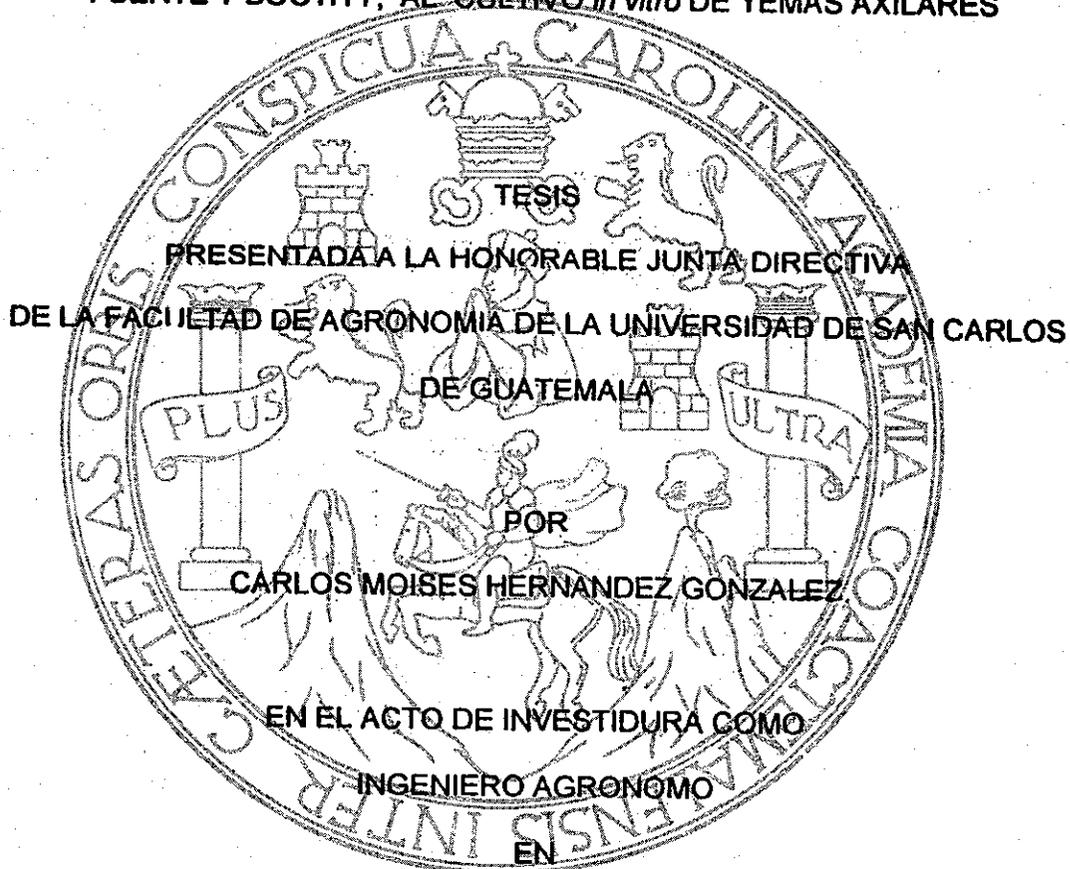


UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE AGRONOMIA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES AGRONOMICAS

RESPUESTA DE LOS CULTIVARES DE AGUACATE *Persea americana* Mill.

FUERTE Y BOOTH 7, AL CULTIVO *in vitro* DE YEMAS AXILARES



SISTEMAS DE PRODUCCION AGRICOLA
EN EL GRADO ACADEMICO DE
LICENCIADO

GUATEMALA, SEPTIEMBRE DE 1999.

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA**RECTOR****Ing. Agr. EFRAIN MEDINA GUERRA****JUNTA DIRECTIVA DE LA FACULTAD DE AGRONOMIA****DECANO****Ing. Agr. EDGAR OSWALDO FRANCO RIVERA****VOCAL PRIMERO****Ing. Agr. WALTER ESTUARDO GARCIA TELLO****VOCAL SEGUNDO****Ing. Agr. WILLIAM ROBERTO ESCOBAR LOPEZ****VOCAL TERCERO****Ing. Agr. ALEJANDRO ARNOLDO HERNANDEZ****VOCAL CUARTO****Br. JACOBO BOLVITO RAMOS****VOCAL QUINTO****Br. JOSE DOMINGO MENDOZA CIPRIANO****SECRETARIO****Ing. Agr. EDIL RENE RODRIGUEZ QUEZADA**

Guatemala, septiembre de 1999.

Honorable Junta Directiva
Honorable Tribunal Examinador
Facultad de Agronomía
Universidad de San Carlos de Guatemala

Señores miembros:

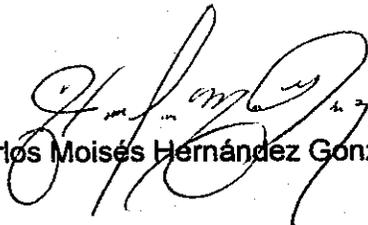
De conformidad con las normas establecidas en la Ley Orgánica de la Universidad de San Carlos de Guatemala, tengo el honor de someter a vuestra consideración, el trabajo de tesis titulado:

**RESPUESTA DE LOS CULTIVARES DE AGUACATE *Persea americana* Mill.
FUERTE Y BOOTH 7, AL CULTIVO *in vitro* DE YEMAS AXILARES**

Como requisito previo a optar al título de Ingeniero Agrónomo en Sistemas de Producción Agrícola, en el grado académico de Licenciado.

