquel que tiene la máxima adaptabilidad al sitio de cultivo, ocupa el mínimo espacio y tiene el máximo rendimiento y calidad frutal. Para el logro de este objetivo muchas veces es necesario manejar árboles compuestos de -- un portainjerto (patrón a pie) y la variedad injertada, contribuyendo el primero fundamentalmente al anclaje del árbol.

y por tanto a la adaptabilidad al sitio de cultivo (resistencia a suelos salinos, enfermedades de la raíz, etc.), aunque también puede contribuir induciendo enanización (como se ha logrado en el manzano); mientras que la variedad, que constituye la parte aérea del árbol, es la principal responsable de la calidad del fruto.^{22,30,59,74}

1) Propagación del Arbol Frutal.-

Gran parte de las principales especies frutales son autoestériles, y por la imposibilidad de autofecundarse requieren de una polinización cruzada, de manera que la progenie proveniente de semillas se constituye en una población de individuos heterogénea en la que se mezclan caracteres asociados a cada progenitor.^{30,74}

Al propagar una especie frutal en forma vegetativa, se tiene las ventajas de mantener las mismas características morfológicas y fisiológicas de la planta madre, observando además el mismo comportamiento en las mismas condiciones climáticas, ambientales, edáficas y de prácticas de cultivo, lo cual permite adoptar en un ambiente adecuado una técnica de cultivo uniforme.^{22,47,55}

Por esto, la propagación vegetativa es la única vía factible de multiplicación de los árboles frutales haciendo que estos conserven su identidad como variedad vegetativa o clon, el cual se define⁵⁵ como el material genéticamente uniforme derivado de un solo individuo, y que se propaga exclusivamente por medios vegetativos: enraizamiento de estacas, acodado, injertación, etc.

Resulta evidente pues, que las variedades que representan el papel más importante en la calidad del fruto del -

árbol compuesto, deberán propagarse vegetativamente, generalmente por injerto, asegurando así, lograr en cada árbol aproximadamente la misma forma y tamaño del fruto, así como su buen aspecto, color, aroma y cualidades organolépticas.

Desde el punto de vista práctico, existen diferentes tipos de árbol frutal. Así tenemos aquel de "pie franco" - que se obtiene a partir de semilla, y aquél que es clonal obtenido por enraizamiento de estacas o acodado, de los cuales directamente se espera la obtención de fruto. También tenemos el árbol injertado cuyo patrón puede provenir de semilla o ser de tipo clonal; en el primer caso se deben obtener primero el portainjertos, que por provenir de semilla se denominan "patrones francos", y los individuos así obtenidos están provistos de un sistema radicular penetrante y de gran expansión en todos los sentidos, las variedades en él injertadas dan lugar a un árbol vigoroso y de notable volúmen, aunque este sistema no elimina completamente el problema de la heterogeneidad genética ^{22,47,99} a que dá lugar las semillas que generan los patrones.

Son los francos los patrones universalmente empleados en mayor cantidad y constituyen por lo tanto, la norma de -- producción de portainjertos; sus principales ventajas ^{22,55} radican en el hecho de la facilidad de su obtención y en su consecuente reducido costo; su mayor inconveniente radica en que por provenir de poblaciones de semilla heterocigótica se imposibilita lograr mediante ellos reproducibilidad en su resistencia a factores desfavorables, inducción de enanización y precocidad en la variedad, y todo esto debido a la heterogeneidad en el comportamiento que estos patrones determinan sobre los árboles compuestos, al ser cada patrón un individuo de constitución genética distinta ⁹⁹.

Los patrones también pueden reproducirse vegetativamente, por ejemplo por medio de acodado o enraizamiento de estacas, asegurando así la regularidad de las características de los árboles en el huerto, haciendo su explotación -- más rentable^{22,47}, sin embargo, la dificultad de enraizamiento de algunos frutales hace la producción de sus respectivos patrones muy difícil o costosa.

C.- PROPAGACION "IN VITRO".-

→ Existe una forma alternativa para clonar plantas difíciles de propagar vegetativamente y esto es por medio del cultivo "in vitro". Esta forma de propagar las especies vegetales incluye tanto métodos vegetativos como sexuales³² y consiste en el cultivo en condiciones asépticas, de embriones, semillas, tejidos, órganos, células, protoplastos, en un medio artificial complementado con nutrientes hasta lograr el desarrollo y producción de las plantas íntegras.-←
21,124

→ La multiplicación clonal "in vitro" presenta otras ventajas como es la aceleración del proceso de propagación en aquellas especies en que éste es lento, y por lo tanto, - incosteable, o cuando los fitomejoradores requieren un genotipo selecto reproducido masivamente a corto plazo← o cuando se requiere un estricto control fitosanitario del material propagado^{60,115,85}, o para aumentar en forma considerable la tasa de multiplicación de especies que son propagadas convencionalmente por otras técnicas.^{16,85} → Otra ventaja, recientemente puesta en práctica,¹⁶ es la comercialización de plantas multiplicadas "in vitro" en forma sencilla, evitando ciertos problemas de cuarentenas y el transporte a bajo costo por grandes distancias, inclusive entre distintos países.←

La aplicación de la técnica de cultivo "in vitro" re-
presenta una actividad altamente rentable a largo plazo^{34,3,}
¹²⁰ consiguiéndose la propagación masiva, en espacios reduci-
dos, condiciones controlables y durante todo el año, sin --
faltar la calidad y fitosanidad del material multiplicado.-
Actualmente un gran número de plantas⁸⁵, principalmente her-
báceas^{32,3} algunas especies leñosas^{1,77,91} entre los que en--
contramos forestales^{37,91,119,127} y pocas frutales^{17,133} -
están siendo propagadas mediante este sistema.

1) Preparación del Explante.-

a) Selección.-

Para el cultivo "in vitro" es necesario tomar en
cuenta diferentes aspectos^{32,58,68}. Uno de ellos es la se-
lección del explante a usar; muchas veces el origen de éste
es más importante que la técnica usada⁹³. Casi cualquier-
órgano o tejido puede servir como fuente de explante¹²¹, --
sin embargo, el éxito puede ser variable, y en el desarro--
llo de una metodología de uso comercial, la selección del -
explante debe realizarse en forma sistemática, aunque exis-
ten algunos tipos preferidos, ya sea por sus característi--
cas, su respuesta, su facilidad de obtención, etc.¹.

Para definir acerca del explante más adecuado se de-
ben considerar^{32,85} :

a) El órgano que servirá como fuente de tejido; -
la selección generalmente se hace debido a que el tejido cre-
ce fácilmente o que se tiene un interés de investigación es-
pecial de ese tejido.

b) El tamaño de éste, ya que la frecuencia de su-

pervivencia "in vitro" del explante, así como en tasa de desarrollo y morfogénesis ha sido relacionada directamente con su tamaño inicial.

c) La estación en la cual es obtenido el explante; esta puede influir también en sus características regenerativas, particularmente en variedades de plantas adaptadas a clima templado.

d) La edad fisiológica u ontogenética del órgano, ya que las variaciones en las características regenerativas pueden ser, a veces, atribuibles a diferencias en su edad fisiológica y al grado de diferenciación de las células.

e) Calidad general de la planta de la cual los explantes se obtendrán, ya que el comportamiento inicial de un tejido cultivado puede variar también con el estado fisiológico global de la planta original.

B).- Asepsia y Esterilización del Explante.-

Otro aspecto a considerar es la esterilización del explante^{32,121} En principio, toda planta que crece en forma natural debe considerarse como contaminada por microorganismos. Naturalmente la microflora se restringe principalmente a la epidermis de la planta (interfase entre la planta y el medio) es decir, los tejidos internos están esencialmente libres de organismos. Así, en forma general, el problema técnico de obtener explantes sanos se reduce a:³²

a) Eliminación del tejido externo, de manera que se renuevan los microorganismos asociados, y/o

b) Desinfección (esterilización superficial) de -

la porción de la planta que será sembrada. La elección de estos dos métodos depende de los tejidos que se requieren. - Una tercera elección involucra el mantenimiento del material de donde se tomarán los explantes, bajo condiciones asépticas.

El problema de la contaminación superficial es grave; es esencial eliminar todos los microorganismos contaminantes dado que un medio que soporte el tejido vegetal, también será el adecuado para el desarrollo de hongos y bacterias^{32,--121} por ésto, cultivos contaminados resultan de la siembra de materiales no asépticos, lo cual es indeseable porque³², el contaminante generalmente "sobrecrece" al explante, destruyéndolo, y la presencia del contaminante, con sus requerimientos nutricionales y secreción de desechos metabólicos altera el medio en una manera no reproducible, destruyendo mucho de la ventaja de los procedimientos del cultivo de tejidos.

Hay una serie de agentes químicos que se usan comúnmente para esterilizar superficialmente el material vegetal¹²¹, la elección de éste, así como el tipo de tratamiento dependerá de la sensibilidad del material^{32,58,121}.

2) El Medio de Cultivo.-

Los vegetales tienen necesidad de agua como el "medio" necesario en el que se efectúan la mayoría de los procesos moleculares de los seres vivos, y como fuente de hidrógeno en todos los compuestos orgánicos, El oxígeno se requiere para la respiración que provee la energía para que se efectúen los procesos vitales. El dióxido de carbono se necesita para su plir carbono a usarse en la síntesis de los compuestos orgá-

nicos, el cual con el auxilio de la energía solar es incorporado por medio de la fotosíntesis y convertido en simples carbohidratos, los cuales son luego usados para formar carbohidratos más complejos (como sacarosa, por ejemplo), mismos que pueden ser transportados a otras células en la planta y almacenarse o transformarse a compuestos simples (aminoácidos por ejemplo) usados en la síntesis de sustancias más complejas como son: enzimas, grasas, ácidos nucleicos, y otros compuestos orgánicos. Muchas de estas sustancias complejas -- consisten no solamente de carbono, hidrógeno, y oxígeno, sino también de otros elementos, como el nitrógeno, fósforo y azufre; al magnesio se le encuentra en la molécula de clorofila y es necesario para la fotosíntesis; el cobre y fierro se encuentran involucrados en reacciones en la mitocondria - Para cada elemento clasificado como esencial para la planta, existe por lo menos un papel importante en los procesos vitales, y una deficiencia de estos elementos resultan, ya sea en muerte o en lento crecimiento^{26,32}. Por tanto, es usual proporcionar en los medios para cultivo de tejidos, los elementos inorgánicos esenciales.^{32,121}

La sacarosa es una fuente adecuada de carbono^{11,32,62} y si el tejido en cultivo, aunque expuesto a luz, se encuentra desprovisto de clorofila, la sacarosa en el medio sería usada para formar otras moléculas orgánicas por el cultivo; por otra parte, aunque los cultivos estén verdes, la intensidad de la iluminación en la mayoría de las incubadoras no es suficiente para una considerable fotosíntesis^{32,60,61}, y la inclusión de sacarosa en el medio de cultivo compensa esto^{32,60}. Todos los demás compuestos orgánicos incluidos en el medio de cultivo no se encuentran allí como fuente de carbono o energía (como la sacarosa), sino se cree son capaces de llenar ciertas necesidades mediatas, como son el actuar como antioxidantes, vitaminas, reguladores hormonales, etc.³².

En plantas normales intactas, los reguladores del crecimiento actúan coordinando y regulando procesos vitales que llevan a un crecimiento y desarrollo normal de la planta^{4,35}. Aunque el modo de acción de los reguladores del crecimiento vegetal no son bien conocidos, se han logrado determinar algunas de las respuestas de su aplicación^{62,126}. Existen varias clases bien definidas de reguladores del crecimiento vegetal, como son las auxinas, citocininas, giberelinas, abscisinas, y varias vitaminas.¹²⁶

Los reguladores del crecimiento se incluyen en los medios de cultivo de vegetales por varias razones^{114,117}: en cultivos de tejidos, las auxinas y citocininas son incorporadas al medio para inducir la división celular, y así formar callo^{114,121}; la formación de brotes se ve influenciada por la interacción entre giberelinas, auxinas y citocininas, principalmente por estas últimas⁶², esperándose según la relación auxina-citocinina diferentes respuestas morfogénicas de los tejidos en cultivo¹¹⁷.

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^{15,32}.

Existen varios medios bien conocidos^{23,32,48} y numerosas modificaciones de éstos³². Estos medios se han generado de acuerdo al contenido y fisiología de los vegetales^{4,15} como sería el análisis de componentes de sustratos en los que el vegetal se desarrolla adecuadamente, y posteriormente, mediante ensayo de estos componentes de cultivos en solución, y finalmente en cultivos "in vitro", etc.

El como seleccionar un medio de cultivo para una especie en particular es una de las respuestas más difíciles. Una manera de resolver el problema de la selección del medio para una especie u objetivo particular³², es buscar en la literatura los trabajos relacionados a las especies o de objetivos similares y probar los medios presentados en esos reportes. Otra forma³² es probar uno de los varios medios conocidos, incorporando posiblemente algunas variables. Otra, es lo que se conoce como "experimento de amplio espectro"³², en el cual se acomodan los componentes en varias categorías (componente mineral: elementos macronutrientes y micronutrientes; auxinas; citocininas; factores de crecimiento y aminoácidos; fuente de carbono); éstas se varían en tres niveles de concentración (de acuerdo a recopilación hecha de todos los medios usados), con lo que se pretende encontrar, en forma sistemática, un medio adecuado y específico para nuevas especies o problemáticas. De acuerdo al contenido de nutrientes y al balance hormonal en el medio, se logra obtener diferentes tipos de morfogénesis, como es el desarrollo de brotes, la inducción radicular, etc. También tiene influencia sobre esto el efecto de los factores físicos^{60,61,85} como son el fotoperíodo, la intensidad luminosa, la temperatura, la humedad, etc., haciéndose necesario encontrar las condiciones de cultivo más adecuadas que favorezcan el logro del objetivo particular que se esté investigando.

3) Vías de Multiplicación "in vitro"

Existen 2 vías principales a seguir en el cultivo "in vitro" con fines de multiplicación y regeneración de plantas-^{1.60}. Una es indirecta y requiere de la generación de callo formado por células indiferenciadas, y la otra es directa, manteniendo los elementos organizados del explante madre (Figura 1):

El como seleccionar un medio de cultivo para una especie en particular es una de las respuestas más difíciles. Una manera de resolver el problema de la selección del medio para una especie u objetivo particular³², es buscar en la literatura los trabajos relacionados a las especies o de objetivos similares y probar los medios presentados en esos reportes. Otra forma³² es probar uno de los varios medios conocidos, incorporando posiblemente algunas variables. Otra, es lo que se conoce como "experimento de amplio espectro"³², en el cual se acomodan los componentes en varias categorías (componente mineral: elementos macronutrientes y micronutrientes; auxinas; citocininas; factores de crecimiento y aminoácidos; fuente de carbono); éstas se varían en tres niveles de concentración (de acuerdo a recopilación hecha de todos los medios usados), con lo que se pretende encontrar, en forma sistemática, un medio adecuado y específico para nuevas especies o problemáticas. De acuerdo al contenido de nutrientes y al balance hormonal en el medio, se logra obtener diferentes tipos de morfogénesis, como es el desarrollo de brotes, la inducción radicular, etc. También tiene influencia sobre esto el efecto de los factores físicos^{60,61,85} como son el fotoperíodo, la intensidad luminosa, la temperatura, la humedad, etc., haciéndose necesario encontrar las condiciones de cultivo más adecuadas que favorezcan el logro del objetivo particular que se esté investigando.

3) Vías de Multiplicación "in vitro"

→ Existen 2 vías principales a seguir en el cultivo "in vitro" con fines de multiplicación y regeneración de plantas^{1,60}. Una es indirecta y requiere de la generación de callo formado por células indiferenciadas, y la otra es directa, manteniendo los elementos organizados del explante madre (Figura 1):

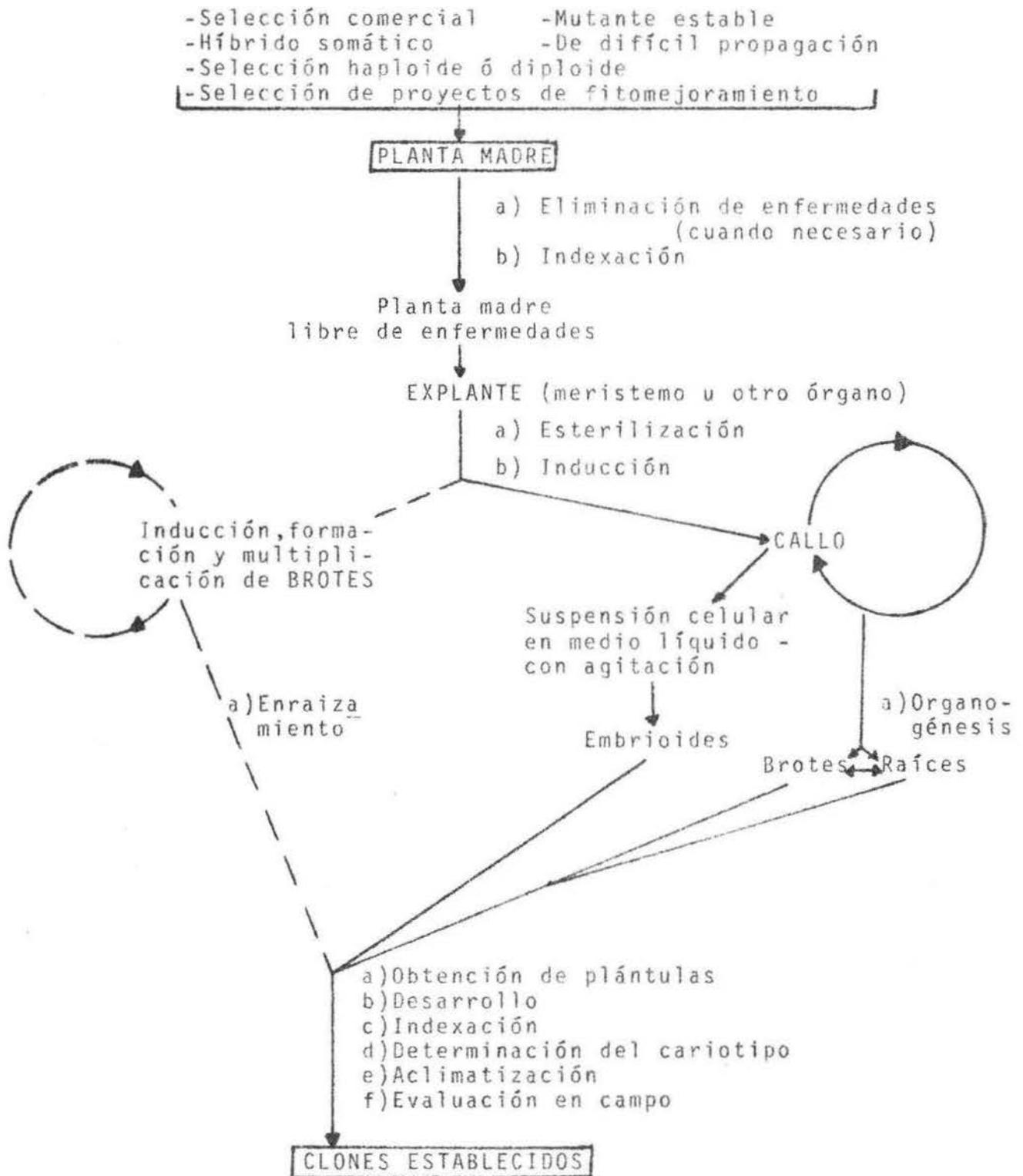


Figura 1. Rutas de propagación por medio del cultivo "in-vitro". Adaptado de: Abbot A.(1978)¹. (— Vía indirecta; --- Vía directa.)

