



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES
IZTACALA

ENSAYO PREELIMINAR DE LA ACLIMATIZACION
A INVERNADERO DE PLANTULAS DE AGUACATE
(Persea americana, Mill) PRODUCIDAS in-vitro.

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

B I O L O G O

P R E S E N T A

SILVIA REYES MONDRAGON



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.

A MIS PADRES

RAQUEL MONDRAGON PICHARDO
SILVINO REYES SANCHEZ

A MIS HERMANOS

ANA, JOSEFINA, ANGEL, ROCIO,
SILVINO, JAIME, LETICIA, -
MAYRA, LIBRADO, GERARDO, MI
JAIL.

A CARLOS

QUE ME ALENTARON EN LOS MOMENTOS DIFICILES.

AL DIRECTOR DE TESIS:

DR. JOSE LUIS DOMINGUEZ VERA

A LOS SINODALES.

M. en C. BEATRIZ FLOREZ PEÑAFIEL

M. en C. ERNESTO AGUIRRE LEON

BIOL. ALBERTO ARRIAGA FRIAS

BIOL. JACOBO D. MARTINEZ MARCIAL

POR SU VALIOSA ASESORIA PARA LA ELABORACION DE ESTE TRABAJO.

C O N T E N I D O

INDICE DE: Tablas, esquemas, figuras y gráficas	i
I. RESUMEN	1
II. INTRODUCCION	3
Objetivos	4
III. ANTECEDENTES	5
A. El aguacate: descripción de la especie y sus caracte- rísticas botánicas y agronomicas	5
1. Descripción botánica	5
2. Clasificación botánica	6
3. Origen	7
4. Distribución y requerimientos ecológicos-agronómicos.	7
5. Importancia económica y situación actual del cultivo	9
B. Propagación	12
1. Sexual	12
2. Asexual	12
C. Propagación por cultivo de tejidos	18
1. El explante	19
2. Diseño del medio nutritivo	19
3. Condiciones ambientales	22
D. El transplante al invernadero y aclimatización de plántulas obtenidas <u>in-vitro</u>	24
1. La problemática del transplante	24
2. Aclimatización	26
a) Función de los nutrientes, factores y reguladores del crecimiento en la aclimatización	27
b) Características del sustrato y su función en la aclimatización	29

c) Condiciones ambientales atmosféricas durante la aclimatización	31
3. Métodos de aclimatización	32
a) Preacondicionamiento bajo cultivo <u>in-vitro</u>	32
b) Nebulización	32
c) Bolsa o tienda de plástico	33
d) Antitranspirantes	33
4. Cambios inducidos por aclimatización en hojas de plántulas producidas <u>in-vitro</u>	34
E. Cultivo de tejidos en aguacate	35
IV. METODOLOGIA	37
V. RESULTADOS	49
VI. DISCUSION	75
VII. CONCLUSIONES	83
VIII. SUGERENCIAS	85
IX. BIBLIOGRAFIA	86

INDICE DE:	TABLAS, ESQUEMAS, FIGURAS Y GRAFICAS.	
Tabla 1	Composición de la solución nutritiva "A"	39
Tabla 2.	Composición de la solución nutritiva "B"	40
Tabla 3.	Tratamientos con vitaminas y hormonas aplicados a plántulas poco vigorosas	47
Tabla 4.	Características de las plántulas recién producidas <u>in-vitro</u> al iniciar su aclimatización	55
Esquema 1.	Procedimiento para la aplicación de tratamientos a plántulas vigorosas y medianamente vigorosas.....	43
Figura 1.	Plántula de aguacate fuerte producida <u>in-vitro</u> ...	51
Figura 2.	Tipos de desarrollo del brote de las plántulas - al inicio de los experimentos (vigorosas).....	52
Figura 3.	Tipos de desarrollo del brote de las plántulas al inicio de los experimentos (medianamente vigorosas).....	53
Figura 4.	Tipos de desarrollo del brote de las plántulas al inicio de los experimentos (poco vigorosas).	54
Figuras 5,6.	Selección de solución nutritiva.....	59
Figura 7.	Tipos de desarrollo de brote obtenidos al final de los experimentos.....	70
Figura 8.	Desarrollo radicular de plántulas vigorosas al final de los experimentos.....	71
Figura 9.	Desarrollo radicular de plántulas medianamente vigorosas.....	73
Figura 10.	Correlación de desarrollo entre el brote y el sistema radicular.....	74

Gráfica 1.	Desarrollo del brote en plántulas vigorosas y medianamente vigorosas durante los experimentos de aclimatización	60
Gráfica 2.	Crecimiento del brote en las plántulas poco vigorosas durante los tratamientos de aclimatización	61
Gráfica 3.	Tipos generales de desarrollo de brote durante aclimatización de plántulas de aguacate -- fuerte obtenidas de cultivo <u>in-vitro</u>	64
Gráfica 4.	Número total de hojas durante el curso de la aclimatización de plántulas producidas - - - - <u>in-vitro</u>	65
Gráfica 5.	Incremento del ancho foliar durante aclimatización de plántulas de aguacate fuerte provenientes de cultivo <u>in-vitro</u>	66
Gráfica 6.	Incremento de la longitud foliar en plántulas producidas <u>in-vitro</u> durante su aclimatización	67

1. RESUMEN.

Para el cultivo comercial del aguacate (Persea americana, Mill) la propagación por cultivo de tejidos es una alternativa que permitiría obtener patrones clonales con características ventajosas (11, 16, 27, 28, 29, 49).

En la actualidad se ha logrado con éste método la foliación y enraizamiento de estacas nodales etioladas de aguacate Fuerte, a partir de su cultivo en medios nutritivos específicos (4, 49).

Sin embargo el uso de tal metodología aun presenta problemas y uno de los aspectos por resolver consiste en evitar los daños ocasionados en la plántula obtenida in vitro al sacarla del frasco de cultivo y trasladarla al invernadero, ya que, se observa la pérdida de turgencia y la detención de su crecimiento (6, 7, 76, 79).

Por lo tanto en éste trabajo se buscó el establecimiento de un método para lograr la aclimatización de dichas plántulas, que incluye: a) una adaptación al desarrollo bajo condiciones de humedad relativa baja (la del medio ambiente normal), b) el reinicio del crecimiento y c) su continuación. Además de este objetivo se trató de acelerar el crecimiento de las plántulas. Todo esto al proporcionar el sustrato y ambiente que les fueran adecuados así como al aplicar nutrientes minerales y sustancias orgánicas necesarias.

Para ello se realizó la producción de estacas nodales foliadas y enraizadas de aguacate Fuerte las que posteriormente fueron transplantadas al invernadero para iniciar la etapa de aclimatización.

Los resultados señalan que 1) solamente se pudo producir una cantidad limitada de plántulas con diferentes tipos de vigor para efectuar los estudios de aclimatización; 2) fué posible detectar que la aclimatización como proceso general dependió de la eliminación de las condiciones ambientales extremas; 3) el reinicio del creci-

miento se dio habiendo usado un sustrato que resultó conveniente y administrando una solución de nutrientes minerales (diseñada específicamente para aguacate), 4) se logró la continuación del crecimiento aunque no su aceleración sin poder detectar la importancia de la tiamina, biotina y reguladores del crecimiento en ello, 5) se obtuvo un rendimiento de sobrevivencia cercano a 67%, considerando al total de plántulas sometidas en aclimatización; 6) al final del tiempo de experimentación se detectaron plántulas con diferentes grados de desarrollo, observándose que las más avanzadas contaron con un sistema radicular simétrico y vigoroso (en cantidad, longitud y ramificación).

Por último es necesario destacar que a pesar de la naturaleza preeliminar de éste trabajo y de las limitantes para la obtención de los resultados, esta es la primera vez que se reportan resultados positivos a nivel mundial de la aclimatización de plántulas de aguacatero producidas in - vitro.

II.- INTRODUCCION.

El aguacate (Persea americana, Mill) es una de las frutas tropicales más apreciadas debido principalmente a sus cualidades nutritivas y organolépticas (54, 69). Anteriormente se le consideraba a nivel mundial un fruto poco conocido (1), aunque en la actualidad su cultivo se ha extendido a países de clima tropical, subtropical y mediterráneo de todo el mundo, entre los que destacan: Estados Unidos (California y Florida), Israel y Sudafrica, donde se le da un carácter económico importante (1, 25, 69).

México es uno de los países de mayor índice productivo de aguacate (37, 74) pero a pesar de ello es incapaz de competir con el mercado mundial dado que la producción es en su mayoría de tipo criollo y el volumen de la misma es irregular (4, 37, 74). Sin embargo en los últimos 16 años se ha tenido la tendencia a la introducción de plantaciones con variedades mejoradas de entre las que destacan Hass, Fuerte, Bacon, Booth y otros, lo que va acorde con un mejor futuro productivo y comercial (37, 49).

Otros problemas que dificultan el cultivo del aguacate son las condiciones climáticas extremas como heladas, granizadas, etc.. Asi como suelos calcáreos de características desfavorables (abundantes en México) como los salinos, pesados, etc. (a los que es altamente susceptible el aguacatero), y al ataque de diversas enfermedades, tales como la ocasionada por el hongo Phytophthora cinnamomi que provoca la pudrición de la raíz, lo cual en conjunto limita el área de cultivo y reduce en forma considerable la producción (29, 54, 82, 83).

Se ha observado que dentro de esta especie hay plantas que muestran diferente sensibilidad o resistencia a alguna de estas condiciones (1, 11, 48, 83), por lo que una de las maneras de solucionar estos problemas es a partir de la propagación vegetativa de plantas seleccionadas que reúnan el mayor número de características con resistencia o tolerancia y que puedan ser utilizables como porta-

injerto (16, 27, 36, 38, 45, 48). Para ello desde 1980 en la Comisión Nacional de Fruticultura se ha venido desarrollando una metodología usando material vegetativo de la variedad Fuerte, para su posible aplicación futura en la propagación vegetativa por cultivo - - in vitro de patrones de aguacate con características ventajosas, dada la dificultad de propagarlo por técnicas más convencionales (11, 16, 24, 27, 28, 29, 38, 43, 45, 49, 63, 81). De esta manera ha sido posible obtener plántulas de aguacate, las cuales al sacarse del frasco de cultivo y trasladarse al invernadero sufren deshidratación excesiva, pudiendo a la vez disminuir ó detener totalmente su crecimiento, produciéndose a corto ó a largo plazo su muerte prematura - (4, 49). Esto se debe posiblemente a la tensión que se establece en la plántula por el cambio ambiental, lo cual se explica por los desarreglos fisiológicos y estructurales que se desarrollan en plántulas que provienen de cultivo de tejidos (6, 7, 51, 79). por lo que se plantean los siguientes objetivos:

- 1.- Producir en laboratorio plántulas de aguacate Fuerte, a partir del cultivo in - vitro de estacas nodales etioladas.
- 2.- Lograr la aclimatización de las plántulas obtenidas in - vitro a condiciones de invernadero, promoviendo a la vez el reinicio y aceleración del crecimiento, con el uso de un ambiente y sustrato adecuado así como con la adición de nutrientes minerales y de sustancias orgánicas (vitaminas y hormonas).
- 3.- Caracterizar mediante estudios de desarrollo (del brote principalmente) los tipos de plántulas obtenidas al final de los experimentos.
- 4.- Estimar el tiempo necesario para obtener una plántula que sea injertable.
- 5.- Aclimatización y enraizamiento simultaneo de estacas foliadas - producidas in vitro, bajo condiciones de nebulización . en invernadero.

III: - ANTECEDENTES.

A. EL AGUACATE: DESCRIPCION DE LA ESPECIE Y SUS CARACTERISTICAS BOTANICAS Y AGRONOMICAS.

1: - DESCRIPCION BOTANICA.

El aguacate es una planta leñosa, perenne de aspecto vigoroso; que alcanza de 8 a 12 m. de altura, su tronco es rugoso y tiende a crecer en forma recta, mientras las ramas tienden a encorvarse hacia el suelo. Las hojas se disponen de manera alterna y presentan pecíolo corto, sin estípulas; son enteras, peninervas, lisas y coriáceas, cuando jóvenes son pubescentes y rojas, volviéndose verdes al madurar; la forma varia desde ovales, lanceoladas ó elípticas, con longitudes de hasta 40 cm.. El aparato radical esta representado por una raíz columnar primaria que se ramifica en haces secundarios y terciarios horizontales que pueden profundizar hasta 40 m.. El ápice esta cubierto por una caliptra o pilorriza, pero al aparecer esta desprovisto total o parcialmente de pelillos absorbentes, por lo que la absorción se realiza a través de las zonas de crecimiento longitudinal que en el sucesivo acrecentamiento apical se alargan en línea radial y acaban por tuberificarse, constituyendo la llamada exodermide que sirve para proteger el parénquima cortical. Esta carencia de pelos radiculares (como en muchos árboles tropicales) lo hace sumamente sensible a fluctuaciones de humedad del suelo (25, 59, 69). Las flores se arreglan en inflorescencias paniculares axilares o terminales; son trimeras, de color crema o amarillo verdoso. Contienen 10 estambres (pero solo 9 son funcionales) cada uno con 4 anteras. Los estambres se insertan abajo o al rededor del ovario, el cual es súpero con un carpelo y un óvulo (25, 69).

El fruto es una baya de forma y tamaño variable desde piriforme a esférico u ovalado, con el color del epicarpio que va desde verde claro a verde oscuro y de violeta a negro. La pulpa del fruto es --

de color amarillo verdoso casi inodoro y de sabor agradable, tiene aspecto grasoso y rodea a una semilla envuelta por 2 membranas delgadas, a su vez la semilla esta constituida por 2 cotiledones en cuyo interior se localiza el embrión (1, 25, 69). La polinización es cruzada debido a que los órganos reproductores maduran en diferente tiempo (1, 12, 25, 69).

2.- CLASIFICACION BOTANICA.

La clasificación botánica en la que se incluyen todos los aguacates cultivados es (1, 3, 49, 80):

División	Espermatophyta
Subdivisión	Angiosperma
Clase	Dicotiledónea
Orden	Ranales
Suborden	Magnolinas
Familia	Lauracea
Género	<u>Persea</u>
Especie	<u>P. Americana</u> , Mill.

El género Persea consta aproximadamente de 250 especies, de las cuales la más importante comercialmente es la especie americana en la que se incluyen 3 variedades que son: drymifolia, americana y guatemalensis (3, 31, 41, 49). Cabe hacer notar que a éste respecto existen diversos criterios de clasificación en los que se considera más de una especie (3, 31, 80), siendo el más aceptado el que se mencionó anteriormente.

También dentro de éste mismo género se incluyen algunas otras especies cuya importancia radica en su posible uso como patrones resistentes a enfermedades como son: Persea Floccosa, P. Longipes, P. Indica, etc. aunque al parecer y hasta el momento, sin resultados positivos, ya que una de las desventajas que se han encontrado, es su incompatibilidad en el injerto (82,83).

b) CULTIVARES.

7

Existen numerosos cultivares (cvs) pero son realmente pocos los que tienen utilidad económica importante.

La elección del cultivar en una plantación incluye múltiples aspectos: clima, características del árbol y la calidad del fruto, - así como el tipo de flores, época de cosecha, etc. (1, 25). Algunas de las más importantes comercialmente son: Fuerte, Hass, Bacon, Anaheim, Mc Arthur, Ettinger, Nabal, Rincon, Zutano y Reed.

De éstas, la que tiene más demanda mundialmente es la Fuerte, - la cual proviene de la hibridación natural de un aguacate mexicano y un guatemalteco. La pulpa de este fruto es de calidad excelente, - carece de fibra y tiene un contenido alto de aceite (18 al 26%), el fruto es de tamaño medio y su peso oscila entre los 200 y 350 gr. (1).

3.- ORIGEN.

El aguacate es un árbol cuyo fruto era conocido con el nombre - mexicano de ahucatl y de donde se han originado los nombres usuales - con que actualmente se le conoce. El término aguacate es usado desde México hasta Costa Rica y en las Antillas de habla hispana, mientras los ingleses y norteamericanos le llaman "avocado" (1, 25, 69). - El lugar preciso donde se originó este fruto ha creado controversias, aunque en general se cree que proviene del centro y sur de América y aún más probablemente de México (25, 54, 59, 69, 74).

4.- DISTRIBUCION Y REQUERIMIENTOS ECOLOGICO - AGRONOMICOS.

La distribución del aguacate es bastante amplia, abarcando desde los 32° latitud norte a 36° latitud sur, en donde se localizan países de clima tropical, subtropical y mediterráneo como son: México, - Guatemala, Colombia, Venezuela, Perú, Argentina, Antillas, Brasil, - Chile, Sudafrica y Africa Septentrional, Filipinas, Polinesia, Australia, Tahiti, Isla Madera, Canarias, India, Argelia sur de España, Israel, California y Florida en E.U. (12,25,54).

a) GRUPOS ECOLOGICOS.

El aguacate se divide básicamente en 3 grupos o razas ecológicas determinadas por W. Popenoe en 1920 y son: la mexicana, antillana y guatemalteca; las que a su vez corresponden respectivamente con las variedades de P. americana mencionadas antes (3). Estos grupos conservan las características anatómicas y morfológicas del género, pero se distinguen básicamente por lo siguiente:

MEXICANA.- Es la más resistente al frío, se desarrolla en altitudes que van de 1500 a 2200 msnm; se caracterizan por tener hojas pequeñas que al tallarlas con los dedos despiden un aroma anisado; el fruto es pequeño, de sabor delicado y exquisito, de cáscara delgada y lisa reduciendo ésto último sus posibilidades comerciales (1, 25, 54, 69).

GUATEMALTECA.- A diferencia de la raza mexicana es menos resistente a bajas temperaturas y se ubica entre los 500 y 1500 msnm; son de hojas y frutos medianos éstos últimos de buen sabor y de epidermis gruesa, dura, quebradiza y superficie granulosa. Su calidad nutritiva es menor que la presentada por los frutos del grupo mexicano (1, 25, 54, 69).

ANTILLANA.- Es la menos resistente a frío se adapta desde altitudes que van del nivel del mar hasta los 500msnm; al igual que el grupo anterior, las hojas son grandes, el fruto generalmente es grande con cáscara de grosor intermedio pero menos granulosa que el de la raza guatemalteca; además de presentar un sabor ligeramente dulce, que no siempre es aceptado en el mercado; su valor alimenticio es parecido al grupo guatemalteco (1, 25, 54, 69).

* Este frutal se desarrolla generalmente entre altitudes de 0 a 1800 msnm a temperaturas óptimas de 25 - 26°C. y mínima de 7 a 8°C. bajo un índice de humedad relativa del 65 al 75% y una precipitación pluvial de 800 a 2000 mm. anuales.

Los factores climáticos en el aguacate son muy específicos, ya que los excesos o la escases de éstos, influyen de manera determinante en la floración y fructificación, pudiendo disminuir por tanto la calidad y cantidad del fruto (1, 25, 69).

En cuanto a sus requerimientos edáficos, se prefieren suelos - que tengan topografía plana o ligeramente accidentada para que se - faciliten los trabajos culturales, fitosanitarios y de cosecha; con suelos que alcancen profundidades comprendidas entre 0.80 y 3.0 m; - neutros o ligeramente ácidos (5.5 - 8.0). Además son convenientes los suelos ligeros como los llamados francos o migajones arenolimo- - sos o arcillo - arenosos, que esten bién drenados, ya que son extre- - madamente sensibles a los suelos arcillosos que se encharcan facil- - mente, los cuales promueven la asfixia de las raíces o bien el desa- - rrollo de enfermedades como la pudrición de la raíz, provocada por- - por el hongo Phytophthora cinnamomi (Rands) (1, 25, 69).

Dado que el aguacate es una planta de crecimiento profuso re- - quiere de gran cantidad de nutrientes fácilmente disponibles, pues- - una deficiencia nutricional principalmente de fósforo provoca la - - producción alternada; así como excesos de algunas sales como son - - las de sodio y magnesio y caliza les son muy perjudiciales (1, 50, 69).

5.- IMPORTANCIA ECONOMICA Y SITUACION ACTUAL DEL CULTIVO.

La importancia de ésta especie se demuestra principalmente por su demanda, lo cual es explicable dadas sus cualidades organolépticas y nutricionales. Este fruto es de sabor agradable, ligeramente sa-

lado cuyo valor nutritivo puede compararse al del plátano y tiene un valor energético similar al de la carne. Además contiene vitaminas hidrosolubles que faltan en general a otros frutos (A, B, D, E, C, y K). En cuanto a su contenido de proteínas, permite clasificarla en tre los más ricos (25, 54, 69).