→ El establecimiento de la vía indirecta de multiplicación permite obtener grandes números de propágulos, sin embargo, se presentan algunos inconvenientes^{1,61,121}.

→ ya que los callos tiene una gran actividad mitótica, es posible que después de cultivos sucesivos se desarrollen mutantes, por lo que la progenie debe examinarse rigurosamente para asegurar la uniformidad;

- la producción de raíces y brotes, en este caso, no necesariamente resulta en plantas viables, ya que las conexiones vasculares no siempre se llegan a formar.

- existen algunas especies que no responden a la diferenciación del callo, entre las que encontramos - gran parte de leñosas.

→ En la ruta directa, al manejar tejidos organizados, el riesgo de que células mutantes se lleguen a desarrollar es bastante bajo⁶¹, y también se puede obtener un gran número de plantas - aunque con índices de multiplicación menores que en la otra vía.

→ La propagación vegetativa "in vitro" de especies herbáceas es relativamente fácil, sin embargo, la de árboles y arbustos (angiospermas y gimnospermas) es difícil, ya que la capacidad de las plantas leñosas de regeneración es más baja en comparación con la de las plantas herbáceas^{11,91}. Cuando es posible la propagación de especies leñosas "in vitro", este suministra una herramienta importante para los viveristas y fitomejoradores; facilidad de propagación en comparación con los métodos tradicionales; la propagación rápida de nuevos cultivares; condiciones facilitadas para la producción de

mutaciones para tratar de desarrollar caracteres diferentes; producción de haploides a partir de anteras y doblamiento de número cromosómico; propagación de plantas libres de virus; transporte y exportación de material en condiciones fitosanitarias inmejorables^{86,87,91,98}, etc.

D) PROPAGACION DEL AGUACATE.

La mayor parte de los árboles de aguacate en las regiones de donde se supone este frutal es originario, proceden de semilla³⁵. Todas las razas del aguacate presentan heterocigocidad por lo que no se puede tener la seguridad de que todos los árboles procedentes de semilla produzcan buenas cosechas o frutos de calidad satisfactoria. En términos generales, el aguacate se le cultiva produciendo plantas compuestas, en base a patrones provenientes de semillas, y a los que se injerta la variedad deseada, logrando de esta manera una relativa uniformidad en la producción y calidad del fruto, uniformidad a la que sólo contribuye la variedad injertada; es decir que a pesar de tener una sola variedad injertada, y al provenir los patrones de semilla, el árbol compuesto presenta grandes variaciones en cuanto a vigor, resistencia a enfermedades, respuesta a condiciones del medio-^{6,25,64,82}

Recurriendo a la propagación vegetativa es posible -- asegurar portainjertos genéticamente idénticos² y favorecer el mantenimiento de las características que interesan en la planta formada por el patrón y la variedad (tolerancia a la pudrición de la raíz^{14,132}, a suelos con altos contenidos en sales^{6,70}, etc.), además de obtener la uniformidad de comportamiento vegetativo y productivo deseado en los árboles del huerto, lo cual es de considerable importancia para el éxito del huerto comercial¹²⁹.

La propagación clonal del aguacatero se ha investigado por varios años, principalmente en Estados Unidos e Israel, mediante el enraice de estacas^{8,56,129}, para lo cual se han ensayado factores relacionados con su estado fisiológico^{50,68}, como es la estación del año en que deben ser cosechadas las estacas; el tipo de planta madre y su edad^{50,66}, la consistencia y posición⁷ de las estacas en la planta madre así como su nutrición^{5,96,129}; así como factores externos y tratamientos suplementarios, como el efecto de hormonas vegetales^{54,71,75,94}, tipo de medio de enraice^{7,14}, de la intensidad luminosa y nebulización^{7,76}, de la temperatura⁵⁷ del medio de enraice⁶⁸; de la remoción o no de las hojas en las estacas^{95,96}; de la preetiología de la base de la estaca^{38,43,44,45,51}, así como la combinación de diversos factores, todo lo cual en conjunto ha rendido hasta la fecha sólo resultados parciales y con un rendimiento relativamente bajo.

Los resultados más promisorios se han logrado mediante el enraice de estacas preetiologadas (desarrolladas en ausencia de luz⁴⁴) y/o también pretratadas con soluciones de la salotásica del Acido Indol Butírico -KIBA-⁷¹; no obstante el éxito de estos es parcial y el rendimiento relativamente bajo y aún no se usan estos métodos ampliamente^{63,67}. Por lo tanto, aún falta mucho por investigar en cuanto a este problema, para así poder contar con una técnica comercial económica para lograr propagar vegetativamente al aguacatero

E) CULTIVO "IN VITRO" DEL AGUACATERO.-

Recientemente, se han realizado cultivo "in vitro" de tejidos del aguacate con diferentes fines, como lo es el conocimiento de la ontogenia floral¹⁰⁸, de la fisiología del fruto^{49,102,103,106,111}, de la longevidad de tejidos^{105,110}, y resistencia a condiciones extremas¹⁰⁴, y hasta hace un par de

años se ha intentado con escaso éxito aplicar estas técnicas para la propagación vegetativa de ejemplares ventajosos para el cultivo comercial^{27,99,107,109,112}, como serían árboles o patrones clonales que pudieran inducir enanización^{10,67} en la planta íntegra, o que sean tolerantes a condiciones del suelo⁶⁷ o que resistan enfermedades²⁷, como la tristeza del aguacatero o pudrición de la raíz¹³².

Tomando en cuenta que teóricamente es posible la reconstitución de una planta a partir de casi cualquiera de sus células o de un pequeño grupo de ellas^{13,122}, se han cultivado casi todas las partes de la planta del aguacate, obteniéndose masas de callo "in vitro"^{105,110}, aunque sin lograr la rediferenciación de éstos, y por tanto, la propagación clonal a partir de callos¹⁰⁷.

Ultimamente se ha intentado reproducir plantas de aguacate a partir de tejidos más organizados como es el caso de yemas o meristemas apicales^{109,116,133}, y aún combinando pretratamientos como la etiolación de los brotes^{27,112}; sin embargo, actualmente sólo se ha reportado la metodología para el desarrollo y multiplicación de brotes, sin tener éxito con la micropropagación completa^{27,67,116}, ya que hasta el momento no se ha logrado el enraizamiento de brotes, quedando aún importantes puntos por investigar respecto a este problema, como son:

- a) Afinamiento de la técnica de etiolación.
- b) Selección del explante etiolado apropiado y su esterilización.
- c) Mejoramiento de la composición del medio de cultivo (tanto en lo que corresponde a nutrientes, factores del crecimiento, composición hormonal, etc.)

- d) Tratamientos secuenciales de composición del medio.
- e) Control de condiciones de iluminación y temperatura (incluyendo el uso de carbón activado al medio sólido para evitar la inhibición por luz del desarrollo radicular⁴⁴)
- f) Establecimiento de condiciones que favorezcan el enraice de brotes cultivados "in vitro" (como la aereación de la zona basal del brote cultivado, etc.)

En el presente trabajo se intentó investigar el efecto de algunas de las condiciones antes señaladas sobre la morfogénesis del cultivo "in vitro" del aguacate con fines de propagación de portainjertos clonales. Con este propósito, se montó una técnica de etiolación de plántulas injertadas de aguacate de la variedad Fuerte, de las cuales, al cabo de un lapso se cosecharon brotes etiolados, que fueron expuestos a diferentes condiciones de esterilización para su posterior cultivo "in vitro" en un medio básico diseñado de acuerdo a sugerencias de DeFossard³² donde pasaron por una etapa de adaptación, a la vez que se determinó el explante que mejor respondió a las condiciones del cultivo. Posteriormente, se observó el efecto sobre la morfogénesis de diferentes combinaciones de concentraciones hormonales (AIB y 6 BA), de cambios en la concentración básica de macronutrientes y de sacarosa, de las condiciones físicas del medio (como es la adición de carbón activado y el uso de sustratos que permitan la aereación de la zona basal del explante en cultivo), así como de algunas condiciones ambientales (principalmente intensidad luminosa, e indirectamente temperatura), para posteriormente combinar las que mejor respuesta dieran para la obtención de planta completa "in vitro".

METODOLOGIA. -

Para la realización del proyecto se emplearon como ejemplares plántulas de aguacate (Persea americana Mill.) de la variedad Fuerte injertadas sobre criollo mexicano (de 6 meses a un año de injertadas) dada su disponibilidad y que es recomendable usarlas jóvenes^{50,66}. Estas fueron mantenidas en invernadero, fertilizándoseles cada 15 días con una formulación - - 18:6:6:1 (N, P₂O₅, K₂O, MgO)^{24,73}, con el fin de mantenerlas en desarrollo vegetativo continuo.

Las plantas fueron podadas eliminando la zona terminal con el fin de romper la dominancia apical^{62,126} y promover el desarrollo de brotes axilares. Las heridas fueron selladas con pintura vinílica blanca, para evitar el desarrollo de infecciones y la desecación de los tejidos. Estas plantas fueron etioladas^{43,44,45} (crecimiento en ausencia de luz^{57,55}) en recintos oscuros de 145 x 25 x 95 cm cubiertos con lona vinílica negra (Figura 2, superior), los que se ubicaron en el invernadero, tratando de evitar que padecieran cambios bruscos de condiciones.

Una vez que los brotes axilares etiolados se desarrollaron (Figura 2 inferior y Fig. 3) -alrededor de 45-60 días después- fueron cosechados (Figura 4) y sellados en la parte cortada con pintura vinílica blanca permitiendo el secado de ésta por un tiempo mínimo de 4 horas. Los brotes cosechados se contaron y midieron en longitud y diámetro, así como se les determinó el número potencial de explantes que de ellos se pudieran obtener.

Se lavaron los brotes en agua corriente por 30 minutos, posteriormente con detergente y cepillo, enjuagando por último

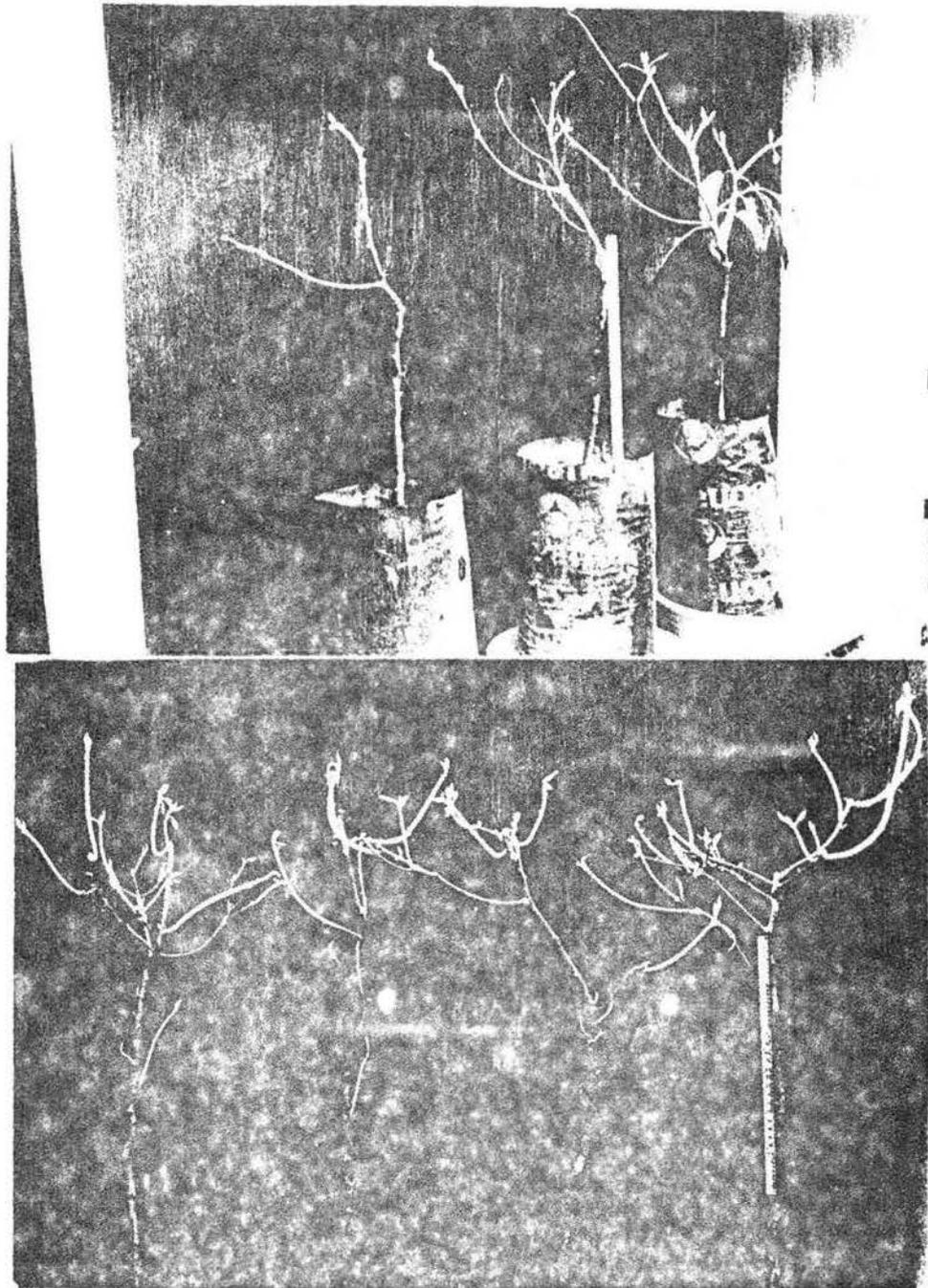


Figura 2.- Obtención de brotes etiolados.-

Superior: Plántulas de aguacate Fuerte dentro de caja de etiolación después de 30 días en oscuridad
Inferior: Después de 45 días. Nótese el grado de defoliación, así como el profuso número de brotes etiolados y la diversidad de su tamaño. (La escala mide 30 cm).

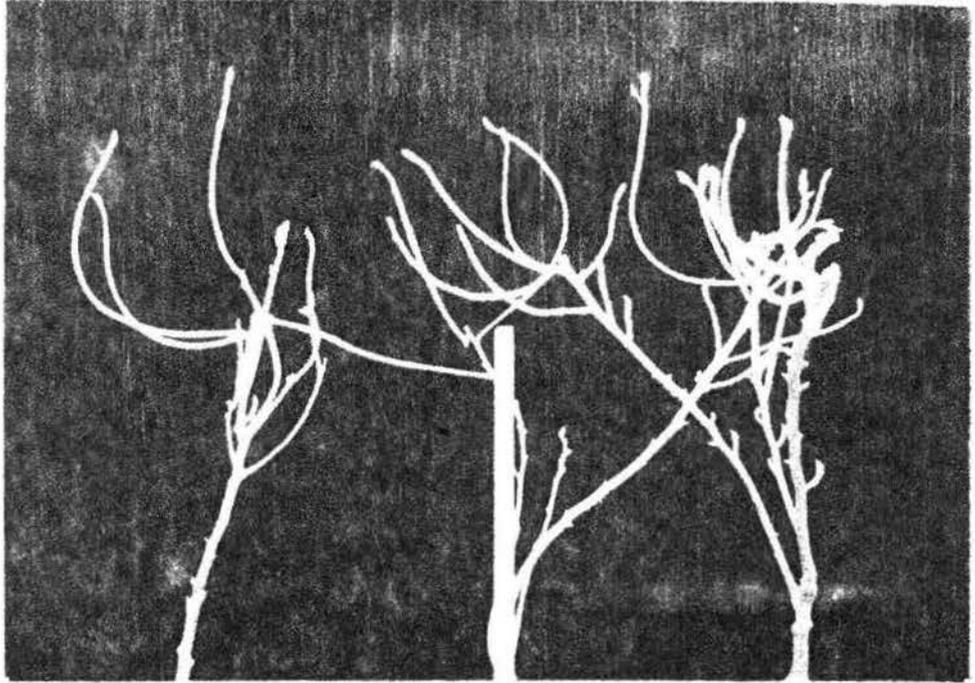


Figura 3.- Acercamiento a plántulas de aguacate
Fuerte después de 45 días de etiolación.

Nótese el color blanquecino de los brotes etiolados
y el incipiente desarrollo foliar en zonas apicales
(La escala mide 30 cm).

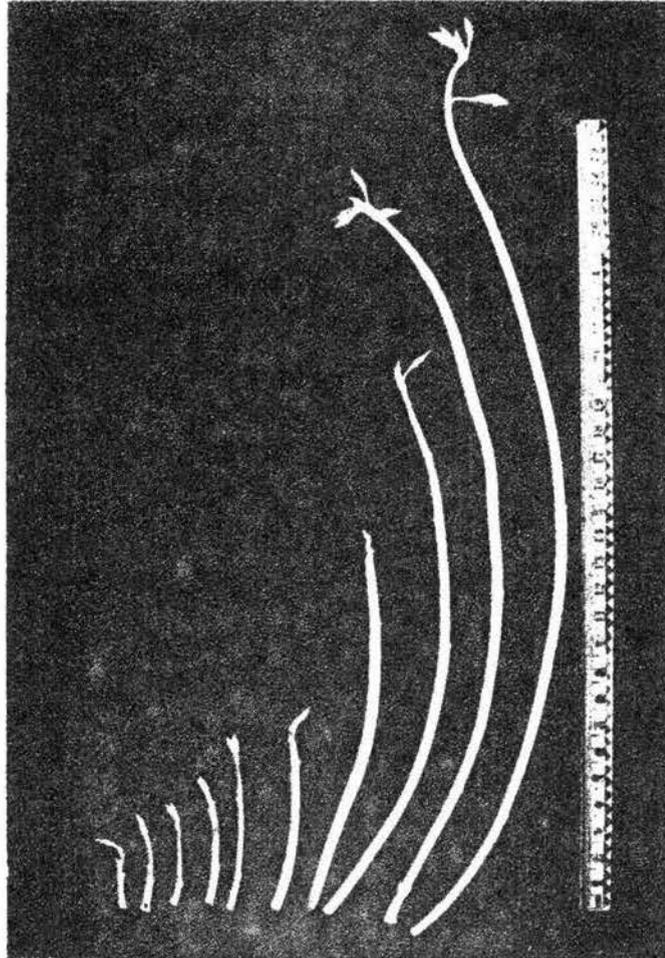


Figura 4.- Brotos cosechados después de 45 días de etiolación.-

Estos fueron sellados con pintura vinílica blanca, lavados en agua corriente y jabón, y posteriormente expuestos a soluciones esterilizantes con distintos porcentajes y tiempos de exposición de cloro activo en combinación con detergente neutro. (La escala mide 30 cm).

con agua destilada; todo esto para eliminar partículas de polvo y del material contaminante embebido en la parte externa de la cutícula.

Se trató de determinar las condiciones óptimas de esterilización de dichos brotes ensayando diferentes concentraciones de hipoclorito de sodio (Cloralex, Productos Químicos - Allen, con 6% de cloro activo) en combinación con detergente neutro (Tritón X-100) durante tiempos de exposición de 2,4,6, 8,10,15,20,25 y 30 minutos, según recopilación de condiciones de esterilización para otras especies^{32,93,133}:

Porcentaje de Cloro Activo (v/v):

0.5, 1.0, 1.5, 1.75, 2.0, 2.5, 3.0.

Porcentaje de Detergente Neutro (p/v):

0.05, 0.10, 0.15, 0.20, 0.25

Después del primer ensayo, y debido a que el hipoclorito de sodio tenía aparentemente un efecto fitotóxico sobre el tejido (se reporta que el tejido foliar es sensible al sodio⁷³) se sustituyó por hipoclorito de calcio (J.T. Baker, 30-35% de Cloro Activo) el cual se siguió usando en los experimentos --- posteriores, pero en las combinaciones de concentración de cloro activo y detergente señaladas.

Una vez que se esterilizaron los brotes, fueron cortados en porciones de tallo con yema (Figura 5), desde 1 hasta 6 cm de longitud, y 0.25 a 0.6 cm de diámetro. En los experimentos preliminares, las yemas apicales se eliminaron debido a que no respondían a las condiciones del cultivo posiblemente por efecto fitotóxico del hipoclorito de sodio; inicialmente se usaron también explantes sin yema, pero posteriormente se evitó su uso, ya que respondían al cultivo sólomente formando tejido calloso en algunos tratamientos.

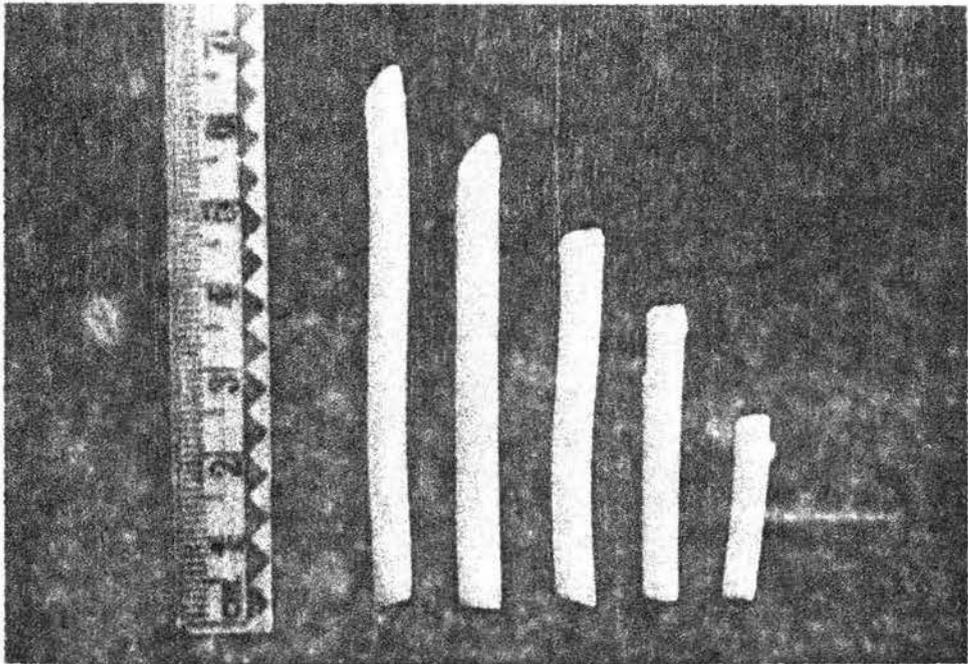


Figura 5.- Explantes etiolados listos para su siembra.

Se prepararon explantes de 1 a 6 cm de longitud, con yema latente en el extremo superior, los cuales se colocaron en posición vertical en el medio de cultivo, sumergiendo un tercio ⁶¹ de su longitud por la zona basal.

Se inspeccionó la concentración de agar (Agar-Agar purificado para microbiología y exento de inhibidores, Merck) - que proporcionaría al medio de cultivo la consistencia mínima que sostuviera el explante⁶¹ y la máxima difusión⁹⁷. Las -- concentraciones de agar probadas fueron:

g/l: 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10.

y la consistencia buscada se logró detectar al ensayar 6 g/l.

El medio de cultivo básico (MB) fué diseñado de acuerdo a las sugerencias de DeFossard³², considerando en especial las referencias a plantas leñosas^{32,33}. El realizó una serie de recopilaciones de los diferentes medios de cultivo utilizados hasta 1976, denotando los intervalos de concentración de los diversos iones y componentes comúnmente agregados, -- arreglándolos en 5 categorías:

- Componente Mineral: Elementos Macronutrientes y Micronutrientes.
- Auxinas.
- Citocininas.
- Factores del Crecimiento y Aminoácidos.
- Fuente de Carbono.

Cada uno en 3 intervalos de concentración (bajo, medio y alto).

Se seleccionaron las concentraciones medias de la mayoría de los elementos macronutrientes, micronutrientes, factores del crecimiento, aminoácidos y fuente de carbón (sacarina), a excepción de los iones sodio y cloro que son tóxicos en altas concentraciones para la planta íntegra³³, por lo que fueron adicionados según el rango bajo: para evitar --

la oxidación que sufre el tejido del aguacate, el ácido ascórbico (antioxidante) fué incorporado según el rango alto; el fierro se adicionó en forma de quelato para asegurar su translocación y disponibilidad en tejidos en desarrollo^{32,121}.

La composición del medio básico (MB) de cultivo se -- aprecia en la Tabla 1:

MACROCOMPONENTES	mM	MICROCOMPONENTES	μ M
NO ₃ ⁻	20.0	Fe ⁺⁺⁺	40.0
NH ₄ ⁺	5.0	BO ₃ ⁼	25.0
N _{total}	25.0	Mn ⁺⁺	40.0
PO ₄ ⁼	0.8	Zn ⁺⁺	5.0
K ⁺	8.0	Cu ⁺⁺	0.1
Ca ⁺⁺	2.0	MoO ₄ ⁼	0.1
Mg ⁺⁺	1.5	Co ⁺⁺	0.5
Cl ⁻	2.0	I ⁻	1.0
SO ₄ ⁼	0.56	FUENTE DE CARBONO	
Na ⁺	0.1	Sacarosa	30.0

VITAMINAS Y NUTRIENTES COMPLEMENTARIOS	μ M	VITAMINAS Y NUTRIENTES COMPLEMENTARIOS.	μ M
Inositol	300.0	Riboflavina	1.0
Acido Nicotínico	10.0	Acido Ascórbico	3.0
Piridoxina - HCl	2.0	Colina - HCl	1.0
Tiamina - HCl	2.0	L - Cisteína	10.0
Biotina	0.1	Glicina	5.0
D-Ca-Pantotenato	1.0	Glutamina	40.0

Tabla 1.- Composición del medio básico de Cultivo (MB)
 Se han separado los componentes en categorías³², -

de acuerdo a los niveles de concentración en la composición del medio y su función nutritiva. El Cl^- y Na^+ , en general son considerados microcomponentes⁴ sin embargo, aquí se les coloca en el primer grupo por fines prácticos de preparación.

Dado que el ácido ascórbico, las vitaminas y nutrientes complementarios pueden llegar a descomponerse por acción de las altas temperaturas, éstos fueron adicionados directamente al medio nutritivo final en forma de soluciones etanólicas al 70% en vez de someterlos al autoclave junto con los demás componentes del medio de cultivo. Para ésto se ensayó el porcentaje de tolerancia al alcohol etílico del tejido en cultivo (ya que puede manifestarse sobre él un efecto fitotóxico⁸⁰), con 12 muestras por tratamiento, según:

Porcentaje de Etanol:

0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 4.5,
5.0, 5.5, 6.0.

La solución conteniendo los demás componentes (macro, micronutrientes inorgánicos, sacarosa y agar) del medio fué esterilizada en autoclave a 120°C y 1.5 kg/cm^2 de presión durante un ciclo de esterilización de 15 minutos²⁰, previo ajuste del pH con KOH 0.1 M, a un valor de 5.8.

Después de incorporar los compuestos termolábiles - - (cuando el medio tenía una temperatura de $40\text{-}50^\circ\text{C}$ aproximadamente), y homogeneizar la mezcla, ésta fué vertida en frascos de diferentes volúmenes (30-200 ml) ocupando un tercio del volumen total⁶¹ del frasco (10-65 ml).

Durante el desarrollo de todos los experimentos fueron ensayados diferentes tipos de frascos. (Figura 6).

- Frascos tipo Gerber, con tapa de papel aluminio y con liga;
- Frascos de 5.5cm de altura y 3.0 cm de diámetro, -- con tapa de baquelita (negra) con rosca;
- Frascos de 10.2 y 4.2 cm de altura y diámetro, respectivamente con tapa de baquelita (negra) con rosca;
- Frascos de 12 cm de altura y 4.4. cm de diámetro -- con tapa plástica (blanca);
- Frascos de policarbonato con tapa del mismo material, transparentes, de 7.5 cm de altura y 5.5 cm de diámetro.

Una vez que el medio gelificara, fueron colocados los explantes en él en posición vertical, sumergidos 0.3-1.5 cm (de acuerdo a la longitud del explante) por su parte basal, - ésto es, aproximadamente un tercio de su longitud⁶¹, para que se logren mantener en esa posición.

Los frascos con los explantes se colocaron en un lugar acondicionado para su cultivo, con fotoperíodo e intensidad luminosa controlados (17/7 horas, 2100 lux, respectivamente), considerando los reportes para otras especies^{32,93,98,115,133}. La fuente luminosa (lámparas fluorescentes, Toshiba, 40W - - Plantlux) se encontraba a 45 cm de los frascos con los explantes, y el fotoperíodo fué regulado con un reloj de control - - (Timer, Reliance, Type 511). Al principio no se pudo contar con un control de la temperatura, sin embargo, posteriormente se logró mantenerla con ayuda de un climatizador, según el ciclo de temperatura 23-26°C durante la noche y 26-30°C durante el día.

Inicialmente los explantes fueron expuestos al medio -



Figura 6.- Diferentes tipos de frascos ensayados para el cultivo "in vitro".

Recipientes de diferentes tamaños y tapas, como se muestra, fueron ocupados para el cultivo de porciones etioladas de tallo con yema dormida extremo. De izq. a derecha: frasco con tapa - - plástica blanca; tapa de baquelita negra; de poli carbonato transparente, de papel aluminio y de baquelita negra. (La escala mide 20 cm.)

de cultivo básico sin hormonas como parte de una etapa de adaptación¹²⁵, con el fin de seleccionar aquellos explantes que no se contaminaban, que estuvieran vigorosos, para que así en las siguientes etapas no se perdiera material por esas causas, y se pudiera tener un número inicial adecuado para cada experimento a realizar.

Una vez lograda la adaptación de los explantes al MB diseñado, se transplantaron a medios con diferentes combinaciones de concentraciones de las hormonas AIB y 6BA (Acido Indol-3-Butírico, Q.P. y N₆ Bencil Adenina, Q.P., respectivamente) para poder catalogar las diferentes respuestas del tejido en base a la relación hormonal a la que era expuesto. Se usaron estas hormonas dado que han sido recomendadas para el enraice y desarrollo del brote en frutales^{55,89} y en algunas ocasiones para aguacate^{54,71}. Los intervalos de concentración según recopilación de aquellos usados para diferentes especies leñosas^{1,32,33,77,89,81,125}, iban desde 0 hasta 100 μ M/l, utilizándose en este caso, 64 combinaciones diferentes, contando con 10 muestras por tratamiento, con 3 repeticiones según:

AIB (μ M): 0, 0.1, 1.0, 5.0, 10.0, 20.0, 50.0, 100.0
6BA (μ M): 0, 0.1, 0.5, 1.0, 5.0, 10.0, 50.0, 100.0

Las hormonas también se añadieron en forma de soluciones etanólicas al 70% considerando la tolerancia determinada con anterioridad.

Se detectaron los tipos de morfogénesis que se presentaron bajo los intervalos de combinaciones hormonales correspondientes. Estos intervalos se consideraron en el planeamiento de un segundo experimento para optimizar las combinaciones hormonales que podrían dar lugar a tipos de morfogénesis específicos, desarrollo de brote, multiplicación de éste y formación de

tejido basal que pudiese dar lugar a la iniciación de raíz; lo cual permitiría lograr el objetivo del proyecto.

También se consideró la adición de carbón activado -- (Sygma, lavado con ácido), para oscurecer el medio, dado que se ha reportado que la luz puede inhibir el desarrollo de la raíz⁴⁴; la respuesta del tejido a este medio de cultivo fué contrastada con la obtenida en medios translúcidos. Previamente se ensayaron diferentes concentraciones de carbón activado para determinar cuál era la que impedía convenientemente el paso de luz al medio, introduciendo un objeto brillante (como espátula de acero inoxidable) en el medio gelificado, observando desde el exterior si se lograba apreciar a diferentes distancias de la pared del recipiente, y cuidando - que esta concentración no resultara muy elevada (menor de 4%) ya que algunos autores^{31,41}, han reportado efectos tóxicos sobre el tejido por altas cencontraciones de carbón activado. Las concentraciones ensayadas fueron:

Porcentaje de Carbón Activado:

0.25, 0.50, 0.75, 1.00

Una vez que se incorporó y homogenizó el carbón activado al medio de cultivo, éste fué vertido en los frascos correspondientes, que se colocaron en recipientes con hielo -- con el fin de que gelifique inmediatamente el medio, para -- que el carbón no se precipite.

En experimentos posteriores se intentó optimizar la -- composición nutricional y características osmóticas del medio de cultivo en relación a la respuesta morfogenética de los tejidos, para lo cual se varió la concentración de sacarosa del medio en combinación con la concentración relativa de macronutrientes en el medio básico (Tabla 2), ya que algunos autores

recomiendan^{53,87,88,133}, que bajo este tipo de modificaciones el enraizamiento se ve facilitado en algunos casos.

Porcentaje de Sacarosa.