Es por éstas cualidades que el cultivo del aguacate se ha extendido cada vez, a más partes del mundo (15). En general los lugares donde se cultiva están clasificados por zonas productoras que se resumen en varios grandes grupos (15): Grupo Centro y Sudamericano: México, Antillas, Venezuela, Guatemala, Colombia, Perú, Brasil y Argentina.

Grupo Norteamericano: Florida y California en E.E.U.U..

Grupo Africano: Costa de Marfil, Congo, Kenia y Camerún.

Grupo Mediterráneo: Argelia, Israel, Sur de España, Islas Canarias, Grecia, Sicilia y Córcega.

Grupo Asiático: Indochina, Hawaii e India.

Del primer grupo, México es uno de los países de más alta productividad ya que el aguacate se cultiva prácticamente en todas las entidades federativas, siendo el de mayor producción Michoacán (en Tacambaro y Uruapán) (32,75).

Anteriormente la producción que se generaba provenía de material criollo, el cual era en su mayoría consumido internamente, pero en la actualidad se ha incrementado la plantación de aguacates de variedades mejoradas como son la Fuerte, Hass, Bacon, Booth 7, Booth 8, Lula, Choquette y Waldin (37, 74).

A pesar de ello algunos factores han impedido el aumento de la producción a volúmenes exportables como son (15,37,59):

- Ubicación del cultivo en lugares inadecuados, donde no hay concordancia de las exigencias climáticas del frutal y las predominantes del lugar; malas características del terreno (suelos pesados, cal-

cáreos, etc.).

- Pérdidas ocasionadas por el ataque de enfermedades y plagas.
- Irregularidad de volúmenes cosechados.
- Desconocimiento de la tecnología más apropiada para producir fruta de exportación (técnicas frutícolas, empaque, transporte, etc).
- Falta de organización para hacer frente a exigencias de los compradores (buena calidad y precio).

En general se requiere para que México pueda competir con el -- mercado mundial dar solución a éstos problemas, siendo uno de los - que demandan una rápida solución el de la pérdida de plantas por el ataque de enfermedades como la llamada pudrición de la raíz que causa pérdidas apreciables, así como tratar de abrir el cultivo del - - aguacatero a suelos poco convenientes esto es, después del desarrollo de patrones resistentes o tolerantes ya sea a enfermedades y/o - suelos calcáreos, pesados, etc. (9, 11, 16, 34, 63, 81).

B. Propagación.

Existen dos formas de multiplicación o formación de nuevos individuos de árboles frutales: sexual o asexual (1).

1.- Sexual.

La propagación sexual se realiza a través de semilla y asegura gran variabilidad debido a hibridaciones naturales ocasionadas por su origen heterocigoto de manera que da lugar a plantas que varían en diferentes aspectos como en la calidad del fruto, cantidad, época de cosecha, etc.. Son utilizados para mejoramiento genético, seleccionando los mejores árboles en cuanto a: desarrollo, precocidad, productividad y resistencia a enfermedades, originando con ello la detección de variedades de calidad. A estos árboles propagados por semilla se les conoce como árboles francos y se les utiliza casi siempre como portainjertos francos, en el manejo de algunas especies como: aguacate, mango, etc. para injertar sobre ellas las variedades comerciales, ya que cuentan con un sistema radicular pivotante de gran penetración y expansión en el suelo (10, 44, 59).

2.- Asexual.

La propagación asexual o vegetativa tiene por objeto a partir de variedades mejoradas la producción de plantas nuevas que repliquen las características genéticas de la planta que le dio origen, de manera que todos los árboles propagados de una misma planta constituyen lo que se llama un clon que cuenta con caracteres fenotípicos y genotípicos idénticos. Excepción a ésta regla la constituyen las mutaciones varietales, que cuando mejoran la calidad de los árboles o de los frutos dan lugar a nuevas variedades de gran interés comercial (1, 10, 59). Este tipo de propagación se realiza a partir de porciones vegetativas de las plantas tales como tallo, raíces, etc. pues se considera que cualquier órgano tiene capacidad de regeneración. Se realiza a partir de diferentes métodos como son: por hijuelo, acodo, injerto, estacado, etc. Siendo estos 2 últimos de los más utilizados en fruticultura, y principalmente el de injerto en aguacate (1, 10, 13, 56).

- **Injerto.**- Es el procedimiento normal de propagación de los árboles frutales y consiste en la unión íntima que se efectúa entre 2 partes vegetales para que suelden y permanezcan unidas dependiendo una de la otra, y continúen su crecimiento (10, 17). Una de las partes es el patrón o portainjerto, que es el responsable del anclaje y adaptación a las condiciones del suelo, mientras la otra, da lugar a la parte aérea responsable de la producción de fruta y que puede derivarse del injerto de una yema, vareta o pua, de la variedad seleccionada (10, 40).

Este tipo de propagación es utilizado entre otras cosas para provocar la enanización del árbol, acompañado de precocidad en la fructificación; para aprovechar cierta resistencia del sistema radicular del patrón a algún elemento desfavorable del suelo y al que es susceptible la variedad que se quiere cultivar; vigorizar árboles, etc. - - (10, 20, 21, 59).

De ésta manera se tiene la posibilidad en fruticultura de formar individuos seleccionados por sus características y comportamiento tanto de la parte aérea, como de la subterránea, pero está restringido solamente a algunas especies frutales, ya que no todas son fáciles de propagarse. Tal es el caso del aguacate en el que la parte aérea se desarrolla a partir de una vareta obtenida de una variedad seleccionada (43, 81), la que se injerta sobre una planta proveniente de semilla por medio de diferentes métodos (1, 25). Esto permite en cuanto a la copa se refiere tener plantas uniformes (43, 48), mientras que el sistema radical dado el origen que tiene presenta una constitución genética variable, dando lugar a patrones de comportamiento heterogéneo (81).

- **Estacado.**- Una de las maneras de producir patrones de comportamiento homogéneo es a partir de la propagación por estacas y que consiste en la regeneración del órgano faltante, es decir, en estacas de tallo y estacas de tallo con yema y hoja, es necesario que se forme un sistema radical; en las estacas de raíz, debe iniciarse el desarrollo -

del sistema caulinar, etc.. Esta regeneración es posible ya que muchas células tienen la capacidad de retornar a la condición meristemática y originar nuevos sistemas de tallo, raíz o ambos (40).

Los árboles frutales suelen propagarse a partir de estacas de tallo y dependiendo del tipo de madera: dura (caducifolios, perennes de hoja angosta), semidura o suave, tienen mayor o menor facilidad para el enraizamiento (17), siendo esto poco posible para la propagación de diversas especies frutícolas y en especial del aguacate (11). Algunas ventajas que se podrían obtener por el uso de esta técnica en especies de importancia comercial entre los que destacan el aguacate, es la producción de patrones o portainjertos clonales que exhiban características convenientes como es la resistencia o tolerancia a condiciones desfavorables del suelo, tales como presencia de patógenos, como el hongo Phytophthora cinnamomi, Rands, que ataca a la raíz ocasionando su pudrición; excesiva cantidad de material calcáreo, alcalinidad, mal drenaje, etc. (10, 13, 16, 36, 48).

Algunos aspectos que se recomienda considerar para mejorar el enraizamiento de estacas de aguacate son:

- Grupo ecológico.- Se ha observado que la dificultad en el enraizamiento varia dependiendo del grupo ecológico al que correspondan las plantas, de manera que las más fáciles de enraizar son las del grupo ecológico mexicano, les siguen los del grupo guatemalteco y al ultimo se encuentran las del grupo antillano (81).

- Edad de la planta y la etiolación.- Se ha mencionado que es más probable que enraicen estacas que provienen de plantas en estado juvenil que en estado maduro (11, 18, 32, 48, 81), debido posiblemente a que tales estacas jóvenes carecen de la envoltura de tejido lignificado (presente en estacas de plantas maduras), que podría actuar como una barrera mecánica a la emergencia de las raíces (40).

Así también se ha reportado que la etiolación o sea el crecimiento de un tejido en ausencia de luz (27, 28, 29) es conveniente para el enraizamiento de estacas de aguacate difíciles de enraizar (24, - 27, 28, 29, 81) porque es un tejido que carece de lignificación significativa, o bien porque hay inhibición o producción de alguna sustancia que esta íntimamente relacionada con la producción de raíces y que podría favorecer éste proceso (81).

Desde el punto de vista anatómico se han realizado algunos estudios que muestran que los anillos continuos de esclerénquima situados entre el xilema y el floema, y exteriores al punto de origen de las raíces adventicias, pueden constituir una barrera anatómica para el enraizamiento. En el caso del aguacate se ha observado que tanto los tallos etiolados como los tallos jóvenes presentan los haces de fibras con pocas o sin conexiones de esclereidas facilitando el enraizamiento, mientras que en los tallos con características contrarias los anillos de esclereidas actúan como una barrera para la emergencia de la raíz (33).

- Retención de las hojas.- Se ha mencionado que la capacidad de enraizamiento esta íntimamente ligado con el número de hojas retenidas, pudiéndose explicar por diferentes caminos: la acumulación de carbohidratos en la base de la estaca gracias a la fotosíntesis realizada por las hojas, la acción de las hojas como fuente de factores nutricionales y de regulación que podrían intervenir en el proceso del enraizamiento (61).

- Temporada.- Parece ser que la estación en la que se tome la estaca es importante para que se de el enraizamiento lo cual esta vinculado con la posibilidad de que en diferentes estaciones existan promotores o inhibidores endógenos para éste proceso (1, 45).

- Hormonas.- En diferentes trabajos se ha hecho uso, para incrementar el enraizamiento, de hormonas del tipo auxínico tales como: -----

el ácido Naftalenacético (ANA), el ácido Indolbutírico (AIB), - ácido Indolacético (AIA), sales potásicas del ácido Indolbutírico (KAIB), etc. que se aplican comunmente a manera de una pasta (hormona + lanolina) sobre la base de la estaca o bien se sumerge la estaca durante unos minutos o segundos en una solución hormonal concentrada; posteriormente la estaca es mantenida bajo nebulización - hasta su enraizamiento (36, 38, 45, 48, 67, 81).

- Transmisión.- Algunas evidencias indican que la capacidad de enraizamiento de una planta puede ser transmitida a otra que carece - o tiene poca capacidad para lo mismo por medio de la unión (como - por injerto de aproximación) de ambas (67).

- Acumulación de carbohidratos.- El uso de técnicas vegetativas - como el anillado, acodo, etc. en el lugar donde se tomará la estaca, interrumpe la circulación de la savia, permitiendo la acumulación de carbohidratos, lo que al parecer influye en la producción de raíces (29, 81).

Generalmente en el enraizamiento de estacas de aguacate (método en perfeccionamiento y aún sin aplicación comercial) estos fundamentos se consideran en conjunto para aumentar las probabilidades de éxito (24).

En general la mayoría de las variedades de aguacate son difíciles de enraizar por métodos convencionales, aún considerandose las recomendaciones antes expuestas, tal es el caso de la variedad Fuerte en la que su propagación por estacas presenta grandes dificultades. Se ha trabajado con diversos métodos para lograr su enraizamiento:

Eggers y Halma en 1936 obtuvieron éxito en el enraizamiento de estacas provenientes de aguacate mexicano pero fallaron al aplicar su método de estacas de Fuerte, por lo que llegaron a la conclusión

de que la propagación de esta variedad por estacado no es factible. También se ha hecho uso de macerados de raíz de aguacate de la variedad mexicana, (genotipo fácil de enraizar) aplicando en diferentes concentraciones en la base de estacas de Fuerte, para la producción de raíces, pero se ocasionó daño sin haber formación de raíces; con el uso de hormonas de tipo auxínico (ANA, IAA) en estacas foliadas de Fuerte, aplicadas en forma de pasta se causan daños en altas concentraciones, se produce callo o bien no hay ninguna respuesta, de manera que no se han reportado resultados relevantes y es un método aún en estudio.

Hass en 1937 obtuvo resultados positivos al injertar una yema de Fuerte sobre una porción de raíz de aguacate mexicana joven, observándose la emisión de raíces de la base de la yema.

Guillespie reporta resultados positivos al usar además de material juvenil, auxinas sintéticas (como 2, 4-D) rociadas en el área foliar para impedir la caída de las hojas.

El problema con estos dos últimos reportes es que el rendimiento es bajo e insuficiente como para intentar establecer un método comercial.

Otra vía de propagación vegetativa que es utilizada en especies frutales de difícil enraice como lo es el aguacate, es el cultivo de tejidos.

C.- PROPAGACION POR CULTIVO DE TEJIDOS.

El cultivo de tejidos consiste en el cultivo en condiciones asépticas de diversas porciones de plantas en un medio nutritivo artificial, complementado con vitaminas, hormonas y fuentes de carbono; en donde se logrará el desarrollo y producción de nuevas plantas (2,15, 58).

Generalmente es utilizada cuando (2, 15, 58):

- La propagación vegetativa por otros métodos no es posible.
- Se requiere un número elevado de plantas de un genotipo seleccionado en un tiempo corto.
- Se pretende producir plantas libres de patógenos.

Pudiéndose obtener otras ventajas como las siguientes (2,15,58):

- Producción de productos naturales o farmacéuticos.
- Mejoramiento genético.
- Preservación de germoplasma valioso.

Los inconvenientes que se pueden presentar son (2, 15, 58):

- Costo alto (principalmente en las primeras etapas).
- Tendencia al origen de aberraciones cromosómicas (por el involucramiento de numerosas divisiones celulares mitóticas en forma acelerada).
- Problemas en la aclimatización de las plántulas transplantadas - - (principalmente en leñosas).

Este tipo de propagación es generalmente dividida en una serie de fases que en forma general se dirigen a: Mantener el lote de planta madre en condiciones higiénicas; establecer el cultivo en condiciones asépticas; mantener e incrementar el lote cultivado, promoviendo -

el desarrollo de yemas y su rápida multiplicación; elongación de la yema hasta desarrollarse en un brote enraizable; y por último el enraizamiento del brote (19).

Para lograr el éxito del cultivo in - vitro en cada una de estas fases, se deben considerar los siguientes aspectos:

1. - El explante.- elección (tamaño, momento de cosecha.- etc.) y desinfección (con hipoclorito de calcio ó sodio, etanol,- etc.) (2, 26, 38).

2.- Diseño del medio nutritivo.- que en general deberá estar constituido por componentes tales como:

Sales minerales en composición y cantidades específicas dependiendo de la especie y del objetivo perseguido (2, 58).

Carbohidratos que proporcionan la fuente de carbono (sacarosa ó - glucosa) (2, 58).

Fuente de nitrógeno como aminoácidos, hidrólizado de caseína que tiene la ventaja de proporcionar nitrógeno integrado en una mezcla de - aminoácidos (58).

Vitaminas se adicionan por ser compuestos necesarios para el metabolismo normal y se utilizan en cantidades catalíticas, actuando como parte de sistemas enzimáticos como cofactores ó coenzimas (71). - Algunas de las vitaminas esenciales en las plantas superiores son:

- Tiamina, es un componente esencial de las coenzimas que catalizan la oxidación del ácido pirúvico en el ciclo respiratorio. Es sintetizada en las hojas de donde se traslada a la raíz, siendo por lo mismo esencial en el desarrollo de las raíces cortadas -

(55). Algunas investigaciones sostienen que la adición de tiamina al menos en plantas intactas no aumenta el crecimiento. Por otra parte se ha podido determinar que el uso tanto de tiamina como de biotina aceleran el crecimiento de la raíz (55) y en algunas especies también el desarrollo del tallo, posiblemente porque éste último tiene considerable dificultad en la síntesis de ambas sustancias (68). También se sabe que estas vitaminas junto con algunas otras participan en la nutrición y asimilación aumentando la cantidad de protoplasma, pero no afectan la estructura de la planta (55, 68).

- Riboflovina, es el grupo prostético de la enzima respiratoria citocromooxidasa. Actúa también en la destrucción del ácido Indolacético (AIA), sufre oxidación reversible a la luz brillante, la riboflavina oxidada se reduce a expensas del AIA. También es necesaria para el crecimiento de las raíces y funciona reduciendo la cantidad de auxina del sistema radical (55).
- Niacina, tiene un papel importante en la respiración porque es componente de las coenzimas I y II (difosfo piridín-nucleótido y trifosfo piridín-nucleótido), que son grupos portadores de hidrógeno del proceso respiratorio (55).
- Acido ascórbico, es esencial interviniendo como regulador en los sistemas de oxidación-reducción; se utiliza en el medio nutriente como antioxidante (55).
- Algunas otras vitaminas que también son usadas son la piridoxina ácido nicotínico, colina, ácido fólico, ácido pantoténico, etc. (2, 58).

Hormonas son compuestos químicos capaces de intervenir en pequeñas cantidades en la regulación del metabolismo, activando o deprimiendo algún proceso del desarrollo y tienen por particularidad el actuar en un lugar distinto de donde se produce (62). Son utilizadas -

para regular diferentes funciones celulares, entre las que destacan - la división, alargamiento y diferenciación celular. Las más importantes en la diferenciación y crecimiento del tejido son:

- Las auxinas, las cuales intervienen principalmente en el alargamiento celular, incremento en la respiración (que repercute en un intenso metabolismo), etc. (5, 42, 55, 62). Generalmente son utilizadas para la inducción radicular en la propagación vegetativa - por estacas. Las auxinas difieren en su efectividad ordenándose - en base a ello de la siguiente manera: AIA (ácido indolacético) - AIB (ácido indolbutírico) ANA (ácido naftalenacético) AMcP (ácido 2-metil, 4-cloro fenoxiacético) 2, 4-D (ácido 2, 4-diclorofenoxiacético), etc., (2).
- Las citocininas, cuya principal función es activar la división celular, inducir la actividad de amilasas y proteasas, y la síntesis de tiamina y auxina (2, 42). Las más usadas en cultivo de tejidos son: BA (benziladenina), 2iP (γ, γ dimetilamino 6 purina), Cinetina (furfuraladenina) y Zeatina. Su efectividad depende - de la especie de planta utilizada (2).
- Las giberelinas constituyen un grupo numeroso de sustancias, siendo el GA_3 (ácido giberélico) el más utilizado en cultivo de tejidos; intervienen en el alargamiento de la planta, en la producción de amilasa (que pone la energía a disposición de la célula), y - en ocasiones en la formación de raíz (2, 40, 42, 58, 62).

Otras sustancias que no son hormonas pero que también intervienen en la regulación del crecimiento son el ácido abscísico (ABA) y el etileno (62).

Generalmente la intervención de todos estos compuestos en el crecimiento es a partir de interacciones que pueden ser de tipo antagónico sinérgico ó de competencia, los que se llevan a cabo en las diferentes actividades fisiológicas que se desarrollan en las plantas.

De primer importancia son las auxinas y citocininas, ya que en general el modelo de desarrollo del tejido depende de las concentraciones relativas de las mismas. Por ejemplo, en el caso de la promoción de brotes y raíces se considera que una concentración baja de auxinas y alta de citocininas promueve la formación de brotes, mientras que lo contrario induce el desarrollo radicular (58). En el caso de la elongación del brote se ha observado que en plantas intactas las giberelinas, en comparación con las auxinas, tienen un mayor efecto en el crecimiento del brote, pero en secciones cortadas de tallos las auxinas tienen más efecto; sin embargo en algunos tejidos una combinación de las dos tiene un efecto sinérgico produciendo más elongación que cada una sola. Una acción antagónica común es el efecto exógeno del ácido abscísico (ABA) que se contrapone con el efecto exógeno del ácido indolacético (AIA) en la abscisión de las hojas y frutos (42).

Complejos naturales, como son la leche de coco, extracto de malta y de levadura, etc., pero su uso es restringido pues no se conoce su composición exacta la cual varía según el grado de madurez, en el caso de usar frutos (58).

Otras consideraciones: En ocasiones pueden usarse otras cosas como:

- Agar, actúa como agente gelificante cuando se requiere medio sólido, o bien cuando el medio es líquido se utiliza como soporte papel filtro.
- Carbón activado, usado como absorbente de compuestos fenólicos, alcaloides, etc..
- El pH, es un factor fisicoquímico crítico cuyo valor puede influir en la respuesta del tejido (58).

3.- Condiciones ambientales.- Otro aspecto que influye en el desarrollo del tejido, son las condiciones ambientales en las que

se incluyen parámetros elementales como:

Intensidad luminosa, debiéndose considerar que los requerimientos in vitro no son los mismos que bajo condiciones de autotrofia, ya que - en éste caso la fotosíntesis no es necesaria (excepto en la última etapa).

Temperatura, generalmente es controlada en un nivel constante, pero se ha observado que la variación estacional o nocturna puede ser benéfica en diferentes especies.

Humedad relativa, se mantiene constante (en un nivel cercano al - - 100% generalmente) dado que el frasco de cultivo permanece cerrado; éste hecho puede ser negativo para posteriores etapas del desarrollo (58).