		0.5	1.0	2.0	3.0	4.0
Concentración Básica de Ma- cronutrientes	0.5x					
	1.0x					
	2.0x					

Tabla 2.-Variación de las concentraciones de componentes nutricionales: inorgánicos y de sacarosa en el MB con agar. -

Con el fin de investigar el efecto de la concentración de los nutrientes mencionados en la morfogénesis, durante el cultivo, se sometieron porciones de tallo con yema previamente desarrollada "in vitro" (2-3 cm de longitud) a las variaciones presentes en la tabla. (x=veces la concentración de macronutrientes en el MB original; los demás nutrientes se mantuvieron a la misma concentración.

La intensidad luminosa se varió dentro de los intervalos que se pudo (debido a la relación proporcional que guarda con la temperatura) ya que en algunos períodos -como antes se menciona-, no se pudo mantener un control de la temperatura; así las intensidades probadas fueron 1400, 2100, - 2800 lux. Además, fueron colocados explantes en cultivo con y sin yema en condiciones de oscuridad a temperatura constante de 27°C, con el fin de observar si esto pudiera tener influencia sobre la formación de raíces⁸³.

Ya que el aguacate es una planta de difícil enraice^{25, 43,50,56,70,129}, y debido a que el desarrollo y funcionamiento radicular requiere de oxígeno⁸⁵, y que en el medio de cultivo con agar no es lo más satisfactorio para cubrir esta necesidad, se ensayaron diferentes combinaciones de medio de

cultivo gelificado con agar, con y sin carbón activado, en los frascos de 12.0 cm de altura y 4.4 cm de diámetro, con diferentes sustratos de cultivo (Figura 7) que podrían permitir dicha aereación, cuidando que llenaran una tercera parte de la capacidad del recipiente:

- a- Agrolita Tamizada (desde 1.5 a 3 mm de diámetro de partícula), 6 gr/frasco.
- b- Esponja de Poliuretano (discos de 3.5 cm de diámetro, y 2.5 de altura, con orificios para ubicar los explantes).
- c- Arena (aproximadamente de 1.5 mm de diámetro de partícula), 32 gr/frasco.
- d- Tierra (Tierra negra, tierra lama cultivada, tierra de hoja encino, arena de río, agrolita, en partes iguales), 24 gr/frasco.
- e- Agrolita - Arena (2-3 mm x 1.5mm de diámetro, en partes iguales), 6 gr/frasco.
- f- Fibra de Vidrio (tiras enrolladas de 10 x 2.5 cm)

Para determinar la cantidad de medio de cultivo que se les agregaría así como el volumen de espacio libre, se ensayaron volúmenes diferentes de medio de cultivo con agar en cantidades iguales de cada sustrato, y posteriormente se saturó con agua, pudiendo determinar el volumen del espacio libre (supestando de aereación) en el medio compuesto resultante; así, para el tipo a se agregó 6 ml de medio básico gelificado con agar/frasco, lo cual permitía un volumen de espacio libre de 12 ml; para b 8 ml de MB agarizado/frasco y con un volumen de espacio libre de 10 ml; para c, d, e y f 10 ml/frasco y un volumen de espacio libre de 9 ml aproximadamente.

Posteriormente se adicionó el volumen antes descrito de

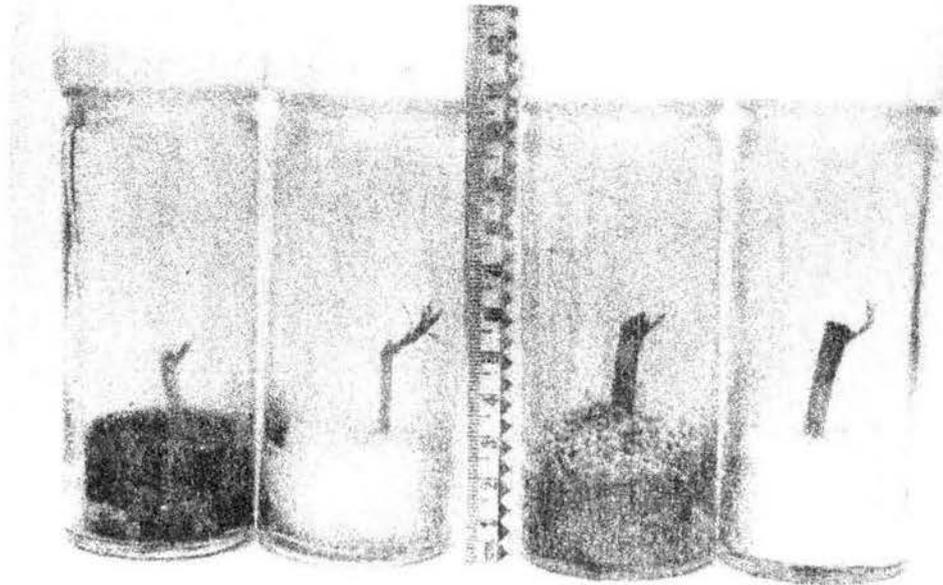


Figura 7.- Desarrollo de brotes en sustratos que pueden permitir la aereación basal.-

A cada tipo de sustrato le fué adicionado medio de cultivo básico gelificado con agar en cantidad suficiente que mantuviera una fase gaseosa de distribución homogénea. De izq. a der.: los dos primeros en espuma de poliuretano, con y sin carbón activado; los segundos en agrolita también con y sin carbón activado, respectivamente, a los 10 días de cultivo.

medio adecuado al sustrato en su frasco, y se homogeneizó con espátula; revolviendo cuando se trataba de agrolita, arena, y tierra y redistribuyendo por presión cuando se trataba de esponja y fibra de vidrio.

Una vez obtenidas las respuestas de los explantes en diferentes combinaciones, tanto de medios nutritivos como de sustratos sólidos, se combinaron las mejores de ellas para -- continuar la observación de la morfogénesis ocurrida a los explantes en cultivo, y tratar de obtener, posteriormente, la planta íntegra en el laboratorio.

RESULTADOS. -

Los resultados respecto a número y calidad de brotes - etiolados y que se presentan a continuación, se obtuvieron de 2 cosechas sucesivas de brotes; una de éstas fué en el verano, después de 6 semanas en oscuridad y la otra (obtenida de las mismas plantas) en el otoño, después de 6 semanas adicionales de etiolación.

En la primera cosecha al cortar los brotes, se dejó su base etiolada (alrededor de 1 cm) en la plántula, y cuando se realizó la segunda cosecha, se obtuvieron varios brotes de esas porciones, por lo que el número total se incrementó notablemente (2.3 veces). La relación de brotes de la primera cosecha se aprecia en la Tabla 3 superior, y la de la segunda en la parte inferior de la misma tabla, en donde se reportan 21.5 y 54.9 explantes promedio/planta, respectivamente.

Después de ensayar en forma preliminar diferentes concentraciones, combinaciones y tiempos de exposición a soluciones de hipoclorito de calcio en combinación con detergente neutro, fué posible delimitar los intervalos en los que el tejido mostraba poca oxidación y contaminación: 1.5 -1.75% (p/v) de cloro activo más 0.15% (p/v) de detergente neutro por 25-30 minutos. Cabe mencionar que el número de muestras por tratamiento en este ensayo preliminar fué un poco reducido, - sin embargo, se puede constatar en la Tabla 4 que el intervalo mencionado efectivamente permite obtener posteriormente un porcentaje apreciable de explantes sin contaminar. Según se puede observar en dicha tabla que muestra un porcentaje de explantes contaminados entre 16 y 25% después de 15 días de cultivo si sólo consideramos los últimos 3 experimentos en los que se afinó la técnica.

DIMENSIONES DE BROTOS (mm)	NUMERO TOTAL DE BROTOS	NUMERO TOTAL DE EXPLANTES	NUMERO PROMEDIO DE EXPLANTES/PLANTA DE CADA DIMENSION DE BROTOS.
50 x 2.0	5	13	1.08
70 x 2.5	8	28	2.33
90 x 2.5	13	61	5.08
130 x 2.5	11	51	4.25
130 x 4.0	8	38	3.17
170 x 3.0	7	36	3.00
200 x 5.0	5	31	2.58
			Total 21.5
10-25 x 1.5-3.0	27	28	3.11
30-45 x 2.0-3.5	15	32	3.56
50-70 x 2.0-3.0	23	84	9.33
75-95 x 2.0-3.0	14	66	7.33
100-120x 2.0-5.0	15	79	8.78
130-145x 2.5-4.5	11	65	7.22
155-190x 2.0-4.5	14	88	9.78
200-250x 2.5-3.5	7	52	5.78
			Total 54.9

Tabla 3.- Cuantificación de brotes etiolados obtenidos en recintos oscuros.-

Superior.- Resultado de la primera cosecha (12 plántulas) después de 45 días -verano- en oscuridad;
 Inferior.- Resultado de la segunda cosecha (9 plántulas) de la misma población- después de 45 días adicionales -otoño- en oscuridad. Nótese que el número de explantes por planta aumentó en la segunda cosecha, esto es - un promedio total de 54.9 explantes/planta en comparación con 21.5 explantes/planta -como promedio- de la -- primera cosecha.

DIAS DE CULTIVO	PORCENTAJE DE CONTAMINACION.			
	Lote 1* 641 expl.	Lote 2 292 expl.	Lote 3 245 expl.	Lote 4** 350 expl.
5	18.55	6.12	7.14	15.81
7	27.30	8.16	9.42	19.71
11	30.68	13.87	11.14	22.12
15	33.82	18.80	16.26	25.32

Tabla 4.- Porcentaje acumulado de contaminación durante el cultivo de explantes de aguacate.-

Porciones de tallo con y sin yema (dormida) fueron lavados con solución de detergente y agua corriente, y posteriormente sometidos, en una atmósfera estéril, a soluciones conteniendo 1.5-1.75% (p/v) de cloro activo y 0.15% (p/v) de detergente neutro (T-X-100) durante 25-30 minutos. Los valores representan el porcentaje acumulado después de los días en cultivo (en MB con agar) señalados en la primera columna.

* Se ocuparon explantes sin etiolar -en pruebas iniciales- esterilizados con hipoclorito de sodio, y los índices de contaminación fueron mayores que en los demás lotes, en los que se ocuparon explantes etiolados (los cuales crecen en condiciones que favorecen en menor grado la contaminación) esterilizados con hipoclorito de calcio.

** Para este lote 4, se hizo una evaluación del porcentaje de explantes que no responden a las condiciones de cultivo (no enverdecimiento, yemas dormidas, etc), el cual era de 20% sobre el total inicial.

En cuanto al porcentaje de tolerancia del tejido en cultivo al alcohol etílico fué posible detectar un aumento proporcional de oxidación del tejido al aumentar la concentración de alcohol, y manifestándose dicha oxidación en menor tiempo también al aumentar dicha concentración; es decir al segundo día en cultivo, el tejido expuesto a 6.0, 5.5 y 5.0% de alcohol, empezaba a oxidarse, y al cuarto día estaba totalmente oxidado; cuando el porcentaje era de 4.5, 4.0 y 3.5 el daño se apreciaba al cuarto día de cultivo, y al sexto día se encontraban totalmente oxidados; al exponer el tejido a 3.0, 2.5 y 2.0% de etanol, se denotaba la oxidación al sexto día y 2 días después terminaba de oxidarse. Con 1.5, 1.0 y 0.5% de alcohol no se lograba un daño aparente en ese lapso, y con el fin de tener un rango de seguridad, se tomó 0.5% de alcohol etílico como el porcentaje de tolerancia del tejido en cultivo, por lo que las soluciones de vitaminas, nutrientes complementarios y hormonas, al ser añadidas al MB de cultivo sumaban en total un volumen no mayor de 0.5% de etanol.

Cabe mencionar que los explantes usados en la primera etapa medían de 1 a 1.5 cm de largo, 0.25 a 0.45 de diámetro, con y sin yema latente, no tomándose ninguna consideración especial sobre la ubicación de la yema en el explante durante el sembrado. ésto es, podía encontrarse tanto en la base, en la mitad, como en la punta de éste.

Pasando a las respuestas morfogénéticas de los explantes en cultivo a los intervalos hormonales usados, en esta primera etapa en la cual la temperatura no podía controlarse y por tanto, la intensidad luminosa no pudo ser mayor de 1400 lux, los resultados obtenidos bajo estas condiciones, después de 30 días de exposición, (Tabla 5) son:

- La inducción y el desarrollo de la yema se presenta en los rangos de 5 a 10 μ M de AIB en combinación -- con 0.1 a 1 μ M de 6 BA (Figura 8);
- El crecimiento de callo y engrosamiento de la base, cuando se utilizaron desde 5 a 100 μ M de AIB en combinación con 0 a 0.5 μ M de 6BA (Figura 9). Sin embargo, se observó una patente inhibición del desarrollo de la yema en aquellas combinaciones en las que la auxina se presentaba a concentraciones mayores de 20 μ M; mientras que cuando la 6BA se encontraba por encima de 1 μ M no se apreciaba el crecimiento de callo basal.
- En los rangos de inducción y desarrollo de la yema, se observó crecimiento simultáneo de la base en un porcentaje considerable.

Los brotes logrados en esta etapa (Figura 8) tenían -- hojas pequeñas y entrenudos cortos, por lo que no se pueden -- considerar de buena calidad.

En una segunda etapa de ensayo de combinaciones hormonales (Tabla 6) se restringió el rango de concentraciones de citocininas, ampliando un poco el de auxinas, pero disminuyendo los intervalos en ambos, tomando en consideración aquellas combinaciones bajo las que el tejido había respondido, y con el fin de determinar intervalos más precisos para cada tipo de morfogénesis; lo anterior se ensayó con 10 muestras por tratamiento en 2 repeticiones.

En esta etapa ya se pudo contar con un control de la temperatura por lo que la intensidad luminosa pudo incremen-

6BA (μ M)	AIB (μ M)								
	0	0.1	1.0	5.0	10.0	20.0	50.0	100.0	
0				/					
0.1				/			/		
0.5				/		/			
1.0				/		/			
5.0				/		/			
10.0				/		/			
50.0				/		/			
100.0				/		/			

Tabla 5.- Espectro amplio de combinaciones de concentraciones hormonales (Acido Indol-3-Butírico y 6-Bencil Adenina).-

Porciones de tallo con y sin yema (dormida) fueron expuestas a este espectro cultivándose en MB con agar. - Las concentraciones se expresan en micromolas por litro. ( : muestra el intervalo de inducción y de desarrollo de la yema, mientras que  , el intervalo de crecimiento de callo y engrosamiento de la base; nótese las zonas en conjunto, en las que a veces se observó crecimiento simultáneo de la base).



Figura 8.- Desarrollo de Brotes en una Primera Etapa de Exposición a Combinaciones Hormonales - (AIB y 6 BA).-

Explantos de 1 - 1.5 cm de longitud desarrollaron brotes con hojas pequeñas e internodos cortos después de 25 días en cultivo. Nótese el incremento de desarrollo foliar de izq. a der. y lo pequeño de los frascos (5.5 cm de altura); en esta etapa la intensidad luminosa fué de 1400 lux, no pudiéndose aumentar dada la falla de un sistema enfriador, y bajo estas condiciones el intervalo de temperatura fué de 20-35°C todo el día.



Figura 9. - Desarrollo de crecimientos basales en la primera etapa de exposición a combinaciones hormonales (AIB y 6 BA). -

El cultivo de los explantes a concentraciones desde 5- a 100 μ M de AIB en combinación con 0.0 a 0.5 μ M de 6BA dió lugar a ensanchamiento de la base y/o callo basal, aunque con una patente inhibición del desarrollo de brotes a partir de la yema cuando la auxina se encontraba a concentraciones mayores de 20 μ M. (Los frascos miden 5.5 cm de altura)

6BA (μ M)	AIB (μ M)												
	0.5	1.0	1.5	2.5	5.0	7.5	10	12.5	15	20	50	100	150
0.10													
0.25													
0.50													
0.75													
1.25													
1.50													
2.50													
5.00													
7.50													
10.00													

Tabla 6.- Morfogénesis a intervalos restringidos de combinaciones hormonales (AIB y 6BA):

Porciones etioladas de tallos fueron expuestas a las 74 - combinaciones (presentadas en el cuadro) en MB con agar. Los valores representan micromoles por litro; el área sombreada muestra el intervalo de inducción y desarrollo de los mejores brotes; en el área cuadrículada también se pudo observar buen desarrollo de brote.

tarse hasta (2800 lux) y es cuando se han logrado los mejores brotes (Figura 10) - se dice que su desarrollo guarda una relación directa con la intensidad luminosa^{36,88}; es decir, mayor tamaño de hoja y entrenudos más largos; sin embargo, los crecimientos basales no se pudieron repetir con la misma frecuencia con que antes se había podido realizar, quizá debido a que la temperatura no se mantenía alta como en la primera etapa (a veces superior a 30°C).

Los intervalos hormonales indicados para la inducción y desarrollo de los mejores brotes (hoja bien formada, entrenudos separados, etc.), y en el menor tiempo se presentan en el área sombreada de la Tabla 6. A concentraciones de AIB mayores a 100 μM ya se empezaba a apreciar un aparente efecto fitotóxico sobre el tejido, esto es, oxidación, falta de respuesta morfogenética y posteriormente muerte.

Cabe mencionar que en la combinación 0.5, 1.0, 1.5 μM de AIB más 5.0, 7.5, 10.0 μM de 6BA también se ha obtenido la inducción y el desarrollo de brotes, y apreciablemente sin ninguna diferencia de crecimiento con los otros intervalos, en los que el AIB se encontraba en mayor proporción que la citocinina o 6BA. Según esto, se pueden seguir ensayando balances hormonales auxina/citocinina mayores a 1 desde un principio (estos principalmente se recomiendan para la inducción radicular^{62,113,117,120}), sin inhibir el desarrollo del brote (cuidando de no sobrepasar los límites definidos), lo que podría favorecer la inducción y el desarrollo de raíces, en forma simultánea al del brote.