D.- El trasplante al invernadero y aclimatización de plántulas obtenidas in vitro.

1.- La problemática del trasplante.

Después que se ha logrado la obtención de una plántula por cultivo de tejidos el paso siguiente es su trasplante a un área de condiciones cercanas a las del ambiente normal, idealmente se esperaría - que la plántula se reajustara a éste nuevo medio ambiente sin problemas pero generalmente se produce restricción en su crecimiento (52).

Se ha observado que el comportamiento que sigue la plántula al realizarse éste cambio es el siguiente: Se produce una excesiva - - transpiración que conduce a la desecación progresiva de la plántula - (6, 76), esto es debido a la dificultad de adaptación por las condiciones en las que se desarrolla la plántula en el frasco de cultivo. - Como son: una humedad relativa cercana al 100% (58); el sustrato - en el que se desarrolla la raíz es suave, sin obstáculos y con nutrientes elaborados disponibles; la temperatura y la intensidad luminosa - están controladas; baja actividad fotosintética, etc. (19, 51, 79). Estas condiciones permiten que se desarrollen desórdenes fisiológicos explicados en su mayoría por anomalías anatómicas (51), resumidas a continuación (8, 71, 79):

Diferencias estructurales de la hoja

Plantas normales	Plantas de cultivo de tejidos.
Mesófilo: compacto bien definido (parenquima en empalizada y esponjoso).	Mesófilo no definido, y con grandes espacios intercelulares.
Células epidermales: bien arregladas de manera regular (cúbicas y alargadas).	Arregladas irregularmente y presentan cambios en configuración.

Células guarda: mantenidas al mismo nivel de la epidermis.	Sobresalen de la superficie epidermal.
Estoma: con mecanismo de cierre o abertura por el cambio ambiental.	No reacción al cambio ambiental - (parece ser la principal fuente de pérdida de agua).
Cera cuticular: cubriendo de manera regular la hoja.	Cera cuticular poco desarrollada y mal estructurada.

Aparte de las anomalías mencionadas causantes de la deshidratación de la plántula (principalmente ausencia o pobre desarrollo de la cera cuticular y lenta respuesta del estoma a cambios de status hídrico (6, 7, 76), se considera que otra posible contribución a la deshidratación de la plántula puede ser una conexión incompleta entre el brote y la raíz, mal desarrollo radicular, etc. (2, 19, 79).

En cuanto a desórdenes fisiológicos se han mencionado algunos, tales como: un pobre control de la transpiración, debido a la calidad de la cera (químicamente inadecuada) así como a una deficiente producción de la misma, lo que al parecer esta relacionado con la presencia de hormonas en el medio de cultivo (8, 72, 73, 79); desajustes fotosintéticos (35), debidos entre otras cosas a cambios en la estructura del cloroplasto (por alteraciones en los pigmentos que integran el sistema fotosintético), anomalías en el balance de reacciones fotosintéticas, como en el transporte de electrones y catálisis enzimática (77).

Estos desórdenes se hacen evidentes al realizar el trasplante de las plántulas obtenidas in-vitro pues en éste nuevo ambiente las condiciones de luz, demanda evaporativa, humedad del suelo y disponibilidad de nutrientes son totalmente diferentes a los que tenía la plántula (52), de manera que se ocasionan problemas principalmente por:

- Disminución de la humedad relativa, lo que crea dadas las características de la plántula, un estado de tensión hídrica que a su vez puede verse aumentada por las condiciones de temperatura (6, 7, - 30, 76, 79).
- Alta temperatura ó fluctuaciones de la misma (35).
- Cambio de nutrición desde un tipo heterotrófico a otro por fotoliotrofia (autotrófico) (58, 79).

Las que en conjunto ocasionan como ya se mencionó, la detención del crecimiento ó la muerte prematura de la plántula.

Estos hechos son los principales limitantes para la producción clonal in-vitro de diversas plantas (30, 72) y sobre todo en especies leñosas.

Por lo tanto es necesario buscar estrategias que ayuden al pronto reestablecimiento de la plántula es decir a su aclimatización.

2.- Aclimatización.

Aclimatizar* y aclimatización* son términos que describen el proceso de adaptación de un organismo a un cambio ambiental, el primero es un proceso regulado por la naturaleza, mientras que el segundo es regulado por el hombre (6). La aclimatización para plántulas obtenidas por cultivo in-vitro, se refieren al proceso de adaptación de una plántula de una humedad relativa alta a una baja y en donde es necesario el desarrollo o formación de cera cuticular y la obtención de respuesta del estoma para disminuir la transpiración excesiva, ya que es la principal contribución a la muerte de la plántula - (67, 76). Así como también el desarrollo progresivo de una tolerancia a cambios drásticos de temperatura (35). La habilidad de las plántulas para resistir el trasplante en condiciones normales - del almácigo al campo de cultivo, depende de la capacidad - - -

* Basado en: Brainerd, J. y Fuchigami, L. H., 1981.

de absorción de agua y nutrientes así como de la facilidad de regeneración del brote y raíz. Con base en ello se clasifican las plantas en tres grupos (52).

- Rápida formación de raíces y lento crecimiento del vastago.
- Lento crecimiento del vastago y de la raíz.
- Lento reemplazamiento de la raíz y rápido crecimiento del brote.

Esta clasificación también se podría aplicar a plántulas transplantadas que provienen de cultivo in-vitro ya que también están expuestas a una posible restricción en su desarrollo por la lentitud o rapidéz relativas con que reanuden el crecimiento tanto del brote como de la raíz lo que a su vez influirá en la sobrevivencia de las plántulas.

Para mejorar y acelerar la aclimatización es conveniente el uso de sustancias y ambientes que influyan en el pronto reestablecimiento de la plántula.

a).- Función de los nutrientes, vitaminas y reguladores del crecimiento en la aclimatización.

i.- Nutrientes minerales.

El desorden fisiológico que se establece en plántulas que pro-vienen de cultivo de tejidos (como el bajo nivel de actividad foto-sintética) (35) es uno de los factores que impiden el pronto reestablecimiento de la plántula a las condiciones normales de crecimento, por lo mismo es necesaria la adición exógena de sustancias cuyo suministro endógeno podría estar limitado, lo que podría impedir la iniciación o elongación del brote y reinicio ó regeneración radicu~~lar~~lar (51). El riego de soluciones nutritivas (ó soluciones ini-ciadoras del crecimiento) a las plántulas las provee de una fuente disponible de nutrientes que estimulen el rápido crecimiento, disminuyendo por lo tanto la mortalidad y el tiempo utilizado para

la recuperación (38, 53). La composición química y la concentración de la solución debe ser específica a cada tipo de planta; en general deberá estar compuesta por macroelementos (nitrógeno, fósforo, potasio, calcio, azufre y magnesio) y microelementos (zinc, fierro, boro, manganeso, cobre, molibdeno) que intervienen en una o más combinaciones químicas desempeñando un papel indispensable en el desarrollo vegetal (5, 70).

Tres aspectos en los que se debe poner cuidadosa atención durante la elaboración de la solución nutritiva son:

El pH (concentración de iones hidrógeno), ya que influye en el comportamiento de algunas sustancias como por ejemplo, provocando su precipitación en formas insolubles inaprovechables para las plantas ó bien ejerce acciones específicas sobre la incorporación de otros elementos; el grado de dilución a un nivel adecuado ya que una alta concentración de la solución nutritiva podría dar como resultado una tensión osmótica inadecuada alrededor de las raíces y por lo tanto reducir la sobrevivencia (53, 70); por último debe buscarse un equilibrio adecuado entre los diferentes elementos.

Se han hecho pocos estudios para determinar cuales son los nutrientes minerales necesarios para plántulas que provienen de cultivo de tejidos aunque como en el caso del aguacate (y también de otras plantas) se han realizado investigaciones de nutrición, basadas en análisis foliares pero en plantas maduras, con fines productivos (47).

ii Vitaminas.

Las vitaminas son sustancias importantes para el desarrollo de las plantas, algunas de ellas (como la tiamina, piridoxina y ácido nicotínico) han sido recomendadas para estimular el desarrollo de la raíz, otras como la biotina que tiene influencia en el crecimien

to del tallo, podrían ser benéficas para disminuir la tensión ocasionada por el trasplante y acelerar el crecimiento (46, 71).

iii Reguladores del crecimiento.

La aplicación de reguladores del crecimiento tiene efectos directos sobre el crecimiento de la planta, por lo que se han usado para reducir la tensión por el trasplante y mejorar su establecimiento (53).

b).- Características del sustrato y su función en la aclimatización.

Las condiciones de un sustrato o suelo determinan el éxito en el crecimiento de las raíces y su buen funcionamiento como superficies absorbentes por lo que son aspectos importantes para la aclimatización de plántulas obtenidas in-vitro.

Existen varios factores que influyen el ambiente del suelo como son: los que afectan la resistencia mecánica para la extensión radicular, común en los suelos de textura fina que además reducen el crecimiento radicular por una aereación deficiente; la humedad de el suelo que en exceso ó deficiencia limitan el crecimiento radicular; aereación, cuya efectividad depende de la textura y estructura del suelo. Otro factor que influye en el desarrollo radicular es la temperatura, ya que su crecimiento se detiene a temperaturas desfavorables las cuales pueden afectar la diferenciación y anatomía radicular así como el crecimiento de la planta. La temperatura optima, varía entre las especies y estado de desarrollo pero se considera que en la mayoría esta entre los 20 a 25°C (10, 23, 40). Se recomienda que el sustrato a utilizar para cultivar plántulas que provienen de cultivo de tejidos y en general para todas las plantas debe llenar 3 funciones básicas (53):

- Mantener la planta en su lugar.

- Proporcionar humedad y nutrientes que sean fácilmente disponibles para las raíces.
- Permitir la penetración del aire necesario para la respiración radicular.

Así, el medio ideal debe proporcionar suficiente porosidad para permitir una buena aeración, tener alta capacidad de retención de agua y no obstante buen drenaje. Además debe estar libre de bacterias y hongos perjudiciales (40).

Los sustratos que comunmente se utilizan para el transplante de plántulas provenientes de cultivo de tejidos son constituidos por material orgánico, material inerte o mezclas de ambos.

- Material orgánico.- Turba, esta formada por restos de vegetación que se ha preservado bajo ciénegas en estado de descomposición parcial (40).

Musgo turboso Sphagnum, presenta elevada capacidad de retención de humedad (10 veces su peso seco), es de naturaleza ácida (3.8-4.5), contiene nitrógeno (1%) y poca o nada de fósforo o potasio (40).

- Material inorgánico.- Arena, está compuesto por pequeños granos de sílice de 0.05 a 2.0 mm de diámetro; es el medio más utilizado para el enraizamiento de estacas, no sin antes esterilizarla ya sea con calor ó fumigandola, pues puede contener semillas de malas hierbas o algunas especies de hongos que producen ahogamiento. Es un material que carece de nutrientes minerales (40).

Vermiculita, es un sustrato formado por miccas que se expanden al absorber agua (400 a 500 cc X dm³) tiene capacidad relativamente alta para intercambio catiónico, por lo que retienen algunos nutrientes, liberandolos más tarde. Contiene además magnesio y potasio suficiente para las plantas (40).

Perlita ó agrolita, es un material de origen volcánico, esta representado por pequeños granos esponjosos, ligeros.

En horticultura se usan partículas de 1.5 a 3.1 mm. Es capaz de retener agua 3 a 4 veces su peso, es de reacción casi neutra (7.0 - 7.5); no tiene capacidad de intercambio catiónico ni tiene nutrientes minerales. Se utiliza para incrementar la aereación en la mezcla.

La ventaja del uso de materiales inertes, es que pueden ser fácilmente saturados con agua ó con soluciones promotoras del crecimiento, proporcionando en el transplante un nivel de humedad y aereación conveniente (19).

Tres ventajas destacables son: puede utilizarse en experimentos que traten de detectar el efecto de algún factor, sin la interferencia de alguna otra sustancia que pudiera localizarse en ellos; por otra parte pueden ser fácilmente lavables con agua y esterilizarse con calor.

Algunos ejemplos de sustratos usados en cultivo de tejidos son:

Turba de musgo Sphagnum (30).

Turba y agrolita (6, 7, 8).

Vermiculita y arena (78).

Vermiculita (19).

Agrolita-vermiculita (4).

c).- Condiciones ambientales atmosféricas durante la aclimatización

Es importante mencionar que a éste respecto se han realizado pocos trabajos en los que se definan las condiciones climáticas convenientes para la aclimatización de plántulas producidas in-vitro. Considerando que condiciones de temperatura altas (35°C ó más) principalmente, y humedad relativa baja (menor al 100%) pueden originar la muerte de la plántula, se puede suponer entonces que para disminuir o eliminar los problemas (como deshidratación excesiva), es necesario el utilizar lugares sombreados y frescos donde la humedad relativa sea cercana al 100%, condiciones que posteriormente se irán acercan

do gradualmente a las del ambiente normal.

En algunos trabajos se reporta el uso de intensidades luminosas que van desde 400 a 774 ftc/cm², fotoperíodo de 16 hrs luz/8 hrs obscuridad ó bien de acuerdo a la variación normal del fotoperíodo en la localidad en el transcurso estacional y temperaturas desde 18 a - 31°C (7, 14, 19).

3.- Métodos de aclimatización.

Los métodos que se mencionan en la bibliografía y que a continuación se describirán, se basan en términos generales por una parte, en la disminución gradual de la humedad relativa y regulación de la temperatura (14, 35, 76) y por otra, en la estimulación de una secuencia propia del desarrollo en la plántula a partir del control exógeno de nutrientes, factores y reguladores del crecimiento (51).

a).- Preacondicionamiento bajo cultivo

in-vitro

Algunos autores mencionan que es provechoso principalmente en la última etapa, el uso de intensidades de luz altas (que estimulen la fotosíntesis), concentraciones bajas de sacarosa o de nutrientes inorgánicos (que suelen favorecer el enraizamiento) (2, 58). - Para la disminución de la humedad relativa en el frasco de cultivo se recomienda abrir un poco la tapa del frasco (adicionando agua al medio para que no se seque). En ocasiones se ha usado una capa de lanolina sobre el medio nutritivo, para destapar el frasco e impedir su contaminación ó bien el frasco cerrado se le introduce silica gel, pero esta última puede tener la desventaja de disminuir el crecimiento de la plántula (76).

b).- Nebulización.

Es un método usado, en el caso de estacas foliadas para su enrai

zamiento y aclimatización en conjunto y en el caso de plántulas, para su aclimatización. Consiste en la producción de un rociado intermitente que es controlado automáticamente, y permite que las hojas de las plántulas se mantengan con una película de agua sobre ellas, además de que proporciona un ambiente con una humedad relativa cercana al 100%, y donde la temperatura no se eleva a niveles excesivos (por arriba del punto de compensación) lo que impide el desecamiento y favorece el desarrollo. Por otra parte puede facilitarse la nutrición de las plántulas, ya que los nutrientes pueden ser añadidos en la niebla. El tiempo de aspersion suele disminuirse gradualmente hasta que se elimina por completo y que es cuando la plántula tolera las condiciones del ambiente (19, 40).

c): - Bolsa ó tienda de plástico.

Uno de los métodos alternativos más sencillos es el de cubrir a las plántulas con bolsas de plástico para que se mantenga una humedad relativa alta. Para ayudar a su endurecimiento se hacen hoyos en la bolsa, cuyo número se incrementa lentamente, lo que permite el flujo progresivo de aire y la disminución de la humedad relativa. Cuando se tienen problemas de temperatura e intensidad luminosa alta se recomienda proveer de sombra a las plántulas (22, 79).

d): - Antitranspirantes

Otros métodos que podrían ser utilizados para la aclimatización y más específicamente para la adaptación a humedad relativa baja son los antitranspirantes ya que el reestablecimiento del trasplante depende del mantenimiento de un balance hídrico suficiente que facilite el crecimiento de la raíz, a su vez este balance depende de la diferencia entre la cantidad de agua pérdida por transpiración en las hojas y la cantidad de agua absorbida por el sistema radicular, ya que el mantenimiento ó recuperación del balance hídrico permite el crecimiento continuo al haber producción de nuevas raíces (7, 53).

Así los antitranspirantes podrían ser usados para incrementar la resistencia a la pérdida de agua de la superficie de la hoja (suprimen o aminoran la transpiración) al actuar como una barrera física (película) formada por silicon, ceras, cloruro de polivinil, varios tipos de latex, etc. (53), ó bien por la inducción o cierre del es toma, lo que se lleva a cabo por la aplicación de químicos, que se definen como sustancias que no actúan específicamente sobre el estoma sino que son inhibidores metabólicos de alguna vía respiratoria - por lo que su acción es indirecta. Ejemplos de ellos son el ácido absicico (ABA), ácido 2, 4 - diclorofenoxiacético (2, 4-D), manitol, CO₂, etc. (8, 53).

Después de someter a plántulas que provienen de cultivo de tejidos a un período de aclimatización, se desarrollan en ella, diferentes cambios adaptativos al nuevo medio ambiente entre los que se comprenden los relacionados a la morfología foliar.

4.- Cambios inducidos por aclimatización en hojas de plántulas producidas in - vitro.

- Diferenciación entre el parénquima en empalizada y esponjoso.
- Menor número y tamaño de los espacios de aire en el parénquima.
- Cutícula bien evidente, desarrollo de cera dispuesta azarosamente ó cubriendo casi enteramente la hoja
- Células epidermales arregladas de manera irregular
- Engrosamiento de la lámina foliar.
- Hundimiento del estoma, quedando ya las células guarda al mismo nivel de la superficie de la hoja.
- Limitada abertura del estoma.
- Disminución de la tasa transpiratoria (39, 7).

E. El cultivo de tejidos en aguacate.

El cultivo de tejidos es una metodología cuya dificultad de aplicación varia en las diferentes especies siendo las de mayor problema, las plantas leñosas, debido a que en general son plantas con baja capacidad de regeneración (60), siendo necesario para favorecer su propagación in vitro, determinar estados de desarrollo en cada uno de los cuales el medio nutritivo y las condiciones ambientales sean específicas (2, 58).

Algunas de las plantas leñosas que se han logrado propagar son abedul (Betula verrucosa), alamo (Populus nigra), olmo (Ulmus americana), palma aceitera (Elaeis guineensis), naranja (Citrus sinensis), limon (Citrus limon) (78); eucalipto (Eucalyptus citriodora y E. grandis), pino (Picea abies); diferentes especies de prunus como melocotonero (Cydonia vulgaris), ciruelo (Prunus cerasifera), cereza (Prunus avium), manzano (Pyrus malus), pera (Pyrus communis) (39, 44, 57, 60, 75).

En el caso del aguacate se ha observado un avance lento para lograr la propagación vegetativa por estacado (27, 29, 32, 34, 38, 45, 48, 67) debido posiblemente entre otras cosas, a las características anatómicas que presenta su tallo (33). Sin embargo actualmente se cuenta con técnicas de vivero para su propagación vegetativa aunque de bajo rendimiento y con problemas por resolver (9, 34, 63). De manera que dada la dificultad de propagar el aguacate por métodos asexuales y por los inconvenientes que presentan las técnicas de propagación vegetativa mencionadas anteriormente, desde hace tiempo se ha venido investigando la viabilidad de su propagación por cultivo de tejidos, realizándose trabajos (aunque con fines diferentes a los de propagación) enfocados a: la proliferación celular a partir de pericarpo de fruto (64), la determinación de la longevidad de diferentes tejidos (hojas, yemas, inflorescencias, cotiledones); de donde se ha podido determinar, entre otras cosas, la dificultad para-

el desarrollo de brotes y raíces en los explantes utilizados (65, - 66).

Por otra parte se han realizado trabajos también de cultivo in vitro, con el fin de propagar patrones clonales libres de virus (16) o con características tales como tolerancia a enfermedades, condiciones adversas del suelo, etc.. (16, 49). Sobre esto último hemos logrado avances en el desarrollo de una metodología para la producción de plántulas utilizando la variedad Fuerte como material de experimentación (4, 49). Faltando entonces lograr para que tales plántulas continúen un desarrollo normal después del trasplante al invernadero, someterlas a una etapa de aclimatización; tal aspecto es el objetivo principal de este trabajo en el que se busca por un lado, la adaptación de las plántulas a humedad relativa baja y la promoción del reinicio de su crecimiento. Así también, se trata de acelerar el crecimiento de la plántula hasta que alcance características injertables; todo esto al hacer uso de nutrientes básicos, y sustancias orgánicas que pueden ser necesarias para el desarrollo de la plántula. Por otro lado se busca hacer un seguimiento del desarrollo de la plántula para su caracterización final.

IV.- METODOLOGIA.

Este trabajo estuvo dividido básicamente en dos etapas, la primera se enfocó a la obtención de plántulas de aguacate Fuerte por cultivo in-vitro, y la segunda a la determinación de las condiciones y requerimientos necesarios para su aclimatización (adaptación a humedad relativa baja, reinicio y continuación del crecimiento) y su posible aceleración del crecimiento.

A.- Obtención de plántulas.

1.- Producción y foliación de estacas nodales.

Para el cumplimiento del primer objetivo se utilizarón plantas de aguacate (persea americana, Mill) de la variedad Fuerte injertadas sobre criollo mexicano las que fueron podadas y sometidas a etiología para la inducción de brotes axilares etiolados (49), esto - en los lotes de 20 plantas por 4 ocasiones consecutivas.

Los brotes etiolados fueron cosechados después de 45 días y sometidos a una fase de esterilización. Posteriormente los brotes - fueron cortados en explantes de 4 a 5 cm. de longitud con una yema - superior y sembrados en un medio nutritivo semisolido para su desarrollo foliar (49), requeriendose para ello un tiempo aproximado - de 30 a 45 días. Durante éste período los frascos de cultivo se dejaron en cámara de incubación bajo un fotoperíodo de 16 hrs. luz/8 - oscuridad, intensidad luminosa de 5500 lux y temperatura de 26°C. - aproximadamente.

2.- Enraizamiento de estacas foliadas.

En esta fase se utilizaron en principio 100 estacas foliadas obtenidas de la primera cosecha y se dividieron en dos grupos para realizar lo siguiente:

a).- Enraizamiento bajo condiciones de nebulización en invernadero.

60 de las estacas foliadas se transplantaron para promover bajo nebulización su enraizamiento (ya que se tenía el antecedente , por trabajos anteriores, de un éxito cercano al 60%) y aclimatización directos en invernadero (4), ya que con ello se podría tener la ventaja de reducir el tiempo utilizado para la producción de plántulas. Paralelamente se probó el efecto de la aplicación de 2 soluciones nutritivas (A y B tablas 1, 2; 4, 47) y un sustrato (arena de río vermiculita 2:3).

Las estacas foliadas fueron colocadas las 24 hrs. del día bajo nebulización (5 seg/2.5 min.) en almácigos reticulados formados por receptáculos de plástico de apariencia de pirámide invertida (1 cm^2 en la base estrecha, 9 cm^2 en la parte ancha y 7.5 cm de profundidad) que contenían el sustrato mencionado. Los nutrientes fueron aplicados diariamente para la reposición de los que eran lixiviados por la nebulización.

b).- Enraizamiento bajo condiciones in - vitro.

Las 40 estacas foliadas restantes de la primera cosecha fueron resembradas en condiciones estériles en un medio semisólido para la promoción del crecimiento radicular (1) cuya composición hormonal fué la siguiente: $50\text{ }\eta\text{M}$ de Acido Naftalenacético (ANA), $10\text{ }\mu\text{M}$ Acido Indolbutírico (AIB) y $15\text{ }\eta\text{M}$ de 6-Benziladenina, (6 BA), esperando con ello tener un mejor desarrollo radicular que el observado en trabajos anteriores en los que se reporta un rendimiento cercano al 80% (4); dado que no se logró tal objetivo, las estacas foliadas provenientes de las siguientes cosechas fueron subcultivadas en condiciones estériles, en el mismo medio basal para enraizamiento pero en ausencia de hormonas, como se reporta en trabajos previos (4).

COMPUESTO	CONCENTRACION
$(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4$	0.26 mM
K_2SO_4	0.72 mM
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1.0 mM
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	2.2 mM
CaCl_2	0.82 mM
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	10.8 μM
Na_2EDTA	10.8 μM
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	35.6 μM
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.9 μM
$\text{ZnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	9.2 μM
H_3BO_3	28.4 μM
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.03 μM

Tabla 1. - Composición de la solución nutritiva "A".

Esta solución al igual que la "B" en la tabla 2 fué utilizada para promover el reinicio del crecimiento en plántulas de aguacate ro producidas in - vitro, el pH de las soluciones se ajusto a 5.8.

COMPUESTO	CONCENTRACION
$\text{NH}_4 \text{NO}_3$	5.12 mM
$(\text{NH}_4)_2 \text{HPO}_4$	5.44 mM
KNO_3	4.26 mM
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	2.34 mM
$\text{Ca} (\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	1.76 mM

Tabla 2.- Composición de la solución nutritiva "B" (ver tabla 1 para mayores detalles).

B.- Aclimatización y aceleración del crecimiento.

Con el fin de hacer más clara la descripción de la metodología que a continuación se presenta, es necesario mencionar algunos de los resultados obtenidos respecto a las plántulas disponibles para los experimentos de aclimatización.

Para continuar los estudios de ésta etapa fue necesario utilizar 11 plántulas disponibles de un trabajo experimental anterior, - obtenidas también por cultivo in - vitro ya que no se contaba al principio de este trabajo con las plántulas en la cantidad deseada y con las características requeridas (debido a pérdidas por contaminación y bajo vigor).

Posteriormente al continuar haciendo esfuerzos en los siguientes cultivos de laboratorio para obtener plántulas por cultivo in - vitro fué posible obtener solamente 16 de ellas, de manera que se contó para ésta etapa con un total de 27 plántulas, las cuales fueron utilizandose paulatinamente dependiendo del momento en que estuvieran listas para transplantarse es decir, cuando las estacas foliadas estuvieran enraizadas; una particularidad observada en el lote de plántulas fué que presentaban diferentes tipos de vigor, siendo las plántulas donadas principalmente vigorosas y las obtenidas - en éste trabajo poco vigorosas, aunque en cada caso también se obtuvieron algunas medianamente vigorosas.

Es conveniente mencionar que la aclimatización de las plántulas se llevó a cabo en las condiciones de Invernadero reinantes en CONAFRUT Palo Alto, D.F., y debido a que tal invernadero no contaba con un ambiente controlado fué necesario tomar precauciones a fin - de evitar posibles daños a las plántulas.

1.- En plántulas vigorosas y medianamente vigorosas.

a).- Adaptación a humedad relativa baja y reinicio del crecimiento.

Un segundo intento para estudiar el proceso de aclimatización fué realizado, pero ahora usando plántulas, es decir estacas nodales foliadas y enraizadas in - vitro las que se transplantaron al invernadero a mediados de junio (1984) correspondiendo 8 plántulas donadas y dos más obtenidas en éste trabajo. Estas plántulas fueron colocadas en 2 tinas perforadas de plástico (13 X 32 cm; 7 en una y las restantes en otra), las cuales contenian: en el fondo, una capa de tezontle (de 2.0 cm aproximadamente de diámetro) - y más arriba una capa formada por una mezcla de agrolita-vermiculita 1:1 (tamizadas en mallas de 2 mm para eliminar fracción gruesa y de 1 mm para eliminar fracción fina), en este caso ya no se utilizó el sustrato antes usado para las estacas foliadas ya que al aparecer fué el causante del ahogamiento de las mismas, posiblemente por su alta finura.

Para iniciar la adaptación de las plántulas, se dejaron bajo nebulización las 24 hrs. del día 5 seg/2.5 min.. A los 2 grupos ya establecidos de plántulas se les aplicó diariamente (a cada uno) y por dos meses una solución nutritiva (4, 47) diferente "A" y "B" respectivamente (Tablas 1, 2; Esquema 1), conteniendo nutrientes inorgánicos básicos, esto para observar cual de ellas favorecía el reinicio del crecimiento y utilizarla posteriormente durante el resto del trabajo.

Después de las primeras semanas de inicio de la nutrición, las plántulas se sacaron de la cámara de nebulización, ya que se tuvieron problemas con el funcionamiento de esta última y para sustituir la función del nebulizador y seguir manteniendo una humedad relativa alta, las plántulas se cubrieron lo más herméticamente posible con un plástico transparente y se dejaron en el invernadero en un lugar sombrea

EXPERIMENTO NO.	DESCRIPCION	PLANTULAS UTILIZADAS (NUMERO Y CALIDAD)			FECHA DE APLICACION.
		A	B		
1	Aplicación de solución nutritiva	A	B		12 Junio
		3V	2V		
		+	+		
		3MV	2V		(12 Junio)
2	Aplicación de Tiamina ($\mu\text{g/l}$)	100	10	1000	2 Agosto
		3V	3MV	3V	
			+		
			1MV		(16 Agosto)
3	Aplicación de Biotina ($\mu\text{g/l}$)	0	100	10	11 Octubre
		3V	4MV	4V	
4	Ac. Giberélico ($0.1 \mu\text{M}$)	1V	1MV	1V	10 Diciembre
4'	Ac. Giberélico ($1.0 \mu\text{M}$)	1V	1MV	1V	11 Febrero

Esquema 1. Procedimiento para la aplicación de tratamientos a plántulas vigorosas y medianamente vigorosas.

El esquema muestra la descripción de los experimentos realizados, la cantidad de plántulas usadas y su calidad expresada por el grado de vigor (V = vigorosas y MV = medianamente vigorosas). En la columna a la derecha se indica la fecha de inicio de la aplicación de los tratamientos, anotándose en algunos casos la fecha (entre paréntesis) de inclusión de nuevas plántulas. Las flechas de trazo continuo indican que para cada experimento se usarán las plántulas provenientes de tratamiento anterior y las flechas discontinuas destacan las plántulas tratadas con GA_3 . De cada uno de los experimentos se esperaba elegir la solución o concentración que interviniera en el reinicio y aceleración del crecimiento, la que a su vez se utilizaría en el experimento siguiente:

Las plántulas V y dos de las MV pertenecen a plántulas donadas, las restantes fueron obtenidas en este trabajo; no se incluyen las plántulas muertas durante el experimento.

do y fresco, de esta manera se favorece un balance hídrico adecuado entre la plántula y su ambiente. Bajo estas nuevas condiciones - las soluciones nutritivas se continuaron adicionando pero 2 veces - por semana, aunque antes de nutrirlas el sustrato era regado abundantemente con agua destilada para impedir la acumulación de sales.

Al continuar el estudio de aclimatización y dado que no se contaba con un clima acondicionado fué necesario tomar precauciones, - esto es, mantener a las plántulas en lugares frescos; ir quitando - poco a poco el plástico que las cubría, para promover paulatinamente su adaptación a condiciones extremas; proporcionarles sombreado con una malla plástica que tenía una capacidad de reducción de - intensidad luminosa aproximada del 22 al 30% (según comparación - con el catálogo de películas de sombreado: AB Ludvíng Svensson, Ki ma) al presentarse temperatura e intensidad luminosa altas, prin cipalmente en las horas cercanas al medio día.

b).- Aceleración del crecimiento.

Habiendo detectado cual fué la solución nutritiva (A, Tabla 1) y el sustrato (agrolita - vermiculita 1:1) que funcionaron mejor para el reinicio del crecimiento se inicio la aplicación de tratamientos que pudieran acelerar el desarrollo de las plántulas hasta alcanzar características injertables.

b.1).- Aplicación de diferentes niveles de tiamina.

Los grupos formados en un principio para la aplicación de la - solución nutritiva se dejaron igual a excepción de los nutrídos con la solución "A" que se dividieron en dos grupos (Esquema 1), de - esta manera se contaba con 3 grupos a cada uno de los cuales se les aplicó un nivel de concentración de tiamina diferente (68): 10, - 100 y 1000 $\mu\text{g}/1$ (Esquema 1; Tratamiento 2) para, después de 2 meses (agosto - octubre), elegir el mejor; al grupo con 10 $\mu\text{g}/1$ se -

adicionó otra plántula donada (Esquema 1).

b.2).- Aplicación de diferentes niveles de biotina.

Para observar por 2 meses el efecto de diferentes concentraciones de biotina, se inició un tercer tratamiento en el que se dejó la concentración de tiamina más alta ($1000\mu\text{g}/\text{l}$), y la biotina se usó, en los grupos ya establecidos de plántulas, en los niveles (68) 0, 10 y $100\mu\text{g}/\text{l}$, (Esquema 1; Tratamiento 3).

Es conveniente aclarar que después del tiempo de observación de éste tratamiento se les siguió aplicando a las plántulas los mismos niveles.

b.3).- Aplicación de diferentes niveles de - - - Acido Giberélico.

Después de 2 meses de observar el efecto de las diferentes concentraciones de biotina se comenzó, para una de las plántulas de cada grupo, la aspersión sobre el ápice foliar de una solución de ácido giberélico (GA_3) $0.1\mu\text{M}$ (Esquema 1; Tratamiento 4) durante 3 ocasiones (1 cada semana), para probar preeliminarmente si inducía un efecto notorio en el crecimiento que podría estudiarse más detalladamente en el futuro. Aproximadamente 2 meses después se volvió a rociar (también en tres aplicaciones semanales) GA_3 en las plántulas ya tratadas. pero ahora en el nivel de $1.0\mu\text{M}$ (Esquema 1; Tratamiento 4').

2.- En plántulas poco vigorosas.

Al ir contando con nuevas plántulas obtenidas en este trabajo, se estuvo en posibilidad de volver a tratar de promover: la adaptación a humedad relativa baja, el reinicio del crecimiento y una posible aceleración del crecimiento, con el uso de condiciones y tratamientos similares a los ya usados, pero con las modificaciones -

que adelante se verán.

a).- Adaptación a Húmedad relativa baja.

Las plántulas poco vigorosas disponibles fueron transplantadas al invernadero pero ahora individualmente en bolsas de polietileno que contenían el substrato de agrolita - vermiculita 1:1 y cubiertas de la parte aérea con una bolsa de plástico transparente. Los pasos seguidos para su adaptación a una baja húmedad relativa fueron los mismos que para el lote usado antes, aunque sin utilizar esta vez la nebulización al principio.

b).- Reinicio y aceleración del crecimiento.

Al mismo tiempo que se continuaban los experimentos anteriores con las plántulas vigorosas y medianamente vigorosas se realizaron tratamientos similares aunque con algunas modificaciones a los ya aplicados, esto a fin de detectar el efecto de éstos tratamientos sobre plántulas poco vigorosas. La nutrición de éstas plántulas durante los tratamientos siguientes fué a partir de la solución "A" (Tabla 1). Para cada uno de los siguientes ensayos se utilizaron 2 plántulas aplicando tiamina en el nivel de $1000\mu\text{g}/\text{l}$ (ya que se consideraba que si bien no se había observado un efecto particular en el crecimiento por la adición de diferentes niveles de tiamina, se esperaba que el nivel más alto fuera el más adecuado por la posible insuficiencia de producción de ésta vitamina en la plántula; 51), junto con biotina en tres niveles: 10, 100 y $500\mu\text{g}/\text{l}$ (Tratamientos 1, 2, 3; Tabla 3); en este último se incrementó la biotina ya que las concentraciones utilizadas no habían aparentemente dado resultados efectivos en la promoción del desarrollo de plántulas vigorosas anteriormente tratadas.

Los otros ensayos consistieron en: i) aplicar tiamina en el nivel de $100\mu\text{g}/\text{l}$ (Tratamiento 4; Tabla 3), para observar si en las plántulas respectivas se llegaba a dar un comportamiento diferente-

TRATAMIENTO	NUMERO DE PLANTULAS	TIAMINA $\mu\text{g/l}$	BIOTINA $\mu\text{g/l}$	GA ₃ μM	IAA μM
1	2	1000	500	-	-
2	2	1000	100	-	-
3	2	1000	10	-	-
4	2	100	-	-	-
5	2	-	-	0.1	-
6	2	-	-	-	5.0
7	2	-	-	-	-

Tabla 3.- Tratamientos con vitaminas y hormonas aplicados a plántulas poco vigorosas.

Los tratamientos descritos fueron aplicados a plántulas poco vigorosas (PV), para comparar en el caso de los tratamientos: 1, 2, 3, y 4, con el comportamiento observado en plántulas vigorosas (V) y medianamente vigorosas (MV), aunque en el primero adicionando un nivel más alto de biotina; por otra parte se asperjó ácido giberélico (Trat. 5) sobre el ápice del brote (para promover su alargamiento) y se aplicó ácido indolacético (Trat. 6) en el sustrato para intentar mejorar la calidad de las raíces, dejándose el tratamiento 7 como control para comparar posibles efectos de los tratamientos.

al observado en las plántulas vigorosas y medianamente vigorosas; - ii) asperjar ácido giberélico (GA_3) $0.1 \mu M$ (Tratamiento 5; Tabla 3) en el ápice foliar, ya que se recomienda para el alargamiento del brote (37, 58); iii) adicionar al substrato Acido Indolacético (AIA) $5 \mu M$ (Tratamiento 6; Tabla 3) para mejorar la calidad de las raíces ya que las plántulas crecían lentamente (42); - finalmente se dejó uno de los grupos de plántulas sin tratamiento adicional a la nutrición con la solución "A" para poder contar con un testigo con el cual corroborar posibles efectos de los tratamientos descritos (Tratamiento 7; Tabla 3).

D.- Seguimiento del desarrollo de las Plántulas.

Para poder registrar la continuidad del desarrollo de las plántulas, cada semana les fué medida la altura del brote y el ancho y largo de las 2 últimas hojas (madura y semimadura) del último flujo de crecimiento y número total de hojas formadas, cuantificando también el número de hojas presentes al término del experimento.

E.- Observación del sistema radicular al finalizar el - - - - experimento.

Las plántulas después de 11 meses (para el caso de vigorosas y medianamente vigorosas) fueron descubiertas del sistema radicular para determinar el grado de desarrollo alcanzado, anotándose las características más sobresalientes del mismo: tipos de raíz presente (primaria, secundaria, etc.), distribución y longitud.

V. - RESULTADOS

A. - Obtención de Plántulas,

1. - Producción de estacas nodales foliadas.

La cantidad de estacas nodales desarrolladas in vitro hasta su foliación para cada uno de los lotes sembrados fué el siguiente: en el primer lote 100 (de 286 estacas nodales iniciales), en el segundo 75 (de 213 estacas nodales iniciales), en el tercero 70 (de 118 estacas nodales iniciales) y por último 15 en el cuarto lote (de 45 estacas nodales iniciales).

Durante el cultivo de cada uno de los lotes de estacas foliadas se presentaron una serie de problemas que influyeron en la cantidad de material obtenido como son: la contaminación (en altos índices en los lotes 3 y 4), poco vigor (más frecuentemente en el lote 2) y producción de callo (principalmente en el lote 1) que impedía el desarrollo de la yema.

2.- Estacas foliadas enraizadas.

a).- En invernadero bajo nebulización.

De sesenta estacas foliadas provenientes del primer lote y sometidas a nebulización en el invernadero, no se obtuvo ningún enraizamiento ya que se necrosaron de su parte basal en la tercer semana de su trasplante, dado posiblemente por condiciones de ahogamiento propiciadas por una compactación del sustrato utilizado (arena de río vermiculita 2:3) debido a que la vermiculita estaba muy pulverizada y la arena era muy fina; de manera que en este ensayo inicial no se pudo obtener resultados de la posibilidad de aclimatización en paralelo al transcurso del enraizamiento en condiciones de invernadero y por lo tanto tampoco se pudo determinar si las soluciones nutritivas utilizadas (soluciones A ó B; Tablas 1, 2) podrían tener algún efecto sobre el reinicio del crecimiento del brote, al partir de este

tipo de explante, y tampoco fué posible continuar con este tipo de experimentos por fallas en el equipo de nebulización.

b): - Enraice in-vitro

De cuarenta estacas foliadas (correspondientes al resto del primer lote producido), subcultivadas in vitro en presencia de hormonas para su enraice no se obtuvo ningún enraizamiento; mientras que del resto de las estacas foliadas (pertenecientes a los 3 últimos lotes) subcultivadas para su enraice en ausencia de hormonas se llegó respectivamente a los siguientes resultados: 8 enraizadas de un grupo de 75 (10.7%), 5 de un total de 70 (7.1%) y 3 de un grupo de 15 (20%).

B.- Características iniciales de las plántulas utilizadas.

En general el aspecto normal de una plántula vigorosa al ser sacada del frasco de cultivo para llevarse al invernadero es como se muestra en la Figura 1.

1.- Plántulas donadas.

De las 11 plántulas con las que se contó se observaron 2 diferentes grados de desarrollo uno de ellos clasificado como vigoroso (V; Figura 2) y en el que se incluían 9 de las plántulas y el otro como medianamente vigoroso (MV; Figura 3) que abarcaba a las 2 plántulas restantes. La característica que los diferenciaba fué el grosor de la estaca nodal, que en las vigorosas fué en promedio de 0.53 cm (Tabla 4), mientras que en las medianamente vigorosas fué en promedio de 0.38 cm (Tabla 4) y en el tamaño del ancho y largo de las hojas que en las "V" es de 1.4 y 3.2 cm. (Tabla 4) en promedio respectivamente y en las "MV" de 0.87 y 1.7 cm. (Tabla 4) en promedio respectivamente.