En la literatura^{1, 16, 32, 33, 85, 114} se recomienda primero exponer el tejido a balances hormonales menores a 1 (mayor cantidad de citocinina) para favorecer el desarrollo de brote, y posteriormente a balances mayores a 1, cuando se

pretende favorecer el desarrollo radicular, aunque muchas veces se debe pasar por una etapa intermedia¹¹⁴ en la que la concentración endógena de citocinina disminuye, ya que ésta puede inhibir la formación radicular⁶².

Cabe mencionar que el explante que mejor respondió a la inducción y desarrollo de brote fué aquel que midió de -- 3 a 6 cm de longitud, contaba con un diámetro de 0.30 a 0.35 cm, y presentaba la yema latente en el extremo (Figuras 10 y 11): La inducción de ésta se ha logrado en 3 días, con un crecimiento de 2 cm en 10 días, y hasta 7-8 en 25 días; después de este tiempo, el ritmo de crecimiento disminuye hasta casi detenerse. Cabe anotar que cuando el explante mostraba la yema en la parte basal, ésta por necesidad se localizaba en la vecindad del medio de cultivo, y aún en esas condiciones se logró su desarrollo (en la segunda etapa), aunque en forma incipiente, mientras que en la primera etapa de exposición a combinaciones hormonales no se había logrado esto.

En esta segunda fase se lograron distinguir diferentes tipos de desarrollo de brotes, lo cual nos podría permitir posteriormente, previo afinamiento de las técnicas de su manejo, incrementar el potencial de multiplicación de brotes; así tenemos:

- Aquellos que se alargan desde su base y presentan - hojillas con yemas axilares latentes, así como 5 -6 hojas de buen tamaño (4-5 cm) hacia el extremo (Figura 12). La importancia de este brote radica en que se puede eliminar su yema terminal, consiguiendo la inducción de las yemas axilares presentes, ya sea todas (Figura 13 izq.) o de aquellas cerca del extremo superior. (Figura 13 derecha). Con esto -

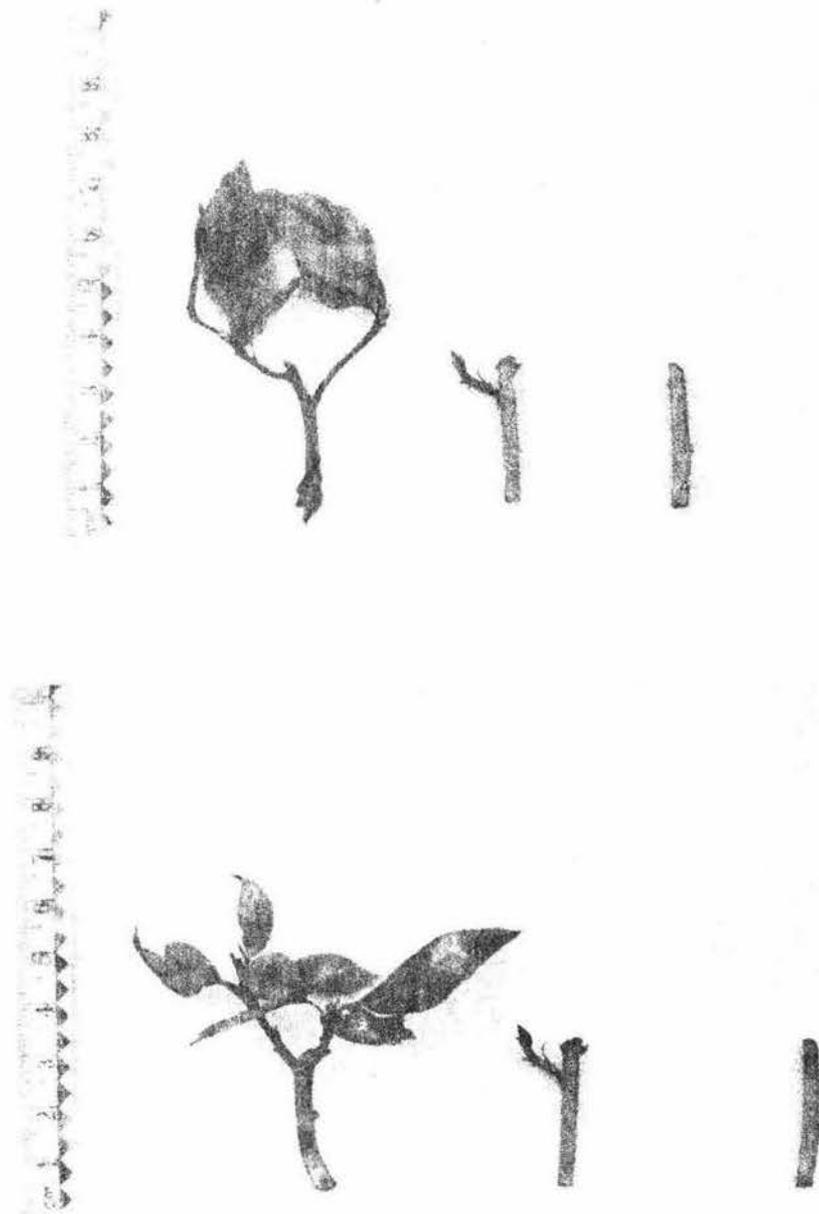


Figura 10.- Estadios de desarrollo de brotes.-

Se muestran explantes de 3 cm de longitud y 0.3 cm - de diámetro, con 2 yemas en el extremo. De der. a - izq. (en ambas partes): explante con yemas aún dor- midas; crecimiento de éstas después de 10 días hasta 1.5 cm de longitud aproximadamente; crecimiento si- multáneo de éstas después de 25 días (4-5 cm de lon- gitud). MB con agar; 2% sacarosa; 10 μ M de AIB, -- 0.1 μ M de 6BA; carbón activado, (0.75% p/v).

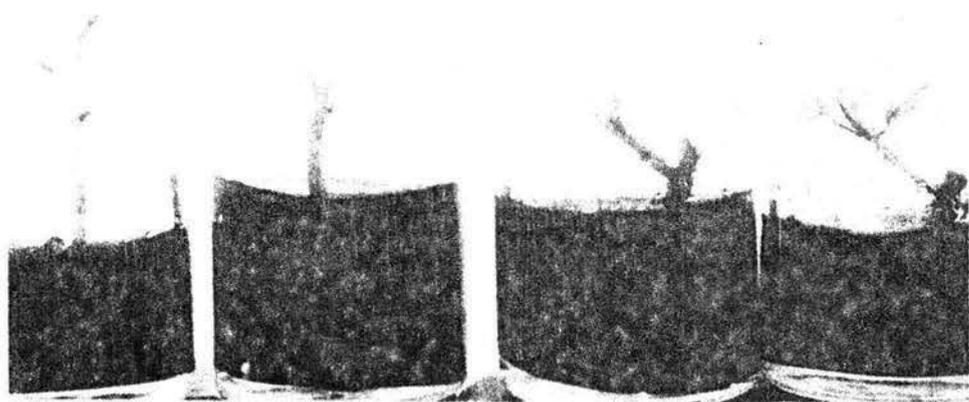


Figura 11.- Secuencia de desarrollo de brote.-

De izq. a der.: Crecimiento después de 3 días; 1 cm de longitud después de 8 días; 4.5 cm después de 20 días, y 6 cm en 28 días. Nótese la presencia de ex-plantas con más de una yema. MB con agar, 2% de sacarosa, 10 μ M de AIB, 0.1 μ M de 6BA, carbón activado (0.75% p/v).



Figura 12.- Brotos de la segunda fase de exposición a combinaciones hormonales.

En cada frasco se aprecia un brote único formado a partir de una yema dormida el cual se alarga desde su base presentando hojas en el extremo y yemas axilares dormidas a lo largo de la parte inferior del brote. (Brotos de 6 cm de longitud). MB con agar, 2% sacarosa, $10 \mu\text{M}$ de AIB, $0.1 \mu\text{M}$ de 6BA, carbón activado (0.75% p/v).

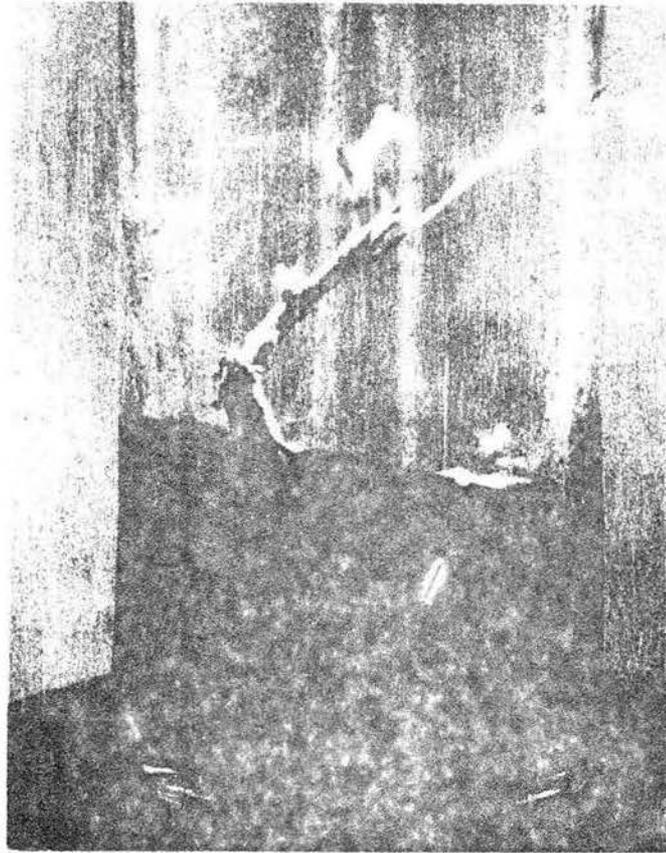


Figura 13.- Rompimiento de dominancia apical.-

Nótese la inducción de yemas axilares. Izq. 12 días después de eliminar la yema terminal de un brote de aproximadamente 6 cm de longitud. Der.: Después de 27 días - de eliminar la punta se pueden apreciar 2 brotes axilares "terminales" desarrollados en forma simultánea (3cm de longitud).

también se pueden incrementar los brotes por explante inicial sembrado, aunque también puede ocuparse para enraizarlo y así se obtendría la planta completa directamente. La frecuencia con que este tipo de brote se presentó en esta fase fué de un 75% - - aproximadamente.

- Otro tipo es aquel que presenta 2 brotes por yema (Figura 14) con una frecuencia de 4% aproximadamente; éstos han llegado a crecer ya sea en forma simultánea (hasta inclusive 4 cm) o alternadamente -- (hasta 5 cm uno de ellos). También se han logrado más de 2 brotes por yema, aunque con una frecuencia muy baja (1% aproximadamente), sin embargo se ha -- presentado dominancia de uno de ellos, y los demás no se desarrollan. Con este tipo de desarrollos -- puede incrementarse el número de brotes por explante inicial sembrado, sin embargo, presentan la desventaja de presentarse con una frecuencia baja.

- En explantes con más de una yema (como se ve en la Figura 10), los cuales se presentaron en esta etapa con una frecuencia de 20%, se ha logrado la inducción y desarrollo de los brotes en forma simultánea, o primero uno y después los otros. Estos -- brotes pueden ser cortados en los primeros esta-- días (2-3 cm) y sembrados o permitir que se desa-- rrollen más, con la subsecuente poda de la zona -- terminal, con lo cual se propiciaría la multiplicación del material en el laboratorio.

Las yemas terminales cortadas, así como las axilares inducidas han podido ser subcultivadas (figura 15) en las - combinaciones que fueron adecuadas para el desarrollo de la

yema (Tabla 6, área sombreada), es decir, 5.0 - 7.5 μ M de AIB en combinación con 0.1 - 0.25 μ M de 6 BA, e inclusive hasta poseer 3 cm. de longitud; se espera que este material joven multiplicado enraice con mayor facilidad posteriormente.

Inicialmente, los explantes con yema apical no respondían al cultivo, posiblemente por efecto tóxico del hipoclorito de sodio, por lo que en los primeros experimentos se -- tendió a eliminar las yemas apicales al sembrar. Posterior -- mente, se hicieron unas pruebas pudiendo denotar que estos -- explantes sí respondían (Figura 16), e inclusive en forma -- más rápida que aquellos con yemas laterales en el extremo, -- si eran esterilizados con hipoclorito de calcio. Estos ex -- plantes con yema apical oscilaban desde 1.5 a 6 cm de longi -- tud, y si 2 semanas después de que la yema induce éstos son -- transplantados a medio de cultivo con 1 μ M de AIB en combi -- nación con 7.5 μ M de 6 BA, se aprecia la inducción de brotes -- axilares en donde se insertan las hojas del brote apical pre -- viamente desarrollado, lo cual nos podría también permitir -- incrementar el número de brotes por explante y así contri -- buir a una posible multiplicación masiva. Además, estos -- brotes apicales, debido a ser material joven y tierno, guar -- dan la posibilidad de ser enraizados con facilidad¹⁰¹.

Con respecto a la adición de carbón activado al medio, una concentración de 0.75% evitaba el paso de luz en buena -- medida, y una vez que los explantes se colocaron en ese me -- dio, no se encontró un efecto fitotóxico aparente; por el -- contrario, comparando el desarrollo del brote en medios de -- cultivo con agar sin carbono y con carbono en un mismo tiem -- po (Figura 17), en estos últimos se lograba apreciar un me -- jor desarrollo del brote, con hoja bien formada, vigoroso, y con un mayor crecimiento. Sin embargo, por lo que respecta a la formación de tejido basal, (callo en la mayoría de las-



Figura 14.- Brotos de la segunda etapa de exposición a combinaciones hormonales (AIB y 6BA).-

En este caso se presentan 2 brotes en una yema desarrollándose conjuntamente (4 y 1 cm de longitud). MB con agar, 2% de sacarosa, $1 \mu\text{M}$ de AIB, $7.5 \mu\text{M}$ de 6BA.

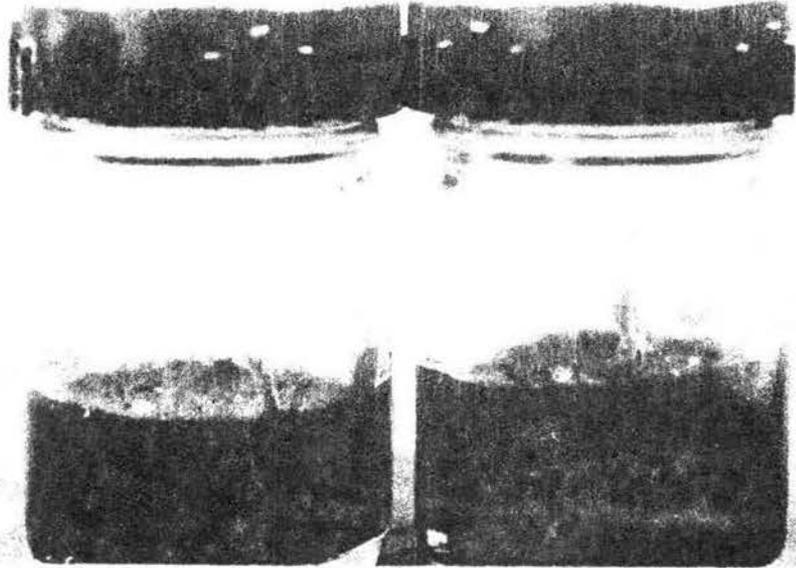


Figura 15.- Subcultivo de yemas terminales -

Las yemas cortadas de brotes apicales o axilares han podido ser cultivadas aisladamente (2 cm de longitud después de 5 días) en MB con aquellas combinaciones más bajas que se pudieron delimitar al exponer al tejido a un espectro hormonal. Este subcultivo permitiría aumentar en primer lugar, dadas sus características fisiológicas juveniles, su habilidad de enraizamiento, y en segundo lugar, aumentar el potencial de multiplicación, dada la presencia de más de una yema -- por explante.



Figura 16.- Explante apical desarrollado.

Porciones etioladas apicales (de 5 cm de longitud, aproximadamente) originalmente con hoja pequeña, -- han logrado ser cultivadas "in vitro", lográndose -- después de 14 días en cultivo el desarrollo de tejido foliar. (Nótese la esponja de poliuretano con carbón usada como sustrato de cultivo).

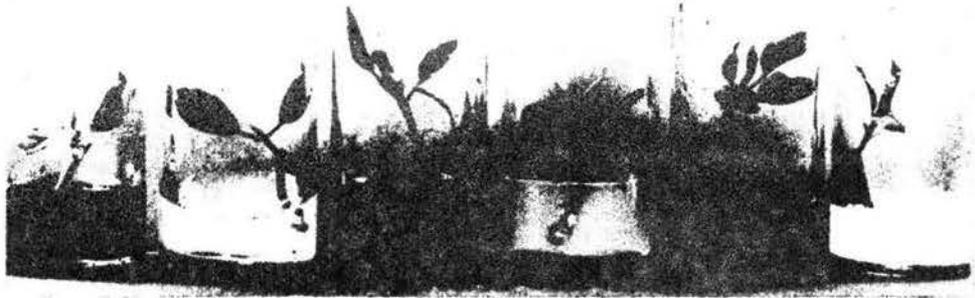


Figura 17.- Desarrollo del brote en medios con y sin
carbón activado. (0.75% p/v).-

Apreciase, sobre todo en la roseta terminal de hojas, un mayor desarrollo en medios con carbono que sin éste. En los extremos, explantes con un sólo brote, - al centro, con 2 brotes cada uno. (Los frascos miden 12.0 cm de altura.).

veces), éste casi no se presentó en presencia de carbono, y cuando se presentaba (con una frecuencia aproximada del 2%) tardaba mucho en hacerlo.