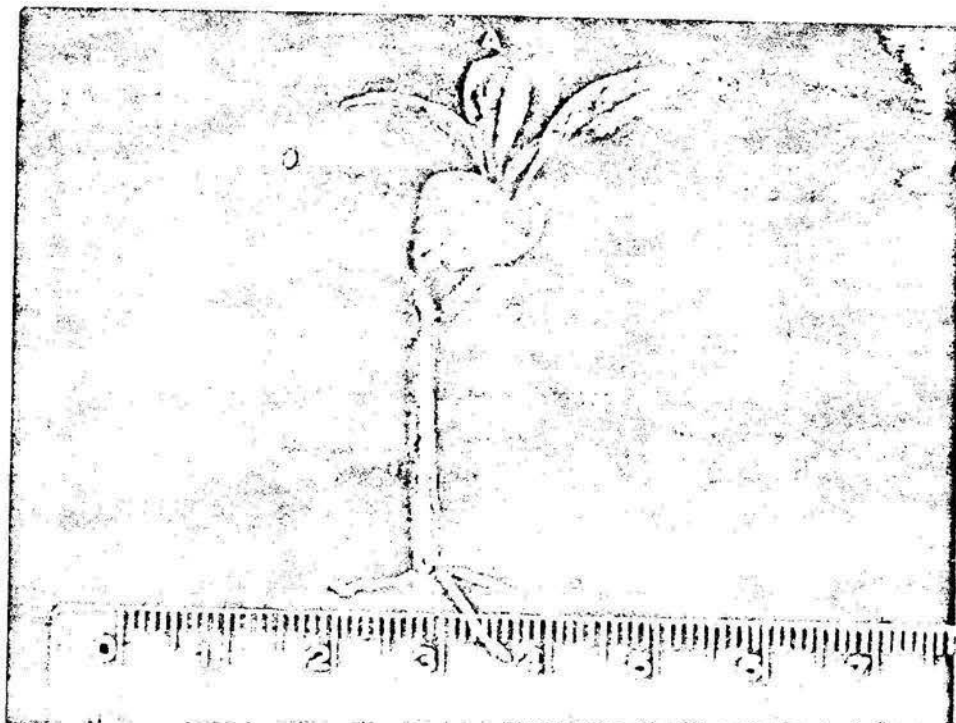


Figura 1. Plántula de aguacate Fuerte producida "in-vitro".

Se muestra el aspecto de una plántula vigorosa momentos después de sacarse del frasco de cultivo para trasladarse al invernadero y en la que se observa el grado de desarrollo radicular como el foliar alcanzados durante 2 meses, aproximadamente, de su cultivo in-vitro (escala en centímetros).



Figura 2. Tipos de desarrollo del brote de las plántulas al inicio de los experimentos. (vigorosas).

Se muestran las características iniciales de las plántulas con las que se trabajó, las cuales fueron divididas en tres grupos en base a los diferentes grados de desarrollo de las mismas: plántulas vigorosas (las aquí presentadas), plántulas medianamente vigorosas (fig. 3) y plántulas poco vigorosas (Fig. 4). Posteriormente fueron transplantadas al invernadero en un sustrato de agrolita vermiculita 1:1 y mantenidas en una humedad relativa cercana al 100%. - La escala mide 8 cm.



Figura 3. Tipos de desarrollo de brote de las plántulas al inicio de los experimentos (medianamente vigorosas).

La figura muestra plántulas medianamente vigorosas, después de llevarse al invernadero y colocarse sobre agrolita - vermiculita 1:1 bajo una humedad relativa cercana al 100%. Con fines de comparación de dimensiones, la distancia entre las 2 plántulas es de aproximadamente 8 cm.

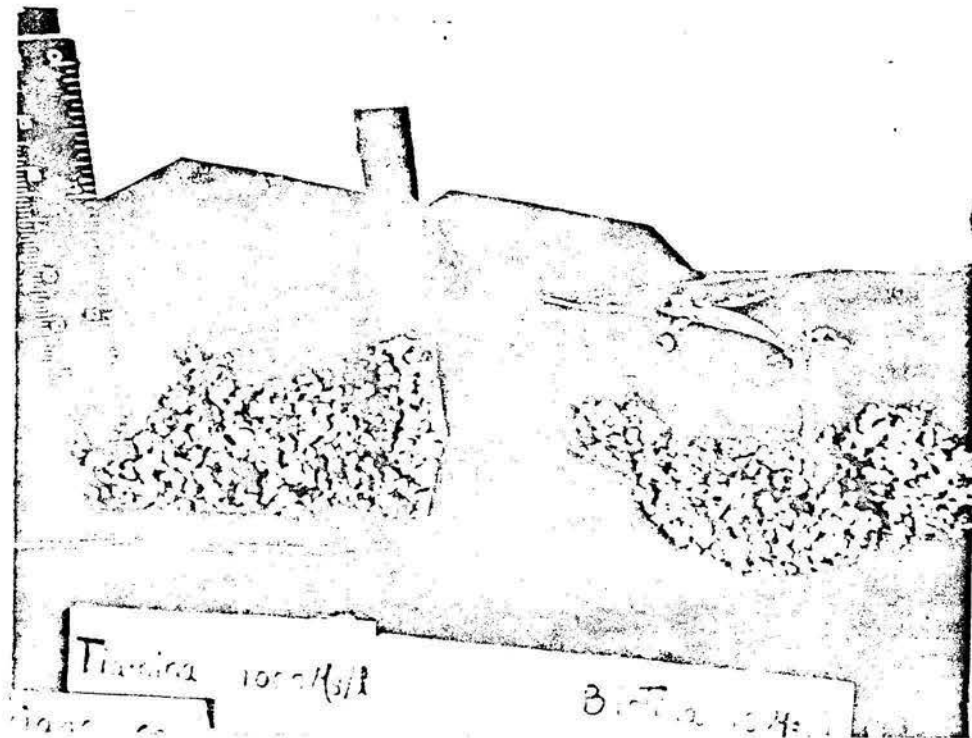


Figura 4. Tipos de desarrollo del brote de las plántulas al inicio de los experimentos (poco vigorosas).

En la figura se presenta a 2 plántulas poco vigorosas poco después de transplantarse al invernadero en sustrato de agrolita - vermiculita 1:1 y en una humedad relativa alrededor de 100%.

	Grosor de estaca nodal	Calidad radicular		Longitud de brote	Calidad de hojas en brote.		
		No.	Long.		Número	Ancho	Largo
MEDIANAMENTE VIGOROSAS	0.6	1	0.5	2.5	4	1.5	3.2
	0.6	2	0.5	2.3	4	1.4	3.1
	0.5	1	0.5	2.3	5	1.2	3.2
	0.5	1	0.1	2.1	3	---	---
	0.5	1	0.1	2.0	3	1.5	3.5
	0.5	1	6.5	1.4	4	1.4	3.0
MEDIANAMENTE VIGOROSAS	0.4	1	1.8	1.0	2	0.6	1.5
	0.4	1	2.0	1.2	3	0.9	2.0
	0.4	1	0.5	1.0	6	1.2	2.5
	0.3	1	0.1	2.2	6	0.8	1.1
POCO VIGOROSAS	0.4	2	0.7	1.0	2	0.7	2.1
	0.3	2	2.0	1.6	2	1.1	3.1
	0.3	1	0.4	2.0	7	0.9	2.8
	0.3	2	0.2	1.4	1	0.7	2.1
	0.3	2	3.5	0	4	0.8	1.7
	0.3	1	0.1	2.5	4	0.8	2.0
	0.4	2	1.0	2.5	4	1.2	3.3
	0.3	3	1.5	3.0	3	1.0	2.8
	---	3	2.5	1.0	2	1.2	3.4
	---	1	0.2	1.5	3	---	---
	0.4	1	0.1	0.6	2	---	---
	---	1	1.5	4.5	6	0.8	2.5
	---	3	0.1	0.2	1	---	---
---	4	0.4	0.8	1	---	---	

Tabla 4.- Características de las plántulas recién producidas "in vitro" al iniciar su aclimatización.

Se indican las dimensiones presentadas por las plántulas al inicio del experimento. En cuanto a la calidad radicular la longitud reportada corresponde a la raíz mayor, en el caso de haber más de una; así también el tamaño considerado de la hoja pertenece a la más desarrollada en la plántula.

2.- Plántulas obtenidas en este trabajo.

En estas plántulas (16 en total) se detectaron 2 grados de desarrollo, las que se diferenciaban unicamente por el grosor de la estaca, siendo de 0.33 cm en plántulas consideradas poco vigorosas (PV; Figura 4; Tabla 4) y de 0.38 cm en plántulas "MV" mencionadas anteriormente (Figura 3; Tabla 4). Siendo 14 de las plántulas "PV" y las dos restantes "MV" (Tabla 4). En cuanto al tamaño de las hojas, no se registraron diferencias sobresalientes al comparar plántulas "MV" y "PV".

En resumen, a lo largo de los experimentos de aclimatización que a continuación se describen se contó con 9 plántulas vigorosas (V), 4 medianamente vigorosas (MV) y 14 poco vigorosas (PV) - (Tabla 4).

La clasificación realizada de las plántulas (mencionada anteriormente), fué hecha de manera arbitraria y se utilizó con el fin de hacer notar las características de las plántulas usadas.

C.- Aclimatización.

1: -Adaptación a humedad relativa baja.

a): -Plántulas vigorosas y medianamente vigorosas.

El proceso de adaptación en éstas plántulas (Figura 2, 3) se fué desarrollando a partir de las siguientes condiciones: después de 30 ó 45 días de su transplante al invernadero las plántulas fueron capaces de soportar una disminución en la humedad relativa (85 70%) al permitir el flujo de aire dentro de la cámara en la que se encontraban, pero estando bajo condiciones de sombreado. A los tres meses podían permanecer la mayor parte del día destapadas (sin que se observara desecamiento) aunque requerían sombreado cuando la

temperatura era extremosa (arriba de los 30°C); cuando se tapaban la película plástica se dejaba sobrepuesta y mantenía la humedad relativa alrededor de 65-50%. Fué hasta los 5 ó 6 meses posteriores a su transplante al invernadero, cuando las plántulas se dejarón totalmente destapadas, bajo una humedad relativa cercana a 40-45% (presente en las horas más calurosas), sin necesidad de que se les proporcionara algún cuidado especial. Finalmente se logró una sobrevivencia del 77%, partiendo de un total de 13 plántulas.

b).- Plántulas poco vigorosas.

En el caso de plántulas poco vigorosas (Figura 4) la respuesta observada fué un poco diferente ya que requirieron de más tiempo para resistir el ambiente del invernadero. A los tres meses las plántulas toleraban el flujo de aire dentro de la cámara plástica, y una humedad relativa del 85-70%, siempre y cuando se encontraran en la sombra y que en el invernadero no se alcanzarán temperaturas arriba de los 30°C . A los 6 meses soportaban un mayor flujo de aire dentro de la cámara (lo que reducía la humedad relativa a un 75-60%) aunque la temperatura general del invernadero fuera extremosa, pero siempre y cuando estuvieran con su cubierta plástica y bajo sombra. Durante los 6 meses que permanecieron las plántulas en observación, no fué posible dejarlas totalmente destapadas, ya que, empezaban a dar señas de marchitamiento. Al término de la adaptación se obtuvo una sobrevivencia del 57% de un total de 14 plántulas.

2.- Reinicio del crecimiento en las plántulas tratadas.

En ésta parte del trabajo fué necesario además de la regulación de las condiciones climáticas, centrarse paralelamente en la búsqueda de las características de substrato y nutrición que promovieran el reinicio del crecimiento.

a).- Elección de sustrato.

El sustrato utilizado (mezcla cribada de agrolita-vermiculita 1:1) para el cultivo de todas las plántulas (V, MV, PV) fué - - - adecuado para hacer los estudios de aclimatización y por lo tanto para reiniciar el crecimiento de las mismas ya que teniendo capacidad suficiente de retención de humedad (permanecía húmedo aún después de una semana sin regarlo) poseía una capacidad de aereación adecuada (ya que no provocó ahogamiento al usar el sustrato bajo condiciones de nebulización o de cultivo en tinas cubiertas con plástico), -- pues el que se había usado en un principio para el enraice directo - en invernadero de las estacas foliadas, como se mencionó anteriormente, causó el ahogamiento de las mismas.

b).- Selección de la solución nutritiva.

Aunque del ensayo con las 2 soluciones nutritivas (A, B; Tabla 1, 2; Figura 5, 6) no se pudo distinguir cuál promovía el más rápido reinicio del crecimiento (en plántulas vigorosas y medianamente vigorosas) ya que los 2 grupos de plántulas tratadas se veían aparentemente igual en cuanto al grado de desarrollo del ápice foliar, se decidió utilizar en lo subsiguiente la solución "A", debido principalmente a que la "B" presentaba problemas de disolución, prefiriéndose además la "A" por estar basada en un análisis foliar específico para aguacate (47).

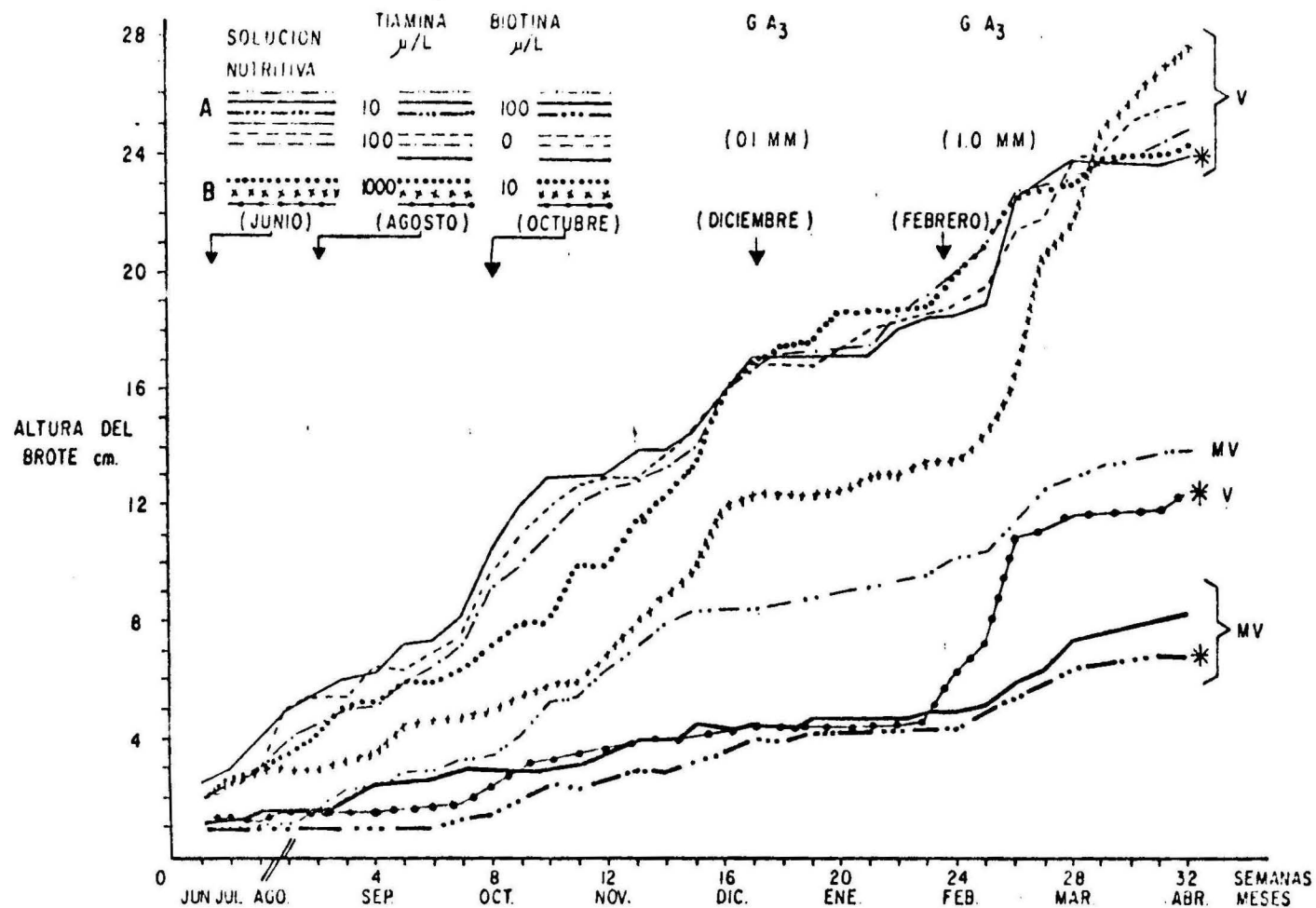
Se observó que el reinicio del crecimiento se dio en la mayoría de las plántulas: en las vigorosas al parecer casi desde el principio, aunque lentamente al inicio; mientras que en las medianamente y poco vigorosas se requirieron cerca de 2 meses (Gráficas 1, 2).

Aquellas plántulas que no lograron reiniciar su crecimiento murieron en las dos primeras semanas de su trasplante, teniéndose una mortalidad mayor en las poco vigorosas de las que se perdieron 6 de



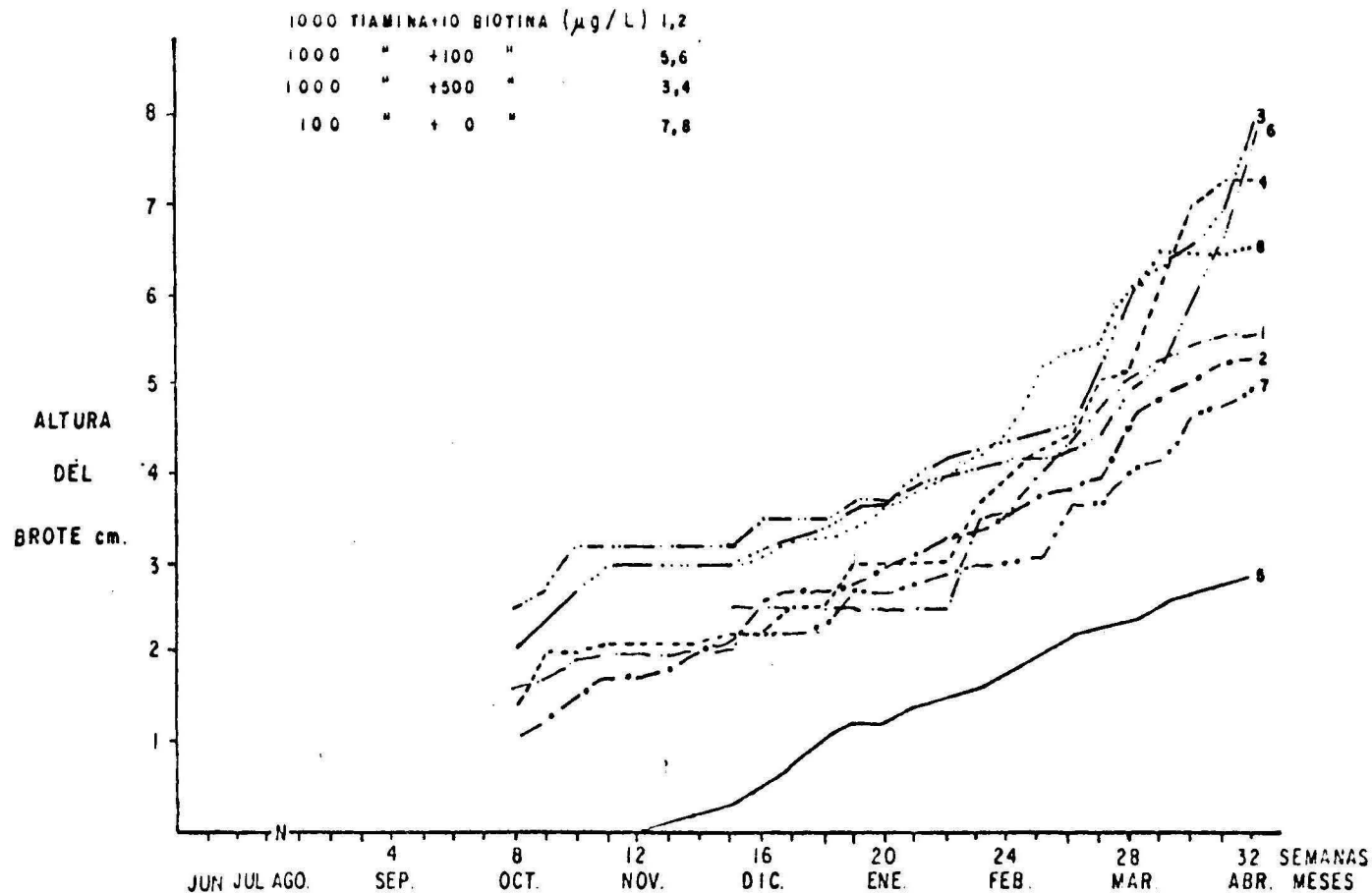
Figuras 5, 6. Selección de solución nutritiva.

En las figuras presentadas se compara el desarrollo causado por la adición, bajo condiciones de invernadero, de la solución nutritiva "A" ó "B" a plántulas vigorosas producidas in-vitro no observandose - diferencias en cuanto al desarrollo del ápice foliar, que indicarañ la predominancia de efecto de una solución sobre otra.



Gráfica 1. Desarrollo de brote en plántulas vigorosas y medianamente vigorosas durante los experimentos de aclimatización

Las curvas muestran la respuesta al desarrollo de plántulas vigorosas (V) y medianamente vigorosas (MV) que fueron sometidas en forma sucesiva a los tratamientos descritos a partir del ángulo superior izquierdo, señalándose el momento de su aplicación con la flecha correspondiente; cabe hacer notar que a partir de agosto se utilizó únicamente la solución "A" y desde septiembre la tiamina se ajustó a 1000 $\mu/g/l$. Las curvas marcadas con asterisco corresponden a plántulas tratadas por tres ocasiones (cada semana) sucesivas con las concentraciones de Ac. Giberélico señalados en la gráfica. Las plántulas se mantuvieron en observación durante 10 meses, abarcando únicamente 3 meses del período cálido (abril-septiembre) en Palo Alto, D.F.



Gráfica 2. Crecimiento del brote en plántulas poco vigorosas durante los tratamientos de aclimatización

Las curvas representadas describen el comportamiento de plántulas poco vigorosas al ser tratadas desde su trasplante a invernadero y hasta el fin de los experimentos con los tratamientos que se muestran en el ángulo superior izquierdo (para más detalles ver tabla 5). En este caso los ensayos se iniciaron a partir de octubre a diciembre de 1984 dándose por terminados hasta abril de 1985; coincidiendo - el período de experimentación con la época fría en Palo Alto, D.F. (octubre-marzo).

un total de 14; y fué menor en el caso de las vigorosas, de las que solo se perdieron 3 de un total de 9; de las medianamente vigorosas no se perdió ninguna.

3.- Aceleración del crecimiento.

a).- Efecto de la adición de vitaminas.

Tanto en los diferentes niveles de tiamina (Esquema 1) ensayados individualmente, como 2 de los diferentes niveles de biotina, aplicados junto con el nivel de tiamina elegido (Esquema 1), no se observó en ningún tipo de plántulas (Vigorosas, medianamente vigorosas y poco vigorosas) como se esperaba, una aceleración dramática del crecimiento, aunque sí se dió la continuación del mismo (Gráficas 1, 2). Resultado este último que no se había podido lograr en trabajos previos (4, 49).

b).- Efecto de la adición de hormonas.

Durante la aplicación del ácido giberélico (en los 2 niveles usados) en las plántulas vigorosas y medianamente vigorosas (Esquema 1) resultados no deseados fueron observados al comparar cada plántula tratada con su testigo (Gráfica 1). En el caso de las plántulas poco vigorosas tratadas con esta hormona ($0.1 \mu\text{M}$) no se pudieron observar posibles efectos ya que las plántulas murieron en las primeras semanas de su transplante. Posteriormente al usar el ácido indolacético sobre las dos plántulas poco vigorosas tratadas (Esquema 1) tampoco se pudo observar su efecto sobre el desarrollo de la plántula y su sistema radicular debido a que se murieron.

El comportamiento de desarrollo continuo del brote, mostrado por las plántulas durante los diferentes tratamientos es observado en las gráficas 1 y 2; la primera se refiere a plántulas vigorosas y medianamente vigorosas, y en ella se puede ver un comportamiento va

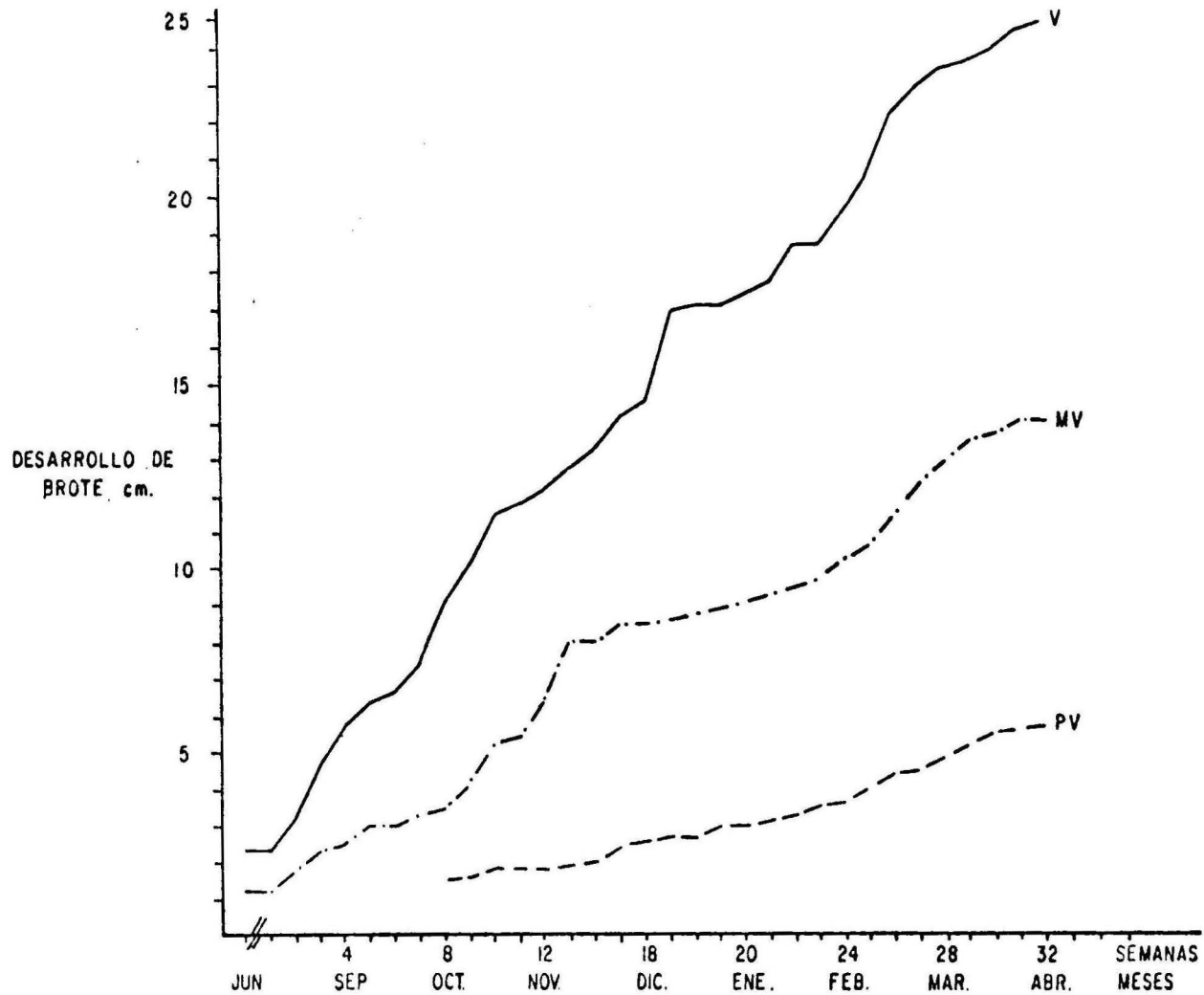
riable en las plántulas de los diferentes grupos, aun cuando pertenezcan a un mismo tratamiento; la segunda gráfica se refiere a plántulas poco vigorosas y se observa que el comportamiento de las curvas de desarrollo del brote durante todo el experimento es muy similar entre sí, con excepción de una de ellas, a pesar de estar bajo tratamientos diferentes. De manera que para las curvas de los tres grupos de plántulas se podría pensar en una carencia de relación entre concentración del factor de tratamiento y desarrollo de brote.

Un factor que intervino en el desarrollo del brote durante el experimento fué la temperatura, ya que durante la época fría, que abarca de octubre a marzo en CONAFRUT Palo, Alto., D.F., se observó un período de detención o disminución del crecimiento (Gráficas - 1, 2), siendo más notorio en los meses de noviembre-febrero o sea en plena época invernal.

D.- Comparación de las características generales del desarrollo de las plántulas durante el experimento.

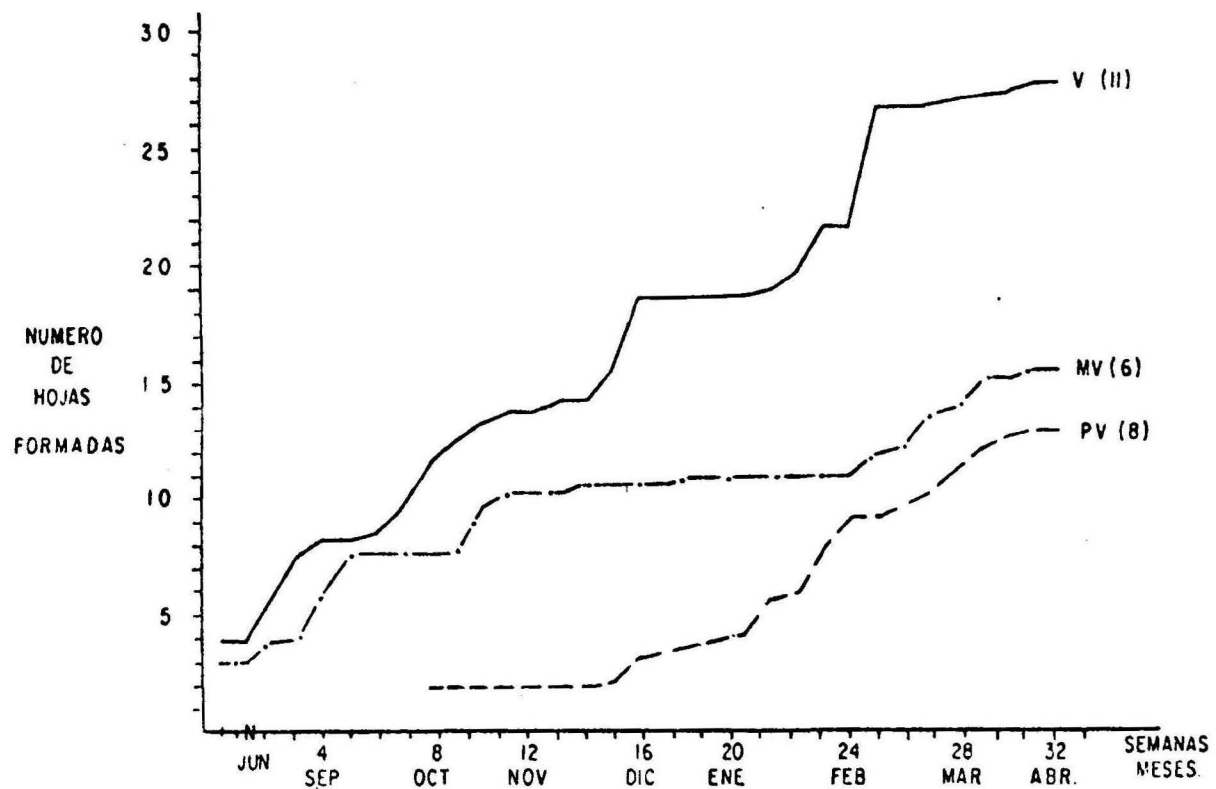
A pesar de no haber logrado la aceleración del crecimiento, la continuación del mismo permitió detectar que la característica principal mostrada por las plántulas fué la presencia de diferentes tipos de vigor de crecimiento del brote: vigoroso, medianamente vigoroso y poco vigoroso, que correspondieron al vigor inicial de las plántulas y en general durante todo el experimento (Figuras 2, 3,4; Gráfica 3). Estos tipos de vigor fueron fácilmente observables en cuanto al crecimiento del brote (Gráficas 1, 2, 3) y número de hojas (Gráfica 4) pero no en cuanto a la variación de las dimensiones de las hojas (Gráficas 5, 6). En general el grado de desarrollo de las plántulas estuvo relacionado con el tipo de vigor.

El desarrollo mostrado por las plántulas durante aproximadamente 10 meses de cultivo en el caso de plántulas vigorosas y medianamente



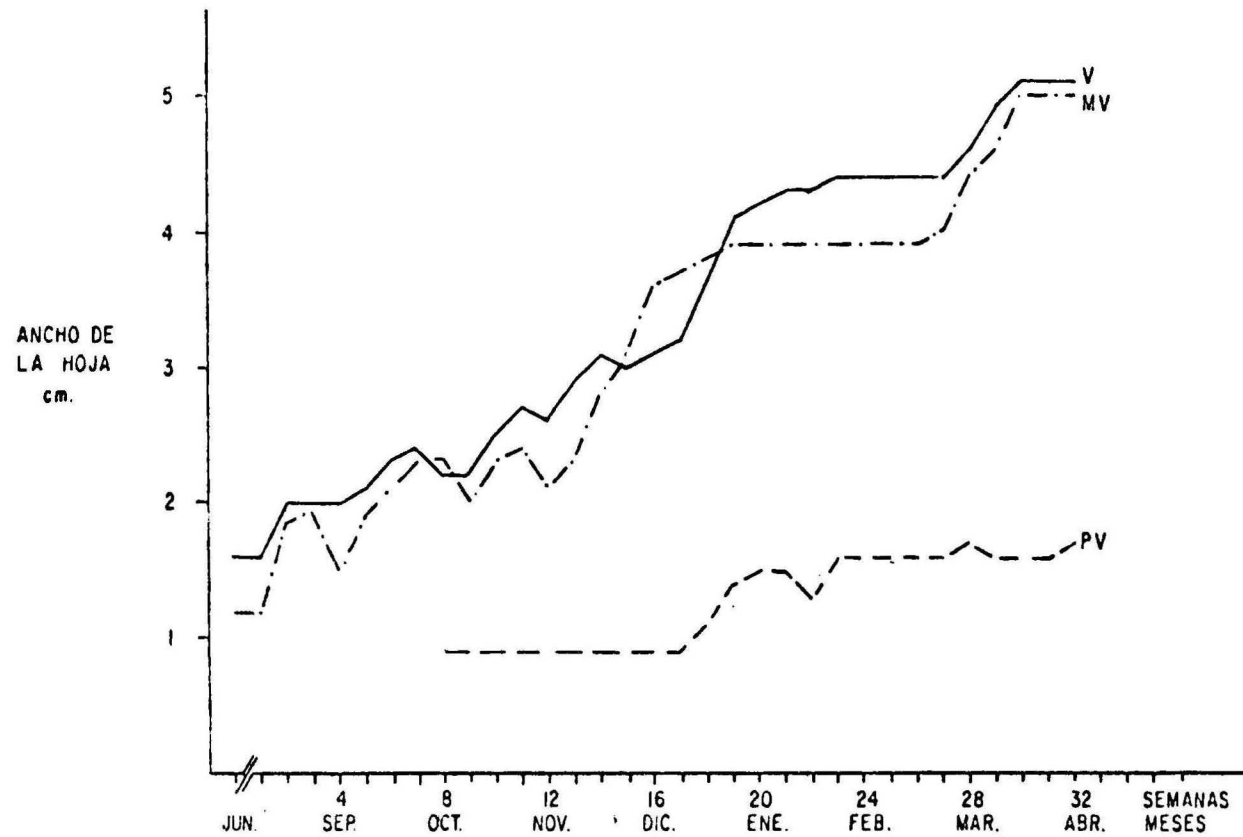
Gráfica 3. Tipos generales de desarrollo de brote durante aclimatización de plántulas de aguacate Fuerte obtenidas de cultivo "in-vitro"

Se tienen curvas representativas correspondientes a plántulas individuales que muestran los principales tipos de crecimiento desarrollados durante los experimentos de aclimatización. La curva superior refiere a plántulas vigorosas (V) la intermedia a medianamente vigorosas (MV) y la inferior a las poco vigorosas (PV). Estas últimas fueron tratadas durante 6 meses (coincidentes con la temporada fría en Palo Alto, D.F.) mientras que las anteriores se habían comenzado a cultivar 4 meses antes (en los que se presentan las máximas temperaturas del año)



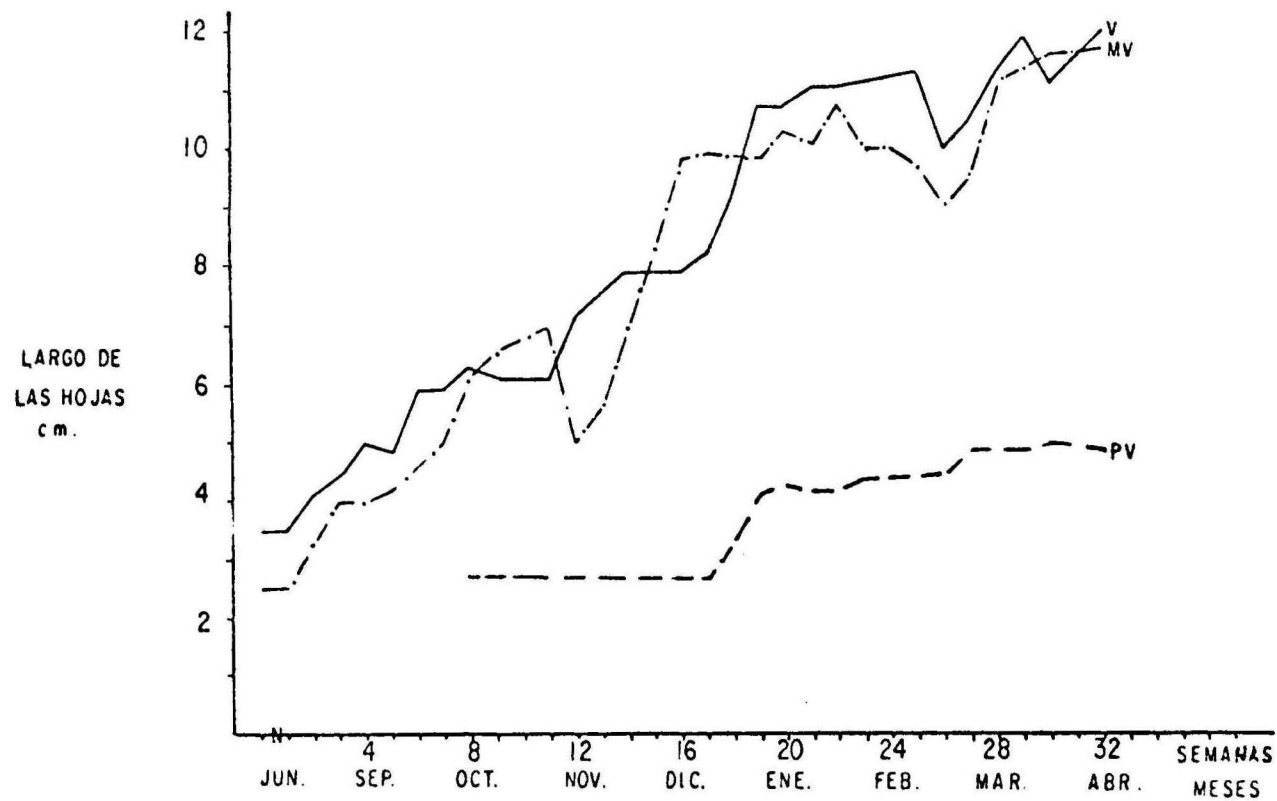
Grafica 4. Número total de hojas durante el curso de la aclimatización de plántulas producidas "in-vitro"

Se describe la cantidad de hojas formadas (número acumulado de hojas) correspondientes a plántulas individuales representativas las cuales concuerdan a su vez con los tipos de crecimiento referidas en la gráfica anterior: vigorosas (V), medianamente vigorosas (MV) y poco vigorosas (PV). El número en el parentesis indica las hojas retenidas al final del seguimiento.



Gráfica 5. Incremento del ancho foliar durante aclimatización de plántulas de aguacate Fuerte provenientes de cultivo "in-vitro"

Se presentan curvas tipo correspondientes a plántulas individuales que describen la variación del ancho promedio de las hojas (madura y semimadura del último flujo de crecimiento) durante 10 meses de cultivo en invernadero para plántulas vigorosas (V), medianamente vigorosas (MV) y durante 6 meses en las poco vigorosas (PV)



Gráfica 6. Incremento de la longitud foliar, en plántulas producidas "in-vitro", durante su aclimatización

Las curvas referidas muestran el patrón de variación en la hoja (madura y semimadura del último flujo de crecimiento), de la longitud promedio correspondiente a plántulas individuales representativas, y que fueron cultivadas en invernadero durante 10 meses en el caso de plántulas vigorosas (V) y medianamente vigorosas (MV) y 6 meses en el caso de las poco vigorosas (PV).

mente vigorosas y de 6 meses en las poco vigorosas se puede dividir como sigue (las gráficas con excepción de una de ellas, están formadas por curvas representativas de cada tipo de crecimiento):

1.- Del tallo principal (brote).