En cuanto a la concentración básica de macronutrientes, 2x parece resultar tóxica, lo cual se manifiesta en encafecimiento foliar, mientras que no hay variación aparente entre la respuesta del tejido a 0.5x y 1x, y como se ha recomendado^{87,133} disminuir esta concentración para poder lograr el enraizamiento, se siguió ocupando 0.5x.

En lo que respecta a la influencia de la concentración de sacarosa de 2, 3 y 4 g/l, se apreció un buen desarrollo de los brotes (hoja grande, vigorosa, de buen color) en comparación con 0.5 y 1.0 g/l, donde el desarrollo fué de menor calidad. En los siguientes medios preparados se ocupó la concentración de 3 g/l, que coincide con la sugerida en la literatura^{53,88} para el enraice de algunas plantas leñosas.

A medida que aumentaba la intensidad luminosa (1400-2100-2800 lux), mejoró el desarrollo de los brotes;^{36,88} esto es, más rápidamente y de mejor calidad. Esto pudo lograrse debido al control de la temperatura durante la segunda etapa de exposición a combinaciones hormonales (23-26°C en el período oscuro y 26-30°C en el luminoso) en contraste con las condiciones de la primera etapa (20-35°C todo el día). Al colocar explantes con y sin yema, en medio básico con agar, en condiciones de oscuridad a temperatura constante (27°C), no se apreció ningún cambio, y por el contrario, el explante detenía su crecimiento, se mantenía etiolado, aún después de exponerlo a la luz, y posteriormente se deterioraba; por lo que este tipo de práctica fué interrumpida.

En relación a los tipos de recipientes ensayados para el cultivo "in vitro", se encontró que aquellos que medían 12.0 cm de altura y 4.4 de diámetro (Figuras 6, 7, 11) y 7.5 cm de altura y 5.5 cm de diámetro (Figura 6) fueron los que mejor funcionaban ya que no acumulaban calor por tener tapa blanca y transparente respectivamente, además de permitir el paso de la luz adecuadamente, junto con el frasco de 10.2 cm. de altura y 4.2 cm de diámetro (Figuras 6 y 12).

Cuando se usaron los frascos pequeños (Figuras 6 y 8), la luz no alcanzaba a pasar bien, lo cual repercutía en un desarrollo pobre del brote, además de que sólo podían sembrarse explantes de 1 a 3 cm de longitud, ya que físicamente no cabían los demás.

Por lo que respecta al uso de sustratos que permitieran la aereación basal, en una etapa preliminar, sólo resultaron satisfactorios la agrolita y la esponja de poliuretano (Figura 7), mientras que, la arena parecía tener un efecto fitotóxico sobre el tejido presentándose oxidación del explante en la vecindad con el sustrato y la zona inmersa en él; la tierra utilizada se apelmazaba con el medio nutritivo agarizado, por lo que el explante no progresaba al no existir una adecuada aereación basal; cuando se utilizó la agrolita (en diferentes diámetros de partícula) en combinación con arena, esta última se precipitaba en el fondo formándose 2 capas, evitando así cualquier ventaja que pudiera presentar esta combinación. En la fibra de vidrio fué difícil distribuir el medio básico dejando un espacio de aereamiento, y por lo tanto no presentaba ventajas sobre otros sistemas.

Sin embargo, al usar como sustratos de cultivo a la agrolita (en diferentes diámetros de partícula) y esponja de

poliuretano (como se mostró en la figura 7), se encontró que el brote se desarrollaba sin muchos problemas (aunque más lento que en el medio agarizado simple), y que se desarrollaba un callo basal compacto y blanco (Figura 18) después de 15 días en cultivo, con la siguiente frecuencia (de una población total de sustratos de 140 frascos, de los que 48 eran de agrolita -de diferente diámetro- y 16 de esponja de poliuretano):

agrolita: 31%
esponja: 69%

en comparación con el callo basal que se llegaba a obtener en los medios de cultivo con agar (como se aprecia en la Figura 9), el cual era más bien capaz de disgregarse.

Después de 45 días en cultivo se obtuvieron aproximadamente 7 explantes con desarrollo radicular de una población - de 140, perteneciendo 6 a la población del 31% cultivados en agrolita, por lo que se determinó un porcentaje de enraice de 5% de la población total para esta etapa preliminar pero si - tomamos en cuenta sólo la población cultivada en agrolita, el porcentaje de enraice fué de 12.5.

La secuencia de cambios a las que estos explantes se - sujetaron presentaron las siguientes características:

- Un explante de 5 cm de longitud, 0.35 cm de diámetro y con 2 yemas opuestas latentes en el extremo, expuesto 2 semanas a medio de cultivo básico con agar-2% sacarosa, concentración hormonal 10 μ M de AIB más 0.1 μ M de 6BA, 0.75% de carbón activado. Al final de este período mostraba 2 brotes de 4.5 cm de longitud cada uno. Este explante se transplantó a medio

de cultivo básico con la mitad de la composición básica de macronutrientes, con agar suave, 3% de sacarosa, concentración hormonal de $1 \mu\text{M}$ de AIB más $7.5 \mu\text{M}$ de 6BA, y 0.75% de carbón, en donde desarrolló -- una raíz de 3 cm de longitud aproximadamente. (Figura 19), orientada perpendicularmente al explante, sin embargo, no se produjo posteriormente una plántula establecida.

- Un explante de 3 cm de longitud, 0.3 cm de diámetro y yema dormida en el extremo, expuesto 2 semanas a medio de cultivo básico con la mitad de la concentración de macronutrientes, con agar, 2% de sacarosa, concentración hormonal de $10 \mu\text{M}$ de AIB más $0.1 \mu\text{M}$ de 6BA, con 0.75% de carbón activado, y al fin de este período mostraba un brote de 3 cm de longitud. El explante fué transplantado a sustrato de cultivo -- constituido con agrolita, con medio a la mitad de -- concentración de macrocomponentes, agar, 2% sacarosa $10 \mu\text{M}$ de AIB más $0.1 \mu\text{M}$ de 6 BA, 0.75% de carbón activado, donde desarrolló una raíz de 0.5 cm de longitud, en situación horizontal con relación al explante (Figura 19). No se produjo una plántula establecida posteriormente.
- 5 explantes de 4-6 cm de longitud, 0.3-0.5 de diámetro, 1-2 yemas latentes en el extremo, expuestos 2 semanas a medio de cultivo básico con la mitad de la concentración de macronutrientes, con agar, 2% de sacarosa, $10 \mu\text{M}$ de AIB más $0.1 \mu\text{M}$ de 6BA, 0.75% de carbón activado, donde desarrollaron brotes de 3-4 cm de longitud, y posteriormente fueron transplantados a sustratos de cultivo constituidos con agrolita, --

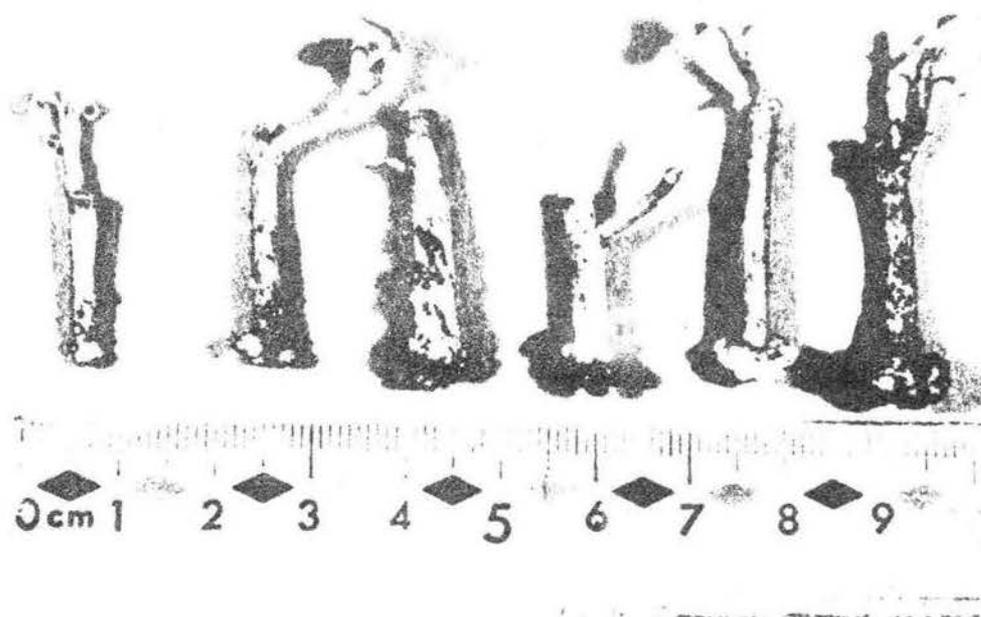


Figura 18.- Crecimientos basales en medios que permiten la aereación basal.-

Después de 15 días se observan distintos tipos de respuestas; de izq. a der.: puntos en el tallo; masas -- aisladas de callo compacto; engrosamiento basal; masas de callo terminal obscuro; masas de callo blanco y compacto; masa pronunciada de callo con engrosamiento basal.



Figura 19.- Explantes enraizados después de 45 días en cultivo.-

Los explantes (de 3.5 a 4.5 cm de longitud, 0.3 - 0.35 cm de diámetro) desarrollaron una raíz en medios de cultivo que permitieron la aereación basal, (como la agrolita y espuma de poliuretano).

con medio a la mitad de la concentración básica de macronutrientes, agar, 3% de sacarosa, 10 μ M de AIB más 0.1 μ M de 6 BA, 0.75% de carbón activado, desarrollando raíces de 0.1 a 0.3 cm aproximadamente, orientadas perpendicularmente al explante.

DISCUSION.-

La obtención de brotes etiolados ha sido sugerida por varios autores^{46,47,55} como fuente de estacas para favorecer la inducción y desarrollo radicular en plantas que presentan dificultad para el enraizamiento; lo anterior se apoya en algunas observaciones como es la inhibición del enraice por efecto de la luz^{44,55}; el favorecimiento -en brotes etiolados- de un balance hormonal tendiente a una mayor concentración auxínica, la cual puede ayudar a la inducción radicular^{4,62,84,113,114,117,121,126}; y la presencia en brotes etiolados de tejido "suave" no completamente diferenciado que pudiera diferenciarse, en un medio adecuado, en primordios radiculares^{47,55}, aunque realmente no se ha profundizado mucho en los resultados histológicos y fisiológicos de la etiolación de brotes con respecto al enraice, sino más bien para la obtención de resultados prácticos que se puedan derivar de su uso, como es el enraizamiento de buena calidad y en un corto tiempo en comparación con aquellos brotes sin etiolar.

Para el aguacate se ha estado usando el método de etiolación de brotes para favorecer la propagación de estacas^{43,44,45}, aunque no se cuenta actualmente⁶⁷ con una metodología comercial ampliamente utilizada. Además de las observaciones anteriormente expuestas que apoyan el uso de brotes etiolados en el estacado del aguacate, se han estudiado³⁸ los cambios histológicos que este tipo de brotes presentan en relación a aquéllos que crecen en condiciones de fotoperíodo normal; así, en aquellos etiolados se aprecia una falta de continuidad en el anillo de esclereidas, semejando la condición que presentan las porciones apicales o terminales de juvenilidad, lo cual puede permitir la emergencia radicular -- que se limitaría por este anillo de esclerénquima como suce-

de en algunas plantas que son de difícil enraice^{38,55} entre las que encontramos el aguacate^{50,56,64,68,129}. Es por esto que se ocuparon brotes etiolados como fuente de explantes para la propagación "in vitro".

Para poder valorar las ventajas de la obtención de este tipo de brotes, se obtuvieron datos cuantitativos de los mismos antes de ser cosechados. Esto nos permite conocer el número de explantes promedio por planta después de una primera cosecha (21.5) y después de una segunda (54.9) - es decir, 76.4 explantes después de 2 cosechas de una misma planta, además de contar con la posible ventaja de obtener brotes con mayor juvenilidad^{52,78} en la posterior cosecha, por efecto de la poda, lo cual pudiera tener influencia positiva sobre el enraice^{50,101}. Sin embargo, lo preliminar de estos resultados hace necesario realizar evaluaciones posteriores para determinar en forma más precisa, el rendimiento de diferentes sistemas de etiolación, así como su relación con el enraizamiento de estacas de aguacate.

La desinfección del material vegetal es de primordial importancia para quien aplique métodos de cultivo "in vitro"^{32,114,121}, pudiendo depender de ésto el éxito o fracaso de una investigación. Por ésto es importante encontrar condiciones adecuadas en las que se presente el menor porcentaje de contaminación con el menor daño al tejido
61

Cuando se presenta una profusa contaminación ésta se puede manifestar aún después de que se desinfecten los explantes con soluciones esterilizantes³², ya que es tal la proporción de organismos que se encuentran restringidos a la epidermis de la planta, es decir, la interfase entre la planta y el medio ambiente, que es materialmente imposible eliminarlos por completo con un tratamiento enérgi-

co, sin antes dañar considerablemente el tejido^{32,61}. Se considera^{32,33} que cuando el origen del explante es la planta en el campo, se tiene una mayor posibilidad de contaminación de microorganismos, sobre todo en los tejidos exteriores de los explantes escogidos para cultivar "in vitro" en contraste con plantas cuyas partes por cosechar se han desarrollado en condiciones de invernadero, y más aún, en cuartos asépticos³².

El manejo de plántulas en recintos oscuros en el invernadero, en lugar de traer el material directamente del campo disminuye la contaminación de los tejidos en crecimiento, lo que representa una ventaja secundaria para cultivar asépticamente "in vitro" los explantes derivados. Es por esto que cuando en experimentos preliminares en los que se ocuparon explantes sin etiolar (Tabla 4) los índices de contaminación eran mayores que cuando el tejido se desarrolló en recintos oscuros, sin embargo, la diferencia no es muy grande porque esta planta también se encontraba ubicada en el invernadero.

Las evaluaciones realizadas en este trabajo muestran un porcentaje apropiado de explantes potencialmente cultivables, el cual oscila entre 84 y 75% después de 15 días de cultivo, después de esterilizar con hipoclorito de calcio y detergente neutro, ya que el hipoclorito de sodio parecía dañar al tejido, principalmente en sus partes más sensibles, como yemas y hojillas apicales.

Al esterilizar el medio de cultivo es aconsejable cuidar el aspecto de termolabilidad de algunos de sus componentes^{32,121}. Existen algunas técnicas que permiten adicionar éstos al medio de cultivo sin que sufran daño alguno, siendo la más usada -aunque no la más práctica- la retención de partículas y microorganismos por medio de membranas milipore^{20,32,58}. En este trabajo, no se utilizó esta técnica por

considerar más práctico el partir de soluciones madre esterilizadas con etanol al 70%, las cuales se pudieron añadir directamente y en forma sencilla al medio de cultivo previamente sometido al autoclave, una vez que se delimita el porcentaje de tolerancia al etanol del tejido en cultivo, para no ocasionar daño al tejido que se ubique en el medio de cultivo -- (ya que éste puede intoxicarse por un exceso de alcohol⁸⁰).

El pH es un factor importante a considerar en la preparación de los medios de cultivo^{32,121}, ya que de él depende rá una adaptación o no del tejido (mientras más se acerquen sus valores a los que el tejido cuenta en forma endógena) al medio de cultivo, así como la disponibilidad de nutrientes recomendándose para el cultivo en huerto del aguacate^{21, 111} un pH ligeramente ácido, por lo que se buscaron valores de 5.6--6.0 al ajustar el pH del medio de cultivo, valores que también han sido recomendados^{32,121} para asegurar la disponibilidad de nutrientes "in vitro".

El cómo seleccionar un medio de cultivo para una especie u objetivo en particular es un detalle vital a tomar en consideración^{23,32,48,121}. Se ha sugerido³² buscar en la literatura trabajos reportados de especies relacionadas, los cuales no se localizaron para nuestro trabajo, y los que se encontraron^{107,109,112}, no mostraban justificaciones amplias para el uso de uno u otro medio de cultivo para nuestros propósitos. La posibilidad³² de ocupar algún medio de cultivo que se use ampliamente en otras especies u otros objetivos --^{23,48}, no se siguió tampoco, ya que muchos de ellos contienen un alto porcentaje de ciertos iones que no se desea estén en esas proporciones, por su posible toxicidad (como es la del sodio y cloro en altos niveles⁷³). Así pudimos seguir ciertas consideraciones realizadas por DeFossard³² respecto a los

diferentes componentes del medio, como es el partir del hecho de que hay iones que tienen un papel metabólico o estructural, como son NO_3^+ , PO_4^- y SO_4^- , e iones que son partes vitales de enzimas o procesos catalíticos, como el Mg^{++} , Fe^{++} y Cu^{++} ; el dividir a los iones en esa forma, muestra una relación de las cantidades de minerales que se requieren, es decir, aquellos que tienen un papel catalítico se requieren en pequeñas cantidades comparando con aquellos que se involucran en el metabolismo estructural⁴. Además, es de considerarse la posible inducción acelerada del desarrollo vegetativo influenciada por un alto contenido de nitrógeno en el medio; el desarrollo de ápices radiculares y del tallo influenciado por el calcio, la participación de la tiamina y riboflavina en procesos de desarrollo radicular, etc.^{4,32,62,127}. Otras consideraciones hechas fueron: la oxidación que sufre el tejido del aguacate, la que puede evitarse mediante la adición al medio de cultivo de antioxidantes, como el ácido ascórbico, en altos niveles^{32,121}; y la adición al medio del fierro en forma de quelato asegurando su disponibilidad a los explantes^{32,121}.