Se observaron 3 grados de crecimiento, las vigorosas en su mayoría alcanzaron desde 24.5 cm hasta 25.0 cm. de altura (Gráficas 1, 3); las medianamente vigorosas desde 7.0 hasta 14.0 cm de altura (Gráficas 1, 3); en cambio las poco vigorosas se caracterizaron por alcanzar desde 5.0 hasta 8.0 cm de altura (Gráficas 2, 3).

2.- De las hojas.

a).- Número de hojas.

En cuanto al número acumulado de hojas (Número total de hojas formadas) se identificaron, como ya se mencionó, 3 grados de crecimiento (Gráfica 4) que son: plántulas vigorosas que desarrollaron hasta 28 hojas, las medianamente vigorosas que formaron hasta 16 hojas, y las poco vigorosas que alcanzaron hasta 13 hojas, aunque cabe hacer notar que para cada caso el número de hojas retenidas finalmente es menor, ya que caían progresivamente las hojas más maduras, quedando entonces: 11, 6, y 8 hojas respectivamente en cada tipo de vigor (Gráfica 4). En general la producción de hojas fué periódica aunque no se determinó el tiempo entre la aparición de cada flujo.

b).- Ancho y largo de las hojas.

En lo referente al ancho y largo alcanzado por las hojas (promedio de la hoja madura y semidura del último flujo de crecimiento; Gráficas 5, 6) de plántulas representativas, se identificaron 2 grados de crecimiento, los que tuvieron hasta 5.0 cm de ancho y 12.0 cm de largo (plántulas vigorosas y medianamente vigorosas) y los que

alcanzaron hasta 1.7 cm de ancho y 5.0 cm de largo (plántulas poco vigorosas).

La apariencia de las plántulas al término del experimento antes de descubrir el sistema radicular para su observación, son mostradas en la figura 7, en la que se observan todas las plántulas - con las que se trabajó, pudiendose distinguir por la apariencia de desarrollo relativo del brote los diferentes tipos de vigor que las caracterizaron: vigorosas (V), medianamente vigorosas (MV) y poco vigorosas (PV).

3.- Características finales del sistema radicular.

En cuanto al sistema radicular desarrollado, después del tiempo de cultivo con los fines de aclimatización ya señalados, se pudieron distinguir 2 tipos de crecimiento que corresponden con el grado de vigorosidad observados en el brote:

a).- Plántulas vigorosas.

Presentan en común una formación radicular abundante y distribuida uniformemente alrededor de la base del tallo de la estaca original (Figura 8); la mayoría de las raíces primarias tenían una longitud aproximada de 12 a 13 cm de largo, aunque algunas alcanzaron tamaños mayores de 23 a 25 cm. Eran de carácter quebradizo y el ápice de la mayoría era blanquecino; la mayor parte de las raíces de cada plántula presentaba raíces secundarias y terciarias. En ocasiones la parte inicial de algunas raíces presentaban color café oscuro lo cual nos haría pensar que se estaban lignificando.

b).- Plántulas medianamente vigorosas y poco vigorosas.

En éstos dos tipos de plántulas el sistema radicular tuvo basi

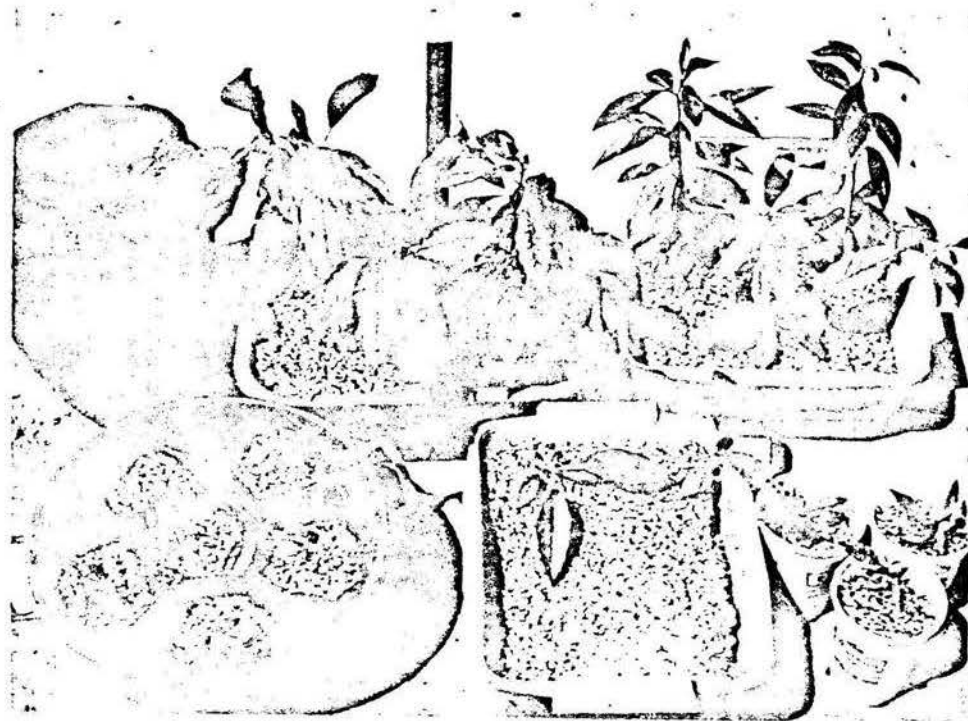


Figura 7. Tipos de desarrollo de brote obtenidos al final de los experimentos.

Se presenta el aspecto final de los grupos de plántulas con las que se trabajó (durante los meses de junio de 1984 a abril de 1985) y entre las cuales se detectaron 3 tipos de desarrollo: poco vigoroso (angulo inferior izquierdo y derecho), medianamente vigoroso - (parte inferior central, y angulo superior derecho en la parte delantera de la tina) y vigoroso (todos los restantes); los cuales corresponden en calidad relativa, a la de los grupos que les dieron origen (ver Figs. 2, 3, 4). Porción visible de la escala: 12 cm.



Figura 8. Desarrollo radicular de plántulas vigorosas al final de los experimentos.

La formación radicular observada en esta clase de plántulas muestra que las raíces emergieron simétricamente alrededor de la base de la estaca original, encontrándose el tamaño de las mismas entre los 12-13 cm de longitud aproximadamente, aunque algunas alcanzaron tamaños mayores (entre 23 y 25 cm); también fué común observar la presencia de numerosas raíces secundarias y algunas terciarias. Porción visible de la escala: 20 cm.

camente el mismo arreglo, caracterizándose por mala distribución de las raíces en la base de la estaca, ya que tendían a salir de un lugar particular (también eran quebradizas y con ápices blanquecinos); se diferenciaban por el tamaño alcanzado de sus raíces, pues las plántulas de mediano vigor presentaban raíces entre los 10 y 11 cm. de largo, pero con algunas alcanzando de 16 a 19 cm (Figura 9); - mientras que las poco vigorosas presentaban raíces primarias de 7 y 8 cm de largo con algunas raíces más grandes (de 12 a 16 cm). - Además en este caso el número de raíces secundarias era menor que en las anteriores.

En la Figura 10, se compara el sistema radicular de plántulas representativas de los tipos, vigorosos y medianamente vigoroso, mostrando a la vez la relación de tamaño existente entre la raíz y el brote lo que indica una relación de crecimiento proporcional.

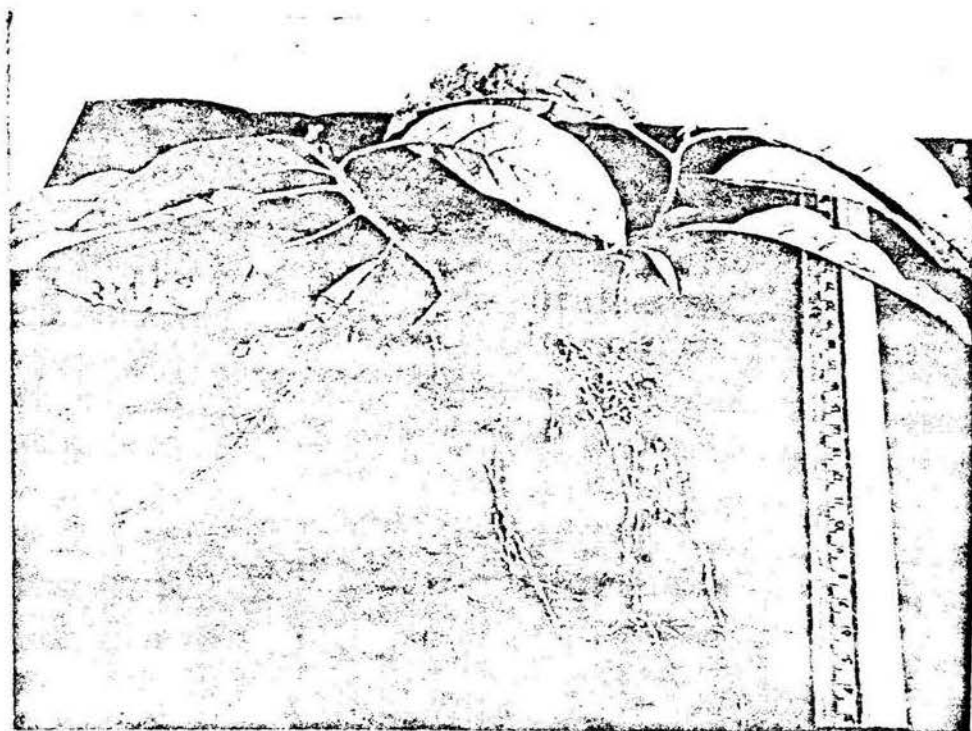


Figura 9. Desarrollo radicular de plántulas medianamente vigorosas.

El tipo de crecimiento radicular desarrollado en estas plántulas permitió observar que el tamaño de la mayoría de las raíces oscilaba entre los 10 y 11 cm de largo, aunque algunas alcanzaban tamaños de hasta 16-19 cm. Mientras que las plántulas poco vigorosas (no mostradas) tenían raíces de 7 y 8 cm de largo principalmente, con algunas más largas (12-16 cm). Sin embargo dos características comunes a ambos grupos de plántulas fué la presencia de raíces que emergían, en su mayoría de una zona limitada en la parte basal de la estaca nodal, además de una menor cantidad de raíces secundarias en comparación con plántulas vigorosas (Escala visible 18 cm).

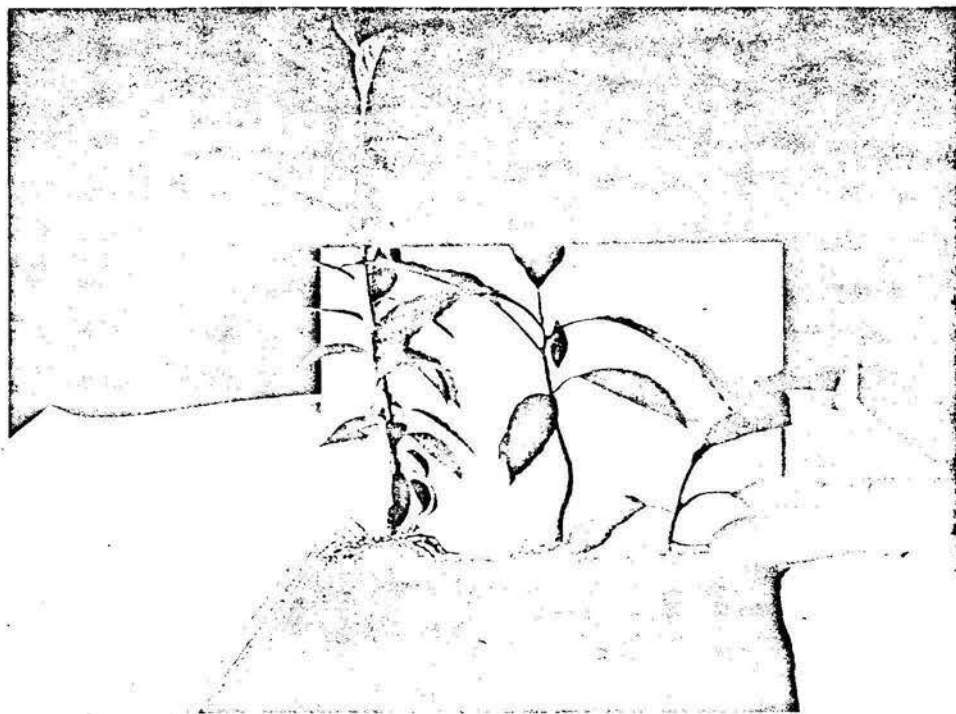


Figura 10. Correlación de desarrollo entre el brote y el sistema radicular.

En la figura se pretende destacar la aparente relación de crecimiento proporcional entre el sistema radicular desarrollado y la parte aérea formada en plántulas producidas in-vitro y aclimatizadas en invernadero. La plántula de la derecha es medianamente vigorosa mientras que al centro aparece la plántula vigorosa. Porción visible de la escala 30 cm.

VI. DISCUSION

A. Obtención de plántulas.

Debido a una serie de problemas, no se pudo producir el número deseado de estacas foliadas y enraizadas (plántulas), lo que fue una limitante para establecer un diseño experimental adecuado; tales problemas son los siguientes:

1.- Foliación in-vitro.

- a) Mala calidad inesperada en las plantas donadoras de estacas nodales etioladas, ya que algunas podrían haber sido debilitadas al utilizarlas en varias ocasiones (para la obtención de brotes etiolados) o bien en otros casos, se usaron plantas muy jóvenes (6 meses) favoreciendo la obtención de brotes en baja cantidad y calidad.
- b) Probablemente las condiciones antes expuestas provocaron un bajo rendimiento de explantes, los que a su vez no respondieron como se esperaba al cultivo in-vitro, ya que una proporción considerable de los explantes en foliación presentaron poca vigorosidad manifiesta en un pobre desarrollo de la parte aérea (Tabla 4)
- c) Un problema frecuente fué la producción de callo tanto basal como a lo largo del explante, lo que pudo haber dado como resultado una foliación incipiente.
- d) Contaminación en ocasiones altas, principalmente en el último lote.

Cada uno de los problemas llevaron finalmente a un pobre rendimiento de explantes, los que presentaron un escaso desarrollo foliar, siendo esto último, probablemente un limitante para la producción de raíces en la estaca foliada, reduciendo por lo tanto las posibi--

lidades de producción de plántulas.

2.- Enraizamiento de estacas foliadas.

Durante este paso se presentaron problemas que también provocaron la pérdida de estacas foliadas.

a) En el invernadero

El necrosamiento de las estacas foliadas usadas para el enraizamiento y aclimatización directos en invernadero bajo nebulización. - fue a) parecer debido a condiciones de anaerobiosis, propiciadas por el substrato utilizado, pues estaba compuesto por arena fina y vermiculita muy pulverizada lo que redujo la cantidad de oxígeno disponible y las posibilidades de enraice.

A pesar de los resultados no satisfactorios observados con ésta práctica, es importante recalcar la necesidad de seguir proponiendo su uso para futuros trabajos, ya que permite obtener en paralelo al enraizamiento de la estaca foliada su aclimatización, reduciendo el tiempo utilizado para la producción de la plántula.

b) In - vitro.

Las diferencias tan marcadas al comparar los porcentajes de enraizamiento reportados en trabajos previos (78.5 y 100%; 4), con lo obtenido en éste trabajo (10%) pueden deberse a causas que provocaron deficiencias en la producción de raíces de las estacas foliadas: mala calidad presentada en las estacas foliadas (por la procedencia del explante), algún problema no evidente en la elaboración del medio de cultivo (como durante el ajuste del pH, por un mal funcionamiento no evidente del potenciómetro, etc.); mala manipulación de las estacas foliadas durante su enraizamiento (al haberlas dejado durante un tiempo excesivo en el medio de cultivo), etc..

Así mismo cuando se compararon los resultados de enraizamiento obtenidos tanto con el lote de estacas subcultivadas en ausencia de hormonas y aquellas subcultivadas en el medio con hormonas, se puede esperar que también estén influenciados por los problemas antes expuestos; por lo que es necesario llevar a cabo más repeticiones de este experimento para darle mayor confiabilidad a los resultados.

3.- Características iniciales de las plántulas.

La mala calidad observada en las plantas donadoras se puede ver reflejada en la heterogeneidad de vigor de las plántulas producidas (Tabla 4; Figuras 2, 3, 4), por lo que es importante que aparte de seleccionar las plantas donadoras de explantes, se deberá caracterizar las estacas foliadas que puedan tener más posibilidades de enraizamiento para así poder desarrollar trabajos de aclimatización en los que se cuente con plántulas homogéneas de calidad selecta.

B. Aclimatización

1.- Adaptación a humedad relativa baja.

Para una mejor comprensión del proceso de adaptación, es importante tener en mente que durante el trasplante de plántulas que provienen de cultivo de tejidos se debe iniciar un proceso de reajuste en la plántula, dado el cambio ambiental drástico al efectuar el trasplante, ya que las condiciones de temperatura, iluminación y humedad son totalmente diferentes a las que se encontraban en el frasco de cultivo cerrado (52, 71, 79); considerando además que las plántulas que provienen de cultivo de tejidos presentan serias deficiencias en cuanto al funcionamiento de los estomas, que

al no ser capaces de modular su apertura (al ser estimulados por un cambio de humedad relativa, intensidad luminosa y/o temperatura) pueden permitir bajo condiciones particulares, pérdidas considerables de agua no repuesta por la raíz (30, 79); también pueden presentar deficiencias en cuanto a cantidad de cera cuticular (que incluso puede estar ausente) lo que también contribuye a la pérdida excesiva de agua (8, 79); aunado a ello el sistema radicular puede no tener una conexión verdadera con el sistema vascular (2, 19) o bien no estar suficientemente desarrollado para absorber el agua necesaria y reponer la que se pierde por transpiración o por algún otro medio; promoviéndose entonces condiciones de desbalance hídrico con una consiguiente deshidratación de los tejidos.

Dado el caracter positivo de los resultados de adaptación, es razonable entonces entender que la aclimatización a humedad relativa baja en las condiciones usadas, se desarrolló de manera gradual y que en el principio del trasplante, la plántula de aguacate estuviera sometida a un proceso gradual de adaptación a las condiciones normales de invernadero, las que fue necesario controlar en lo posible para atenuar condiciones ambientales extremas que pudieran provocar la muerte de la plántula. Durante este proceso debieron de realizarse en la plántula una serie de cambios: producción de cera cuticular en la hoja, tanto en las presentes como en las del nuevo crecimiento e inducción de un funcionamiento adecuado tanto de los estomas como de la raíz.

Por otra parte el hecho de que algunas plántulas se adaptaran totalmente a las condiciones de invernadero estuvo, al parecer, relacionado con el vigor y grado de desarrollo radicular, lo que pudo influir en una mayor ó menor resistencia a las condiciones ambientales extremas, es por eso que en el caso de las plántulas vigorosas y medianamente vigorosas se tuvieron menos perdidas (2 de un total de 13), mientras que entre las poco vigorosas fué mayor (6 de un

total de 14).

La menor resistencia observada en las plántulas poco vigorosas se pudo evidenciar por su exposición a una temperatura alta la que, cuando fue extremosa, principalmente en las primeras semanas posteriores al transplante, provocó una deshidratación excesiva no compensable. Por el lado opuesto las bajas temperaturas, de las próximas semanas no favorecieron el desarrollo nuevo de raíz y hojas que propiciaran la adaptación.

2.- Reinicio del crecimiento.

A la par que se fuerón adaptando las plántulas a los cambios ya mencionados, también debieron desarrollarse en ellas una serie de reajustes fisiológicos necesarios para que las plántulas reiniciaran y continuaran su crecimiento de manera más cercana a la normal, reajustes que entre otros se puede mencionar al cambio de nutrición de manera heterótrofa a autótrofa ó cuando menos auxótrofa (51, 58, - 79). Interviniendo en éstos reajustes y de manera conjunta la solución nutritiva y el substrato utilizado, al proveer condiciones tales que permitieran la absorción de nutrientes y el desarrollo radicular.

Por otra parte se pudo detectar que el reinicio del crecimiento manifestó cierta relación con el tipo de vigor presentado por las plántulas, dado que en las vigorosas el crecimiento fué casi continuo, mientras que en las medianamente vigorosas y poco vigorosas sí se observó un detenimiento más prolongado del crecimiento.

C. Aceleración del crecimiento.

La aparente falta de respuesta (Gráficas 1, 2; Figura 7) - observada con la aplicación de los diferentes tratamientos (vita--

minas y hormonas) para acelerar el crecimiento de las plántulas se debió posiblemente a lo inadecuado de:

1.- Los tratamientos.

- a) Es posible que el nivel aplicado de las vitaminas u hormonas no sea el que se requiera y sea necesario utilizar niveles diferentes en posteriores trabajos.
- b) Las sustancias usadas no fueron las necesarias.
- c) O bien es probable que las sustancias utilizadas si sean necesarias pero que también se requieran algunas otras que al actuar en conjunto den la aceleración del crecimiento deseado.
- d) Pudiera ser que la falta de respuesta a la aplicación de los tratamientos usados no fué detectado debido a que el tiempo de su aplicación y observación no fué el adecuado, aunque se esperaba fuera suficiente debido a los conocimientos que se tienen de como responde un tejido bajo cultivo in-vitro.
- e) Es posible que la forma de aplicación (principalmente en el caso del GA_3) no fuera el adecuado para su utilización por la plántula.

2.- Condiciones ambientales de adaptación.

- a) Aún cuando se trataron de eliminar en lo posible condiciones extremas, no se pudo mantener condiciones continuas favorables, lo que puede ser problemático aún para que se de un crecimiento sostenido ya que la plántula quedó expuesta a tensiones de diferente naturaleza que pueden interrumpir el crecimiento y con mayor razón impedir un crecimiento acelerado; y esto es principal

mente aplicable a la temperatura, que a lo largo de la experimentación no fué siempre favorable para el desarrollo acelerado de la plántula.

3.- Las características de la población de plántulas.

- a) El tamaño tan pequeño de la población usada en cada uno de los tratamientos hizo difícil la apreciación de un posible efecto.
- b) Los diferentes tipos de vigor de las plántulas con las que se contaba y el comportamiento variable en grupos de plántulas de un mismo tratamiento y vigor impidió realizar análisis comparativos entre los tratamientos por lo que fué necesario, cuando se requirió seleccionar un nivel, basarse principalmente en lo recomendado por la bibliografía.

D.- Características generales del desarrollo de las plántulas durante el experimento

A pesar de que no se logró la aceleración del crecimiento de las plántulas producidas in-vitro si fué posible que se continuara dicho crecimiento (Figuras 1, 2, 3, 4, 5, 6), lo que no había sido posible observar en trabajos previos; ésto permitió llevar un seguimiento del desarrollo en las plántulas en donde se pudo observar que el tipo de vigor presentado en un principio por la plántula siguió predominando hasta el final del experimento (Figuras 2, 3, 4, 7), detectándose que las plántulas vigorosas son las que más se acercan, al tamaño de brote deseado para aplicar el injerto. Pero una limitante relacionada con éste aspecto, es que en el caso de plántulas poco vigorosas, al menos en el tiempo de experimentación, no lograron alcanzar cuando menos el desarrollo de plántulas con mediano vigor (Figura 7; Gráfica 3).

1.- Características del sistema radicular.

El sistema radicular finalmente obtenido (Figura 8) en las plántulas vigorosas va de acuerdo con lo requerido en plántulas - que provienen de propagación vegetativa ya que promete un buen - anclaje y funcionalidad: el color blanquecino de los ápices es - indicio de su sanidad y actividad; una desventaja pudiera ser el caracter quebradizo de la raíz lo que habla de su inmadurez.

El desarrollo adecuado del sistema radicular en éstas plántulas vigorosas posiblemente se debió a la acción conjunta de dife-
rentes factores: alto vigor inicial, características nutriciona-
les de los tratamientos (ya que la tiamina es recomendada para -
el crecimiento radicular), el substrato adecuado y las condicio-
nes ambientales que aunque no fueron ideales sí permitieron tal -
desarrollo. El tipo de vigor presentado en el brote estuvo co-
rrelacionado como era de esperarse con el grado de desarrollo del
sistema radicular (Figura 10).

VII. CONCLUSIONES.

- 1.- Los estudios de aclimatización fueron aplicados a plántulas de aguacate (Fuerte) que mostraron diferentes grados de vigor.
- 2.- La capacidad de aclimatización de las plántulas a condiciones de invernadero dependió de: a) la disminución gradual de la húmedad relativa y b) el aumento también gradual de la temperatura e intensidad luminosa ya que las plántulas fueron capaces - de tolerar progresivamente temperaturas mayores.
- 3.- El tiempo mínimo necesario para la adaptación a húmedad relativa baja de las plántulas vigorosas y medianamente vigorosas, - bajo las condiciones de nuestra experimentación fué de 5 a 6 - meses, con una sobrevivencia del 77%; en el caso de las plántulas poco vigorosas (de las que sobrevivieron el 57%) su aclimatización fué parcial ya que solo pudieron mantener un crecimiento lento sin lograr adaptarse completamente.
- 4.- El reinicio del crecimiento se logró en las plántulas vigoro--sas casi desde el principio de su trasplante y en las medianamente vigorosas y poco vigorosas en un tiempo cercano a los 2 meses, ésto bajo condiciones de suministro constante de húmedad y nutrientes minerales así como usando un substrato que fué capaz de permitir el funcionamiento y desarrollo de la raíz.
- 5.- La sobrevivencia neta considerando la población total de plántulas con las que se experimentó (27) fué del 67%.
- 6.- El análisis de las curvas de desarrollo durante el proceso de la aclimatización mostró que:
 - a) El proceso general del desarrollo se vio retardado por la influencia de la época fría.
 - b) Dentro de un grupo de plántulas con un mismo tipo de vigor

y tratamiento se obtuvieron en cuanto a elongación del brote, respuestas individuales diversas.

- 7.- La necesidad de la aplicación de las vitaminas y hormonas ensayadas en plántulas de aguacate producidas in-vitro para intentar acelerar su crecimiento no fué demostrado.
- 8.- Durante el lapso de 10 meses de experimentación las plántulas mantuvieron proporcionalmente los tipos de vigor de las plántulas originales: vigorosas, medianamente vigorosas y poco vigorosas, pero ni aún las del primer grupo alcanzaron las características injertables, según el objetivo que se planteó en éste trabajo, no pudiéndose tampoco determinar el tiempo necesario para tal efecto.
- 9.- El desarrollo relativo del brote y la raíz en todos los tipos de vigor obtenidos fué equilibrado siendo el sistema radicular (particularmente el de las plántulas vigorosas) el deseado - (morfológicamente hablando) para plantas propagadas vegetativamente.
- 10.- En resumen y con base a lo antes expuesto éste trabajo permite mayores esperanzas para la aplicación del cultivo de tejidos - en la propagación vegetativa del aguacatero.

VIII. SUGERENCIAS.

Con base a lo dicho anteriormente es necesario realizar diseños experimentales que optimicen los resultados obtenidos, procurando por un lado, contar con plantas donadoras selectas que proporcionen plántulas homogéneas de alta calidad y en cantidad suficiente que permitan a la vez obtener resultados estadísticamente validos; y por otro lado realizar diseños experimentales con las mismas substancias utilizadas pero en niveles de concentración diferentes ó bien ensayar el uso de otros compuestos que puedan influír en las diferentes fases de la aclimatización y en la posible aceleración del crecimiento, pero todo ésto estableciendo condiciones climáticas mejor controladas (temperatura, intensidad luminosa, húmedad, etc.). Idear métodos que permitan llevar el seguimiento del desarrollo radicular y que mejoren aquellos utilizados para el desarrollo del brote.

Por otra parte seguir haciendo ensayos para a la vez de tratar de adaptar en invernadero las estacas foliadas, enraizarlas - ahí mismo, considerando el uso de cama caliente y/o nebulización, etc. ésto con el fin de establecer una tecnología más económica, - menos dependiente del laboratorio.

IX. BIBLIOGRAFIA

- 1.- Alvarez de la Peña, F. J. (1979). El Aguacate. Ministerio de Agricultura, Publicaciones de extensión agraria. Madrid.
- 2.- Allan, P. (1981). Plant propagation through tissue culture. Yearbook, South African Avocado Growers Association. 4: 22-26
- 3.- Allen, K. C. (1945). Studies in the Lauraceae, VI Preliminary survey of the Mexican Central american species. Journal of the Arnold Arboretum. 26, 280
- 4.- Arriaga, D. E. Tesis de Licenciatura, no publicada. UNAM-CONAFRUT
- 5.- Bonner, J. (1967). Principios de Fisiología Vegetal. 5a. ed. Edit. Aguilar, s.a.
- 6.- Brainerd, K. E. y Fuchigami, L. H. (1981). Acclimatization of aseptically cultured apple plants to low relative humidity. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 106(4): 515-518
- 7.- _____ (1981). Leaf anatomy and water stress of aseptically cultured "Pixy" plum grown under different environments. Hort. Science. 16(2):173-175
- 8.- _____ (1982). Stomatal functioning of "in vitro" and greenhouse apple leaves in darkness, manitol, ABA, and CO₂. Journal of experimental Botany. 33(134): 388-392
- 9.- Brokaw, W. H. (1982). Clonal rootstocks: Personal observations and a Peek into the future. Calif. Avoc. Soc. Y.B. 66:81-92
- 10.- Calderon, E. (1977). Fruticultura General. ECA. México.

- 11.- Cameron, S. H. (1955). Propagation of avocado rootstocks. Calif. Avoc. Soc. 39: 113-117
- 12.- Carvalho, F. (1974). El Aguacate. Ed. Ra. México.
- 13.- Chandler, H. W. (1962). Frutales de hoja perenne. 2a ed. Edit. Hispanoamericana. México.
- 14.- Chée, R. y Pool, R. M. (1982). The effects of growth substances and photoperiod on the development of shoot apices of vitis cultured in vitro. Scientia Horticulturae. 16: 17-27
- 15.- CONAFRUT-SARH. (1984). Curso: Propagación de plantas por cultivo de tejidos. Sub. de Inv. y Doc. Dep. de Fitoproducción.
- 16.- Cooke, R. C. (1978). Growth of Persea americana (avocado) "in vitro". In vitro. 14(4): 335-340
- 17.- Cotanceau, M. (1979). Fruticultura. 4a ed. Edit. Gustavo Gili, S. A. Barcelona, España.
- 18.- Clarck, R. J. (1981). Juvenility and plant propagation. International Plant propagators' Society Combined Proceedings. 31: 449-453
- 19.- Debergh, P. C. y Maene, L. J. (1981). A scheme for comercial propagation of ornamental plants by tissue culture. Scientia Horticulturae. 14: 335-345
- 20.- Delplace, E. (1955). Manual de Arboricultura. Ediciones de Occidente, S. A. Barcelona, España.
- 21.- De Ravel D'Escaplón E. y Ballet, R. (1976). Nuevo tratado práctico de fruticultura. 2a ed. Edit. Blume. Barcelona

- 22.- Donnan, A. et al. (1978). Establishment of tissue culture grown plants in the greenhouse environment. Proc. Fla. State Hort. Soc. 91: 235-237.
- 23.- Durán, S. (1976). Replantación de frutales. Edit. Aedos. España.
- 24.- Ernst, A.A. y Holtzhausen. (1978). New promising technique for rooting difficult-to-root avocado (Persea americana, Mill) cuttings. The Citrus and Subtropical Fruit Journal. March: 6-7.
- 25.- Fersini, A. (1975). El cultivo del Aguacate. Edit. Diana, S.A. México.
- 26.- Fossard, de R.A. (1979). Tissue culture for plant propagators. University of new England. Australia.
- 27.- Frolich, F. E. (1951). Rooting Guatemalan avocado cuttings. - Calif. Avoc. Soc. Y.B. 36: 136-138.
- 28.- _____ (1961). Etiolation and the rooting of cuttings Proc. Int. Plant. Prop. Soc. 11: 277-283.
- 29.- _____ (1971-72). Use of the etiolation technique - in rooting avocado cuttings. Calif. Avoc. Soc. 56: 97-109.
- 30.- Fuchigami, L. H. et al. (1981). Abaxial transpiration and - - water loss in aseptically cultured Plum. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 106(4): 519-522.
- 31.- García, V. A. (1975). Cytogenetic studies in the genus Persea (Lauraceae) I. Karyology of seven species. Canad. J. Genet. - Cytol. 17: 173-180.

- 32.- Gillespie, L. H. (1957). Stem-rooting varietal clones by means of "Juvenile growth phase" leafy-stem nurse cuttings. Calif. Avoc. Soc. Y. B. 41: 94-97.
- 33.- Gomez, E. R. (1973). Anatomical aspects of avocado stems with reference to rooting. Proc. Trop. Reg. Am. Soc. Hort. Sci. 17: 23-28.
- 34.- González, R. H. (1985), Inducción de raíz y desarrollo vegetativo de plántulas de aguacate (Persea spp) En: Resúmenes de Ponencias del Primer Congreso Nacional de Ciencias Hortícolas A- C. Hermosillo Son.
- 35.- Grout, B. W. y William, S. (1955). Photosynthetic development of micropropagated strawberry plantlets following transplanting. Ann. of Botany 55: 129-131.
- 36.- Gustafson, C. D. y Kadman, A. (1969-70). Effect of some plant hormones on the rooting capacity of avocado cuttings. Calif. Avoc. Soc. Y. B. 53: 97-100.
- 37.- Gustafson, C. D. (1971-72). Avocado grower's study mission - # 2 to Mexico. Calif. Avoc. Soc. Y. B. 55: 61-67.
- 38.- Haas, A. R. C. (1937). Propagation of the Fuerte avocado by means of leafy-twigs cuttings. Calif. Avoc. Soc. Y. B. 39: 126-132.
- 39.- Hammerschlag, F. (1982). Factors influencing "in-vitro" multiplication and rooting of the plum rootstock myrobalan (Prunus cerasifera, Ehrh). J. Amer. Soc. Hort. Sci. 107(1): 44-47.
- 40.- Hartman, T. H. y Kester, E. D. (1982). Propagación de plantas principios y prácticas. Edit. Continental. México.

- 41.- Ibar, L. (1978). El cultivo del aguacate, chirimoyo y mango. Edit. AEDOS. Barcelona, España.
- 42.- Jacs, W. P. (1979). Plant hormone and plant development. Cambridge University Press.
- 43.- Johnston, J. C. y Frolich, F. E. (1956). Avocado propagation. Calif. Avoc. Soc. Y. B. 40: 89-98.
- 44.- Juscafresa, B. (1973). Arboles frutales. Cultivo y explotación comercial. 4a ed. Edit. AEDOS. Barcelona, España.
- 45.- Kadman, A. y Gustafson, C. D. (1970-71). The use of potassium salt of indolebutyric acid (KIBA) in rooting avocado cuttings. Calif. Avoc. Soc. Y. B. 54: 96-100.
- 46.- Kontaxis, G. D. y C6X, D. (1984). Effect of vitamin B₁ on vegetable transplants. California Agriculture September.
- 47.- Lahav, E. y Kadman, A. (1980). Avocado fertilization International Potash Institute. Bern/Switzerland. Bull. 6: 23.
- 48.- Leal, F. (1978). Enraizamiento de estacas. Agronomía tropical 16(2): 141-145.
- 49.- Levine, B. S. (1982). Desarrollo metodológico para la propagación vegetativa in-vitro del aguacatero. Tesis Licenciatura. UNAM-CONAFRUT.
- 50.- Martínez, R. M. (1972). Fertilización en el cultivo del aguacate (Persea americana, Mill) en el municipio de Sabinas, Hidalgo. Tesis Licenciatura. Universidad Autónoma de Nuevo León.

- 51.- McKeand, S. E. y Allen, H. L. (1984). Nutritional and root development factors affecting growth of tissue culture plantlets of loblolly pine. Physiol. Plant 61: 523-528.
- 52.- McKee, M. T. J. (1981). Physiological aspects of transplanting vegetables and other crops. I Factors which influence re-establishment. Horticultural Abstracts. 51(6): 265-272.
- 53.- _____ (1981). Physiological aspects of transplanting vegetables and other crops. II Methods used to improve transplant establishment. Horticulturae Abstracts. - - 51(6): 355-368.
- 54.- Medina, C. (1978). Frutas Tropicales 1. Abacate. Ital Campinas. Sao Paulo.
- 55.- Miller, V. E. (1967). Fisiología vegetal. Edit. Hispanoamericana. México.
- 56.- Morin, Ch. (1967). Cultivo de árboles frutales tropicales. 2a. ed. Edit. Pacific. Press, S. A. Lima, Perú.
- 57.- Mosella, L. y Jacques, M. J. (1979). Le microboutarage - - "in-vitro" du Pecher (Prunus persica, Batsch): Influence de certains composés phénoliques. C. R. Acad. Sc. Paris. t. - 286 serie D: 567-570.
- 58.- Murashige, T. (1974). Plant propagation through tissue cultures. Ann. Rev. Physiol. 25: 135-166.
- 59.- Ochse, J. et al. (1965). Cultivo y mejoramiento de plantas tropicales y subtropicales. Limusa, México.

- 60.- Pierik, R. L. M. (1975). Vegetative propagation of horticultural crops "in vitro" with special attention to shrubs and trees. Acta Horticulturae. 54: 71-82.
- 61.- Reuveni, O. y Raviv, M. (1980). Importance of leaf retention to rooting of avocado cuttings. J. Amer. Soc. Hort. Sci. - - 106(2): 127-130.
- 62.- Rojas, G. M. (1979). Fisiología vegetal aplicada, 2a. ed. Edit. Mc. Graw Hill. México.
- 63.- Salazar, G.S. et al. (1983). Clonal propagation of the avocado through "Franqueamiento". Calif. Avoc. Soc. 67: 62-72.
- 64.- Schroeder, C. A. (1955). Proliferation of mature fruit pericarp tissue slices in vitro. Science 122(3170): 601.
- 65.- _____ (1968). The longevity of avocado tissue in vitro. Calif. Avoc. Soc. 52: 128-130.
- 66.- _____ (1972-73). Apical and other responses of tissue of avocado in aseptic culture. Calif. Avoc. Soc. Y.B. - 56: 138-141.
- 67.- Shafrir, M. (1969). A new approach to rooting of difficult-to-root avocado cuttings. Hort. Science. 4(23): 97-98.
- 68.- Schopfer, W. H. (1949). Plants and vitamins. Chronica Botanica Company. Waltham, Mass. USA. 61-79.
- 69.- Solares, M. (1976). Cultivo moderno y rentable del aguacate. - Editores Mexicanos Unidos. México.

- 70.- Steiner, A. A. (1980) . The selective capacity of plants for ions and its importance for the composition and treatment of the nutrient solution. Acta Horticulturae. 98: 87-97.
- 71.- Steward, F.C. (1968) . Growth and organization in plants. Addison-Wesley. Publishing Company, USA.
- 72.- Sutter, E. y Langhans, R. W. (1979). Epicuticular wax formation on carnation plantlets regenerated from shoot tip culture. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 104(4): 493-496.
- 73.- _____ (1985). Morphological and chemical characteristics of epicuticular wax on ornamental plants regenerated in vitro. Annals of Botany. 55: 321-329.
- 74.- Takashi Turu. (1963). The aguacate in Mexico. Calif. Avoc. Soc. 47: 169-172.
- 75.- Tsai-Ying Cheng. (1978). Clonal Propagation of woody plant species through tissue culture techniques. Comb. Proc. Int. Pl. Prop. Soc. 28: 139-155.
- 76.- Wardle, J. et al. (1983). "in vitro" acclimatization of aseptically cultured plantlets to humidity J. Amer. Soc. Hort. Sci. 108(3): 386 389.
- 77.- Weis, E. (1984). Short term acclimation of spinach to high temperatures. Plant Physiol. 74: 402-407.
- 78.- Winton, L. Y Huhtinen, O. (1976). Tissue culture of trees. - En: proceedings of life Sciences, Modern Methods in forest genetics. Edit. Miksche J. P. Springer-Verlag, Berlin. - PP. 243-264.

- 79.- Wetzstein, H. et al. (1982). Leaf anatomy of tissue cultured - Liquidambar styraciflua (Hamamelidaceae) during acclimatization. Amer. J. Bot. 69 (10): 1579-1586.
- 80.- Williams, O. L. (1977). The avocados, a synopsis of the genus Persea, sub. Persea. Economic Botany. 31: 315-320.
- 81.- Young, Le Vern. (1961). Vegetative propagation in avocados by means of marcottage and the rooting of cuttings. Calif. Avoc. Soc. Y. B. 45: 63-66.
- 82.- Zentmeyer, W. A. (1962). Field trials for resistance to phytophthora root rot. Calif. Avoc. Soc. Y. B. 46: 88-93.
- 83.- Zentmeyer, W. A. (1971-72). Avocado root rot. Calif. Avocado Soc. Y. B. 55: 29-36.