Como fuente de carbono se utilizó sacarosa, ya que ha sido recomendada por varios autores^{97,121,123}, de acuerdo a una mejor respuesta morfo genética del tejido, en lugar de otros azúcares.

Según los resultados de este trabajo, es importante que el explante a sembrar presente la yema latente ubicada en el extremo superior, separada del medio de cultivo, ya que se observó que es cuando se obtiene un mejor desarrollo, quizá por el gradiente hormonal que se llega a establecer.

La fase inicial del cultivo de explantes usada en este trabajo constituye una fase de adaptación, en los

primeros 7-9 días de cultivo (la que recomiendan también -- otros autores¹²⁵), lo que permite una selección de explantes no contaminados o maltratados, "vigorosos" para utilizarse posteriormente en el establecimiento del cultivo.

Interacciones cuantitativas definidas entre los factores del crecimiento, especialmente auxinas y citocininas, y entre éstos y otros factores (no analizados en este trabajo), participan en los mecanismos de regulación del crecimiento: desde la elongación celular, hasta la formación de órganos^{62,117,128,126}. Nuestros resultados nos muestran que existen diferentes intervalos definidos bajo los que el tejido del aguacate responde, ya sea con desarrollo aéreo o basal, y combinando estos intervalos es posible planear una secuencia de desarrollo y obtención de material "in vitro" con el propósito final de la propagación vegetativa. Por lo que respecta al desarrollo basal, el crecimiento de callo y engrosamiento de la base del explante se ve favorecido por altos niveles de AIB en el medio de cultivo, sin embargo, éstos inhiben o deprimen el desarrollo de las yemas, las que se ven favorecidas por las citocininas⁶²; y por el contrario, cuando éstas son muy altas se retarda o inhibe el desarrollo de raíces^{62,117,126}. Es por ésto que fué necesario encontrar niveles adecuados en los que el tejido pudiera desarrollar estos tipos de respuesta, ya sea al mismo tiempo o en forma aislada, sin que un nivel hormonal interfiera con la respuesta que se busque con la otra hormona, así en la segunda fase de exposición a combinaciones hormonales fué posible detectar intervalos que favorecían los dos tipos de respuestas, en forma aislada o al mismo tiempo, sin que interfiriera una respuesta con otra. Esto posteriormente nos puede ayudar al delimitar los pasos a seguir al desarrollar una metodología de propagación en larga escala.

Los diferentes tipos de brotes obtenidos nos permiten sugerir algunas vías por las que se pueden aumentar los índices de multiplicación "in vitro". Así, en aquel brote en el que previa eliminación de la zona terminal, se pueden llegar a inducir las yemas axilares presentes (como se aprecia en la Figura 12 izquierda), permite, al menos potencialmente, el contar con 3 o más brotes/explante, además de que la parte remanente también se puede subcultivar.

Los explantes que cuentan con 2 o más brotes por yema (figura 14), podrían permitir por lo menos una duplicación de brotes; lo anterior, ya sea cortando cada uno, una vez que ha desarrollado (en el caso de que los demás no lleguen a desarrollarse simultáneamente) y así romper la dominancia apical y permitir que se desarrolle el siguiente, y continuar con la misma secuencia para los demás brotes. Cuando estos si llegan a desarrollarse simultáneamente, pueden subcultivarse todos al mismo tiempo; de cualquier manera, el incremento de brotes por explante podría darse de las 2 maneras.

Cuando se cuenta con explantes con dos o más yemas se puede también incrementar el potencial de multiplicación permitiendo primero el desarrollo de los brotes (que puede ser al mismo tiempo o no) hasta 5-7 cm., eliminando la yema terminal con la consiguiente inducción de las axilares presentes en cada brote, logrando así al menos potencialmente, aumentar el índice de multiplicación en forma considerable, 6-10 brotes por explante sembrado, además de poder subcultivar las yemas terminales antes separadas.

El hecho de que los explantes con yema apical respondieran al cultivo en forma más rápida que los demás tipos de explantes nos permite seleccionar otro tipo de ex-

plante -que antes no se ocupaba- para la producción de brotes ya que en ciertas condiciones se pueden llegar a inducir las yemas axilares en donde se insertan las hojas del brote apical previamente desarrollado, en un número de 3-6 por explante. Cuando estos explantes miden más de 3 cm se localizan 3-6 yemas dormidas hacia la base, y también puede eliminarse la zona terminal con sus yemas axilares inducidas para subcultivarla, y como consecuencia inducir las yemas dormidas que se encuentran a lo largo del resto del explante, y así obtener, al menos potencialmente, un incremento de 6-12 brotes -- por explante inicial sembrado.

Algunas de estas posibilidades ya se han ensayado en el laboratorio, y obtenido resultados preliminares aislados - que apoyan la viabilidad de estas ideas, y posteriormente deberán ser ensayadas en forma sistemática, con el fin de establecer un potencial de multiplicación real, el cual se podrá combinar con el rendimiento sistemático que de la etiolación se pueda obtener por plántula y entonces considerar, en forma más exacta, cuál es la viabilidad de establecer un sistema de propagación comercial "in vitro" para el aguacatero.

Al carbón activado se le han atribuido efectos sobre el crecimiento y morfogénesis en cultivo de tejidos en algunas especies^{31,41,42,87}, de manera que su uso se ha recomendado para experimentos de embriogénesis, producción de haploides a partir de anteras, hasta la inducción radicular, y el éxito del uso del carbono en estos procesos ha sido relacionado con la remoción de la presencia de ciertas sustancias del medio, que de alguna manera los deprimen o inhiben.

El hecho de añadir carbón activado al medio de cultivo (0.75%) con el fin de oscurecerlo resultó en un buen desarrollo del brote (como se aprecia en la Figura 17), lo cual finalmente nos beneficia. De acuerdo a los resultados de es



INSTITUTO NACIONAL DE ESTUDIOS
CIENTÍFICOS Y TECNOLÓGICOS
ESTADOS UNIDOS MEXICANOS

te trabajo parece ser necesaria la presencia de carbono - - en el medio agarizado para la formación de raíz, no obstante ésto es una mera especulación, ya que aunque no se obtuvo ningún enraice en agar sin carbono, en el caso contrario sólo hubo un caso aislado de enraizamiento (de una población total de 140) y por coincidencia el agar fué muy suave, lo que debió favorecer también el enraice; sin embargo, es muy probable que el carbono jugó un importante papel en - - aquellos enraizamientos efectuados después, el transplantar los explantes a sustratos aireados, y jugando un papel importante el efecto de la presencia del carbono en el mantenimiento de la base del explante en condiciones etioladas.

Combinando los diferentes intervalos de concentraciones hormonales que favorecieran tipos de morfogénesis específicos, con la adición de carbón activado, así como disminución en la concentración básica de macronutrientes y aumento en la proporción de sacarosa, aunado al aumento en la intensidad luminosa con el uso de recipientes de cierta altura y/o transparentes, es como se han obtenido los mejores resultados en cuanto a desarrollo de brote se refiere. Diferentes autores han observado que en recipientes de cultivo pequeños y/o con tapa opaca (como la baquelita, el papel aluminio, etc.) se obtiene de un 20 a un 60% menos de la intensidad luminosa ^{60,61}, en comparación con recipientes de cultivo totalmente transparentes, por lo que se siguió usando recipientes altos y en la medida que se pudiera: transparentes.

La utilización de sustratos que puedan permitir una mayor aereación de la zona basal del explante ha sido recomendada, últimamente, por diversos autores ^{60,83,133} para obtener un mayor porcentaje de enraice, así como una mejor calidad en el enraizamiento. En este desarrollo metodoló-

gico, el uso de este tipo de sustratos nos ha permitido la obtención de inducción radicular en explantes después de 45 días en cultivo, aunque inicialmente con un porcentaje bajo (5% del total sembrado-140- y 12,5 si consideramos que los explantes enraizados provenían únicamente de la población - en la que la agrolita se ocupó como sustrato "in vitro"), - sin embargo, después de estos resultados, se tiene la posibilidad de optimizar este proceso y así producir plántulas completas que posteriormente podrían ser evaluadas como portainjertos.

CONCLUSIONES.-

- Se cuenta con un método de obtención de tejidos etiolados de plantas juveniles de aguacate injertado, consistente en brotes con yemas latentes que pueden proporcionar, para su cultivo "in vitro", hasta 76 explantes después de dos cosechas de dichos brotes de una misma planta (mantenida por 3-4 meses en etiolación).

- Se tiene una técnica de esterilización de explantes en la que éstos son expuestos a soluciones conteniendo 1.5 - 1.75% (p/v) de cloro activo en combinación con 0.15% (p/v) de detergente neutro (Tritón x-100) por 25-30 minutos, y con la cual sólo se llega a acumular un porcentaje de contaminación del 16 al 25% después de 15 días, además de no dañar al tejido en forma aparente.

- Después de delimitar el porcentaje de tolerancia al etanol del tejido en cultivo (0.5 - 1.0%), se tiene la posibilidad de esterilizar los componentes termolábiles que se añaden posteriormente al medio de cultivo permanente sometido al autoclave, en forma rápida y sencilla al ser añadidas como soluciones etanólicas ya estériles.

- Se cuenta con un medio básico de cultivo capaz de sostener el desarrollo del brote, a la vez que se han encontrado condiciones de temperatura, fotoperíodo e intensidad luminosa que también lo favorecen.

- Se han determinado las combinaciones de AIB y 6BA para inducir y promover el desarrollo del brote, de buena calidad y en un tiempo relativamente corto (hasta 7-8 cm en 25-

días); además de los intervalos bajo los que se ve favorecido el engrosamiento de la base, y el desarrollo de callo basal, los que pueden conllevar, aunque no obligatoriamente, a la formación de raíces.

- Se ha delimitado que el explante que mejor responde a las condiciones de cultivo (principalmente por lo que respecta al desarrollo del brote) es aquel que mide 3-6 cm de longitud, 0.30-0.35 de diámetro, y presenta la yema latente en el extremo. Se debe investigar el uso de explantes con yema apical.

- Los tipos de morfogénesis del desarrollo del brote logrados proveen la posibilidad de multiplicarlos, y por lo tanto, aumentar el índice de propagación "in vitro", al menos potencialmente, hasta valores aumentados por lo menos en un orden de uno respecto al de 76 daco antes.

- Se han ensayado variaciones en las características del medio básico de cultivo, como es la concentración básica de macronutrientes, la cantidad de sacarosa, y la adición de carbón activado, logrando denotar las proporciones que favorecen el desarrollo del brote, y la formación de tejido basal.

- Se ensayaron diferentes sustratos de cultivo que favorecen la aereación del tejido basal con el propósito de lograr la formación de raíces, encontrando, preliminarmente a la agrolita y esponja de poliuretano como los más adecuados que mantienen el tejido en cultivo en buenas condiciones, y que favorecen el desarrollo de tejido basal.

- Después de 45 días en cultivo (además de 12-15 días previos en los que se obtenía el desarrollo del brote)-

se ha logrado la inducción y desarrollo radicular (con un -- porcentaje de 12.5) de explantes con brotes desarrollados, - bajo las siguientes condiciones: medios de cultivo básico - con agar y carbón activado, la mitad de concentración básica de macronutrientes, aumento en la proporción de sacarosa, y - en sustratos de cultivo que pueden permitir la aereación ba- sal.

En base a las conclusiones anteriores, se pueden de- limitar las perspectivas a seguir con el fin de montar, pos- teriormente, la metodología que permita la obtención comer- cial de patrones clonales "in vitro": Así, deberán encon- trarse las características de los explantes etiolados que me- jor respondan al desarrollo de brote y enraizamiento "in vi- tro", optimizando también las técnicas de etiolación que per- mitan obtener el máximo rendimiento del tipo de explantes an- tes señalado. Deberá buscarse la vía más aceptable de mul- tiplicación de brote en el menor tiempo posible, en base a - las perspectivas señaladas en este trabajo. Para poder con- tar con la metodología completa de propagación "in vitro", - deberá optimizarse la fase de enraizamiento de brotes, mejo- rando el uso de sustratos que permiten la aereación basal -- del explante. Deberá buscarse la composición nutricional - más adecuada para los distintos objetivos mencionados, va- riando la concentración de algunos iones³² y de componentes- orgánicos clave. Conjuntamente, deberá ensayarse en forma- sistemática el efecto de la variación de diferentes condicio- nes ambientales (iluminación, temperatura, humedad relativa, etc.) en relación al proceso de obtención de plántula comple- ta "in vitro". Además, una vez obtenido el brote enraizado o la planta completa "in vitro" deberá ensayarse diferentes- formas de trasplante y aclimatización en el invernadero, pa-

ra su posterior evaluación y adaptación en campo. Después de resolver estas líneas, es posible derivar y montar la técnica de propagación vegetativa "in vitro", con interés comercial, de patrones de aguacate con características ventajosas para su cultivo.

BIBLIOGRAFIA.-

- 1.- Abbot A. (1978). Practice and promise of micropropagation of woody species. Acta Hort. 79: 113-127.
- 2.- Alvarez de la Peña F.J. (1979). El Aguacate. Ministerio de Agricultura; Publicaciones de Extensión Agraria. Madrid.
- 3.- Barnhill J.J. (1979). Commercial use of tissue culture -- for the production of disease-free plants. En: - Plant Cell and Tissue Culture: Principles and Applications. Sharp W.R. y col.(ed.).441-452.Ohio State University Press. Columbus.
- 4.- Baron W. (1979). Organization in Plants. Arnold Publishers London. pp.91-113;152-201.
- 5.- Benincasi R. (1976). Tentativi di applicazione di tecniche di propagazione agamica in piante da frutto-tropicali presso la stazione sperimentale di -- m'vuazi (Basso Congo). Revista de Agricoltura-Subtropicale e Tropicale ; 182-195.
- 6.- Ben Ya'acov A. (1971). Avocado rootstock-scion relationships: a long-term large-scale research project. YB.Calif.Avoc.Soc. 55: 158-162.
- 7.- _____ y Kadman A. (1964). Rooting of avocado cuttings under artificial mist spray. Israel J.Bot. 12:142.
- 8.- _____ y Sela I. (1976). Propagative characteristics of avocado rootstocks. En: Research Reports on Subtropical Fruit Trees. Division of Scientific Publications (ed.).27-31 (He.Abs.En.) The Volcani Center, Bet Dagan.

- 9.- Bergh B.O. (1975). Avocado. En: Advances in Fruit Breeding. Janick J. y Moore J.(ed.) Purdue University Press. U.S.A.:541-567.
- 10.- Bergh B.O. y Whitsell R. (1962). A possible dwarfing -- rootstock for avocado. YB.Calif.Avoc.Soc.46:55-62.
- 11.- Bonga J.M. (1980). Plant propagation through tissue culture, emphasizing woody species. En: Plant Cell Cultures:Results and Perspectives. Sala F. y col.(ed.).253-264. Elsevier North-Holland Biomedical Press. The Netherlands.
- 12.- Bósquez M.E. y col. (1981). Estado de madurez y susceptibilidad al daño por frío de aguacate (Persea-americana Mill.), var.Hass. III Congreso Nacional de Fruticultura, Memorias. Guadalajara,Jal. Resúmen 60.
- 13.- Bottino P. (1975).The potential of genetic manipulation in plant cell cultures for plant breeding. Radiation Botany 15:1-16.
- 14.- Bourdeaut J. (1970). Le bouturage de l'avocatier en Côte d'Ivoire. Fruits 25(9):605-612.
- 15.- Bowling D.J. (1976). Uptake of Ions by Plant Roots. Chapman and Hall Ltd. London.
- 16.- Boxus Ph. y Druart Ph. (1980). Micropropagation, an industrial propagation method of quality plants true to type and at reasonable price. En:Plant Cell Cultures: Results and Perspectives. Sala F. y col.(ed.).265-269. Elsevier North-Holland Biomedical Press. The Netherlands.
- 17.- Bozzini A.(1980). Plant cell cultures and their possible impact in improving crop production in the developing world. En: Plant Cell Cultures: Results and Perspectives. Sala F. y col.(ed.)3-9. Elsevier North-Holland Biomedical Press. The --

Netherlands.

- 18.- Brauer O. (1978). Fitogenética Aplicada. Ed. Limusa. --- México:453-454.
- 19.- Brom R.E. (1970) El Aguacate. Escuela Nacional de Fruticultura. México:1-171,283-314.
- 20.- Breach M.R. (1976). Esterilización: Métodos y Control. -- Ed. El Manual Moderno. México:13-34.
- 21.- Butcher D. y Ingram D. (1976). Plant Tissue Culture. Studies in Biology No.65. Arnold Publishers. Cambridge.
- 22.- Calderón E. (1977). Fruticultura General. E.C.A. México.
- 23.- Carrillo C. (1978). Citocultivos. Manual de Laboratorio. Colegio de Postgraduados, Chapingo.
- 24.- Carvalho F. (1974). El Aguacate. Ed. Ra. México.
- 25.- Chandler W.H. (1962). Frutales de Hoja Perenne. Ed. Hispano Americana. México:254-285.
- 26.- Childers F. (1966). Temperate to Tropical Fruit Nutrition Somerset Press Inc. Somerville, New Jersey.
- 27.- Cooke R.C. y Schroeder C.A. (1978). Growth of Persea americana (avocado) "in-vitro". In-Vitro 14(4):335.
- 28.- CONAFRUT. (1978). Fruticultura Mexicana; 1: Información -- Básica. Subdirección de Difusión y Relaciones - Públicas. México.
- 29.- CONAFRUT. (1980). Aguacate. El Mercado Exterior Frutícola. No.03, Nov.
- 30.- Coutanceau M. (1971). Fruticultura. Oikos-Tan, Ed. Barcelona.
- 31.- Damiano C. (1978). Il carbone attivo nella coltura "in-vitro" della fragola. Grupo Giornalistico Edagricole; Estratto de Frutticoltura. Anno XL-n.5. -- V/49-V/50.
- 32.- DeFossard R. (1976). Tissue Culture for Plant Propagators. University of New England Printery. Australia.

- 33.- DeFossard R. (1978). Tissue culture propagation of Eucalyptus focifolia F.Muell. En: Proceedings of Symposium of Plant Tissue Culture. Science -- Press. (ed.).425-438. Peking.
- 34.- _____ (1978). Nuclear stocks, multiplication rates and economic considerations of tissue culture-propagation of horticultural species. En: Proceedings of Symposium of Plant Tissue Culture. Science Press.(ed.).439-447. Peking.
- 35.- Devlin R. (1976). Fisiología Vegetal. Ed. Omega.Barcelona.
- 36.- Dutcher R. y Loyd P. (1972). Culture of apple shoots --- from bud "in-vitro". J. Amer. Soc. Hort. Sci.-97(4):511-514.
- 37.- Durzan D.J. (1980). Prospects for the mass propagation - of economically important conifers by cell and tissue culture. En: Plant Cell Cultures: Results and Perspectives. Sala F. y col. (ed.).283-288. Elsevier North-Holland Biomedical Press. The Ne-therlands.
- 38.- Ernst A. y Holtzhausen L.(1978). New promising technique- for rooting difficult-to-root avocado (Persea- americana Mill.). The Citrus and Subtropical --- Fruit Journal. March:6-7.
- 39.- Fajac F. (1980). Les fruits tropicaux et les agrumes au - Mexique. Fruits.35(10):645-651.
- 40.- Fersini A.(1975). El Cultivo del Aguacate. Ed. Diana. Mé- xico.
- 41.- Fridborg G. y Eriksson T. (1975). Effects of activated -- charcoal on growth and morphogenesis in cell -- cultures. Physiol. Plant.34:306-308.
- 42.- _____ y col. (1978). The effect of activated charcoal on tissue cultures:adsorption of metabolites --

- inhibiting morphogenesis. Physiol.Plant.43:104-106.
- 43.- Frolich E.(1951). Rooting guatemalan avocado cuttings. YB. Calif.Avoc.Soc.35:136-138.
- 44.- _____ (1961). Etiolation and the rooting of cuttings. Proc.11th.Annu.Mtg.Plant.Prop.Soc.:277-283.
- 45.- _____ y Platt R. (1972). Use of the etiolation technique in rooting avocado cuttings. YB.Calif. - Avoc.Soc.56:97-109.
- 46.- Garner R. (1969). Formas de propagación vegetativa. En:- Conferencia Sobre Propagación de Especies Frutícolas Tropicales y Subtropicales. F.A.O. Tema 4:1-2.
- 47.- _____ y col.(1976). The Propagation of Tropical Fruit Trees. F.A.O-C.A.B. Horticultural Review No.4. London.1-172.
- 48.- Gamborg O., Murashige T.,Thorpe T. y Vasil L. (1976). Plant tissue culture media. In-Vitro 12(7):473-478.
- 49.- Gazit S. y Blumenfeld A. (1970). Tissue cultures of callus derived from avocado fruit. YB.Calif.Avoc.Soc.-54:105-109.
- 50.- Gillespie H.(1957). Stem-rooting varietal clones by means of "juvenile growth phase" leafy-stem nurse cuttings. YB.Calif.Avoc.Soc.41:94-97.
- 51.- Gómez R.(1973). Anatomical aspects of avocado stem with reference to rooting. Proc.Trop.Reg.Am.Soc.Hort. Sci.17:23-28.
- 52.- Gorst J. y DeFossard R.(1980). Riboflavin and root morphogenesis in Eucalyptus. En: Plant Cell Cultures: Results and Perspectives. Sala F.(ed.) 271-275.- Elsevier North-Holland Biomedical Press. The Netherlands.
- 53.- Grinbault U. (1972). Differentiation of Citrus stem "in-vitro". J.Amer.Soc.Hort.Sci.97(5):599-603.

- 54.- Gustafson C. y Kadman A. (1969). Effect of some plant -- hormones on the rooting capacity of avocado cu -- ttings. YB.Calif.Avoc.Soc.53:97-100.
- 55.- Hartman H. y Kester D. (1980). Propagación de Plantas. - C.E.C.S.A. México:237-272.
- 56.- Haas A.(1937). Propagation of the Fuerte avocado by means of leafy-twig cuttings. YB.Calif.Avoc.Soc.22:- 126-132.
- 57.- _____ (1939). Root temperature effects on the growth of walnut and avocado seedlings. YB.Calif.Avoc. - Soc.24:96-102.
- 58.- Helgeson J.P.(1980). Plant tissue and cell suspension cul -- ture. En: Tissue Culture Methods for Plant Pa-- thologists. Ingram D.S. y Helgeson J.P. (ed.): 19-25. Blackwell Scientific Publications.Oxford.
- 59.- Howard B.(1976). Some approaches to propagation problems -- in the early multiplication of new clones of -- woody fruit plants. Comb.Proc.Pl.Prop.Soc.26: - 113-115.
- 60.- Hussey C.(1980). "In-vitro" propagation. En: Tissue Cultu -- re Methods for Plant Pathologists. Ingram D.S. -- y Helgeson J.P. (ed.).51-61. Blackwell Scienti -- fic Publications. Oxford.
- 61.- _____ (1978). The application of tissue culture to the vegetative propagation of plants. Sci.Prog.Oxf. 65:185-208.
- 62.- Jacobs W.(1979). Plant Hormones and Plant Development.Cam -- bridge University Press. Cambridge.
- 63.- Joffe A.(1971). La Reproducción de l'avocatier. En: Centre de Formation sur L'Amelioration des Techniques - Horticoles en Production Frutièrè. F.A.O.-Servi -- ce de Vulgarisation(ed.).Etat de Israel:1-11.
- 64.- Johnston C.J. y Frolich F.E.(1956). Avocado propagation. - YB.Calif.Avoc.Soc.40:89-98.

- 65.- Kadman A.(1965). Selection of avocado rootstocks tolerant to saline irrigation water. The Volcani Institute of Agricultural Research. Division of Subtropical Horticulture. Div. of Scientific Publications, Pamphlet No. 81, Rehovot.
- 66.- _____ (1976). Effect of the age of juvenile stage - avocado seedlings on the rooting capacity of their cuttings. En:Research Reports on Subtropical Fruit Trees. Division of Scientific Publications(ed.):41-42. (He.Abs.En.) The Volcaⁿi Center, Bet Dagan.
- 67.- _____ (1981). Comunicación personal.
- 68.- _____ y Ben Ya'acov A.(1965). A review of experiments on some factors influencing the rooting of avocado cuttings. YB.Calif.Avoc.Soc.49:67-72.
- 69.- _____ y _____ (1976). Selection of avocado - rootstocks for saline conditions. Acta Hort.57: 189-197.
- 70.- _____ y _____ (1980). G.A.13 avocado rootstock selection. HortScience 15(2):206.
- 71.- _____ y Gustafson C.(1970). The use of potassium salt of indole butyric acid (KIBA) in the rooting of avocado cuttings. YB.Calif.Avoc.Soc.54:96-99.
- 72.- Knight R.(1971). Comportamiento de la floración (clasificación A y B) de cultivares de aguacate. Proc.-Trop.Reg.Am.Soc.Hort.Sci.15:14-18.
- 73.- Lahav E. y Kadman A.(1980). Avocado Fertilization. International Potash Institute, Switzerland. Bull.6: 13-14.
- 74.- Lamorarca F.(1978). Los Arboles Frutales.Ed. De Vecchi. - Barcelona.
- 75.- Leal F.(1966). Enraizamiento de estacas de aguacate. Agron. Trop.16(2):141-145.
- 76.- _____ y Krezdorn A.(1964). Rooting avocado cuttings. -

- Proc.Fla.St.Hort.Soc.77:358-362.
- 77.- Lee S.K. y Rao A.N.(1980). Tissue culture of certain - tropical fruit trees. En: Plant Cell Cultures: Results and Perspectives. Sala F. y col.(ed.): - 305-311. Elsevier North-Holland Biomedical --- Press. The Netherlands.
- 78.- Lyrene P.(1981). Juvenility and production of fast-roo- ting cuttings from blueberry shoot cultures. - J.Amer.Soc.Hort.Sci.106(3):396-398.
- 79.- Malo S.(1970). Mango and avocado cultivars:present sta- tus and future developments. Proc.Trop.Reg.Am. Soc.Hort.Sci.14:74-83.
- 80.- Mensuali A.(1980).Efficacia dell'impiego dei fitoregola- tori nella radicazione. Riv.Ortoflorofruitt.It. 64:173-181.
- 81.- Mendez A.(1981). México, líder mundial en producción, - consumo y exportación de aguacate. Agro-Sínte- sis 12(6):62-66.
- 82.- Morin Ch.(1967).Cultivo de Frutales Tropicales. Libre- rías A.B.C. Lima:84-170.
- 83.- Mosella L. y col.(1980). Les conditions du microboutura- ge "in-vitro" du pêcher(Prunus persica Batsch.): influences combinées des substances de croissan- ce et de divers composés phénoliques. Physiol.-- Vég.18(4):597-608.
- 84.- Mukherjee S. y col.(1967). Recent advances in propagation by cuttings. En:Conference on Tropical Fruit -- Propagation in to Far East. F.A.O. Item 6:1-5.- New Delhi.
- 85.- Murashige T.(1974). Plant propagation through tissue cul- ture. Ann.Rev.Plant.Physiol.25:135-166.
- 86.- _____ (1977). Current status of plant cell and or- gan cultures. HortScience 12(2):127-130.

- 87.- Murashige T.(1977).Plant cell and organ cultures as--- horticultural practices. Acta Hort.78:17-30.
- 88.- Navarro L., Roistacher C.N. y Murashige T.(1975).Improvement of shoot-tip grafting "in-vitro" for - virus-free Citrus. J.Amer.Soc.Hort.Sci.100(5): 471-479.
- 89.- Németh G.(1979). Benzyladenine-stimulated rooting in -- fruit-tree rootstocks cultured "in-vitro". Z. Pflanzenphysiol.Bd.95.S:389-396.
- 90.- Ochse J. y col.(1980). Cultivo y Mejoramiento de Plan-- tas Tropicales y Subtropicales.Ed.Limusa-Wiley. México. Tomo I:469-472;683-704.
- 91.- Pierik R.(1975). Vegetative propagation of horticultu-- ral crops "in-vitro" with special attention to shrubs and trees. Acta Hort.54:71-82.
- 92.- Popenoe W.(1974). Manual of Tropical and Subtropical -- Fruits. Hafner Press.U.S.A.:9-78.
- 93.- Reinert J. y Bajaj Y.(1977). Applied and Fundamental As-- pects of Plant Cell,Tissue and Organ Culture.-- Springer-Verlag. Berlin.
- 94.- Reuveni O. y Raviv M.(1976). Foliar sprays to increase-- the rooting rate of avocado cuttings. En:Research Reports on Subtropical Fruit Trees. Division of Scientific Publications(ed.):37-39.(He.Abs.En.)- The Volcani Center, Bet Dagan.
- 95.- _____ y _____ (1976). The role of leaves in the - rooting of avocado cuttings. En: Research Reports on Subtropical Fruit Trees.Division of Scienti-- fic Publications (ed.):33-35.(He.Abs.En.). The - Volcani Center, Bet Dagan.
- 96.- _____ y _____ (1980). Importance of leaf retention to rooting avocado cuttings. J.Am.Soc.Hort.Sci.- 106(2):127-130.
- 97.- Romberger J.A. y Tabor C.A.(1971). The Picea abies shoot-

- apical meristem culture. I: agar and autoclaving effects. Amer. J. Bot. 58(2):131-140.
- 98.- Sala F. y col.(1980). Plant Cell Cultures: Results and Perspectives. Elsevier North-Holland Biomedical Press. The Netherlands.
- 99.- Samson J.A.(1980). Tropical Fruits. Tropical Agricultural Series. Longman, London:94,196-204.
- 100.- Sánchez A.(1981). "Prohíben en Uruapan la apertura de más huertas de aguacate". Excelsior, 1ra. ed., 11 de diciembre, Sec. A, p.24, col.6.
- 101.- Sen P. y col.(1967). Mist propagation of difficult-to-root fruit tree cuttings. En: Conference on Tropical Fruit Propagation in the Far East. -- Item 6:2-5. F.A.O. new Delhi.
- 102.- Schroeder C.(1955). Proliferation of mature fruit pericarp tissue slices "in-vitro". Science 122(3170): 601.
- 103.- _____ (1956). Growth of avocado fruit tissue on artificial media. YB. Calif. Avoc. Soc. 40:165-168.
- 104.- _____ (1962). High temperature tolerance of fruit-tissue. Proc. Carib. Reg. Am. Soc. Hort. Sci. 6:97.
- 105.- _____ (1968). The longevity of avocado tissue "in-vitro". YB. Calif. Avoc. Soc. 52:128-130.
- 106.- _____ (1970) The response of avocado pericarp tissue to temperature and light "in-vitro". YB. - Calif. Avoc. Soc. 54:85-89.
- 107.- _____ (1972). Apical and other responses of tissues of avocado in aseptic culture. YB. Calif. Avoc. Soc. 56:138-141.
- 108.- _____ (1974). Response of avocado flower buds and floral parts cultured "in-vitro". YB. Calif. Avoc. Soc. 58:66-72.
- 109.- _____ (1976) Responses of avocado stem pieces in tissue culture. YB. Calif. Avoc. Soc. 60:160-163.

- 110.- Schroeder C.(1977). Longevity of plant tissue cultures. YB.Calif.Avoc.Soc.61:72-74.
- 111.- _____ (1978). Effect of ultra violet radiation - on avocado fruit explants "in-vitro". YB.Calif. Avoc.Soc.62:131-133.
- 112.- _____ (1979). Etiolation and bud elongation "in-vitro". YB.Calif.Avoc.Soc.63:86-89.
- 113.- Scott T.(1972). Auxins and roots. Ann.Rev.Plant.Physiol. 23:235-258.
- 114.- Sharp W.R. y col.(1979). Plant Cell and Tissue Culture: Principles and Applications. Ohio State University Press. Columbus.
- 115.- Sharp W.R. y Larsen P.(1979). Plant cell and tissue culture: current applications and potential. En: Plant Cell and Tissue Culture: Principles and Applications. Sharp W.R. y col.(ed.):114-120.- Ohio State University Press. Columbus.
- 116.- Skene K. y Barlas M. (1981). Comunicación personal.
- 117.- Skoog F. and Miller C.O.(1957). Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissue cultures "in-vitro". En: The Biological Action of Growth Substances. Symp.Soc.Exp.Biol.(ed.)No.11: 118-131. Cambridge University Press.Cambridge.
- 118.- Solares M. (1976). Cultivo Moderno y Rentable del Aguacate. Editores Mexicanos Unidos. México.
- 119.- Sommer H. y Brown C.(1979). Application of tissue culture to forest tree improvement. En: Plant Cell and Tissue Culture:Principles and Applications. Sharp W.R. y col.(ed.):461-491. Ohio State University Press. Columbus.
- 120.- Smith S.H. y Oglevee-O'Donovan W.(1979). Meristem-tip culture from virus-infected plant material and commercial implications. En: Plant Cell and --

- Tissue Culture: Principles and Applications. Sharp W.R. y col.(ed.):453-460. Ohio State - University Press. Columbus.
- 121.- Street H.E.(1977). Plant Tissue and Cell Culture. Botanical Monographs. Vol.11. University California Press. California.
- 122.- _____ (1977). Engineering with plant cells. Interdisciplinary.Sci.Rev.2(1):62-74.
- 123.- _____ (1979). Embryogenesis and chemically induced organogenesis. En:Plant Cell and Tissue Culture:Principles and Applications. Sharp. - W.R. y col.(ed.):123-153. Ohio State University Press. Columbus.
- 124.- Thomas E. y Davey M.(1975). From Single Cells to Plants. The Wykeham Science Series. London.
- 125.- Tsai-Ying Cheng (1978). Clonal propagation of woody plant species through tissue culture techniques.Comb.Proc.Int.Pl.Prop.Soc.28:139-155.
- 126.- Weaver R.(1980). Reguladores del Crecimiento de las Plantas en la Agricultura. Ed. Trillas.México.
- 127.- Winton L. y Huhtinen R.(1976). Tissue culture of trees. En: Proceedings of Life Sciences: Modern Methods in Forest Genetics. Miksche J.P.(ed.): - 243-264. Springer-Verlag. Berlin.✓
- 128.- Woot-Tsuen Wu Leung.(1961). Food Composition Table for Use in Latin America. I.N.C.A.P.-I.C.N.N.D. - Maryland:45.
- 129.- Young L.(1961). Vegetative propagation in avocados by means of marcottage and the rooting of cuttings. YB.Calif.Avoc.Soc.45:63-66.
- 130.- Zentmyer G.A.(1975). Avocado root-rot research program. YB.Calif.Avoc.Soc.58:89-92.
- 131.- _____ y col.(1977). Resistance to Phytophthora-root-rot. YB.Calif.Avoc.Soc.61:76-79.

- 132.- Zentmyer G.(1978). Origin of root-rot resistant root-stocks. YB.Calif.Avoc.Soc.62:87-89.
- 133.- Zimmerman R.H.(1980). Fruit plants micropropagation - at Beltsville Fruit Laboratory and in North-America. Riv.Ortoflorofrutt.It.64:241-256.