Esperando que el presente trabajo de investigación llene los requisitos para su aprobación, me suscribo.

Atentamente,


Carlos Moisés Hernández González

ACTO QUE DEDICO**A:****DIOS****MIS PADRES: LUIS ARTURO HERNANDEZ RODRIGUEZ
 MARIA CECILIA GONZALEZ DE HERNANDEZ****MIS HERMANOS: Efraín Arturo, Silvia Verónica, María Eugenia, Luis
 Gabriel, María Soledad, Ana Victoria, Javier Estuardo
 y Susana Elisabeth.****MIS SOBRINOS: Josúe Salvador, Abdí Isai, Tedy Leonardy, Stephany
 Alejandra, Jennifer Noemí, Dani Fernando y Lourdes
 Aidé.****MIS AMIGOS: Byron González, Ezequiel López, Miguel López,
 Ricardo Calderón, Gustavo Ventura, Baldomero
 Alquijay (Q.E.P.D.).****LA FACULTAD DE AGRONOMIA DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS
DE GUATEMALA.**

AGRADECIMIENTOS

A:

MIS ASESORES:

Ing: Agr. M. Sc. EDGAR MARTINEZ TAMBITO

Ing. Agr. M. C. DOMINGO AMADOR PEREZ

Por la orientación y asesoría del presente trabajo.

DIRECCION GENERAL DE SERVICIOS AGRICOLAS

MINISTERIO DE AGRICULTURA, GANADERIA Y ALIMENTACION

**Por contribuir en mi formación y por el apoyo
económico brindado.**

Ing. Agr. M. Sc. ALVARO GUSTAVO HERNANDEZ DAVILA

Por su valioso y desinteresado apoyo.

CONTENIDO

	Página
INDICE DE CUADROS	viii
INDICE DE FIGURAS	ix
RESUMEN	x
1. INTRODUCCION	1
2. DEFINICION DEL PROBLEMA	3
3. MARCO TEORICO	4
3.1 Marco conceptual	4
3.1.1 Aplicación e importancia de la biotecnología	4
3.1.2 Micropropagación	5
3.1.2.1 Clon	6
3.1.2.2 Fines del cultivo de tejidos vegetales	6
3.1.2.3 El cultivo de tejidos en la propagación clonal	7
3.1.3 Problemas que limitan el desarrollo del cultivo de tejidos	8
3.1.3.1 Factores económicos	8
3.1.3.2 Factores técnicos	9
3.1.4 Técnicas de micropropagación	13
3.1.4.1 Elongación de meristemas, puntas y yemas axilares	13
3.1.4.2 Organogénesis directa	14
3.1.4.3 Embriogénesis somática	15
3.1.5 Medios de cultivo	16
3.1.5.1 Sales inorgánicas	17
3.1.5.2 Vitaminas	18
3.1.5.3 Reguladores de crecimiento	19
3.1.5.4 Aminoácidos	20
3.1.5.5 Carbohidratos	21
3.1.5.6 Agua	21
3.1.5.7 Agentes solidificantes	21
3.1.5.8 Suplementos no definidos	22
3.1.6 Factores físicos del ambiente	23
3.1.6.1 Necesidades de luz	23
3.1.6.2 Influencia de la temperatura	25
3.1.7 Descripción del cultivo del aguacate	25
3.1.7.1 Origen y dispersión	25
3.1.7.2 Clasificación botánica	26
3.1.7.3 Descripción botánica	26
3.1.7.4 Grupos ecológicos	30
3.2 Marco referencial	32
3.2.1 Localización del experimento	32
3.2.3 Cultivares a utilizar	32
3.2.3.1 Cultivar Fuerte	32
3.2.4.2 Cultivar Booth 7	33
4. OBJETIVOS	34
5. HIPOTESIS	35

6. METODOLOGIA	36
6.1 Fases de investigación	36
6.1.1 Fase I: Control de oscurecimiento oxidativo	36
6.1.1.1 Tratamientos de la fase I	36
6.1.1.2 Repeticiones de la fase I	37
6.1.1.3 Medio de cultivo para la fase I	37
6.1.1.4 Procedencia del material vegetal	38
6.1.1.5 Colecta del material vegetal	38
6.1.1.6 Preparación y lavado del material vegetal	38
6.1.1.7 Solución antioxidante	38
6.1.1.8 Desinfección del tejido	39
6.1.1.9 Siembra del material vegetal	39
6.1.1.10 Incubación de los cultivos	39
6.1.1.11 Unidad experimental	40
6.1.1.12 Variables respuesta de la fase I	40
6.1.1.13 Toma de datos	40
6.1.2 Fase II: Inducción y crecimiento de brotes adventicios	40
6.1.2.1 Tratamientos de la fase II	40
6.1.2.2 Repeticiones de la fase II	41
6.1.2.3 Medio de cultivo para la fase II	41
6.1.2.4 Siembra del material vegetal	42
6.1.2.5 Incubación de los cultivos	42
6.1.2.6 Unidad experimental	42
6.1.2.7 Variables respuesta de la fase II	42
6.1.2.8 Toma de datos	42
6.1.2.9 Análisis de la información	43
7. RESULTADOS Y DISCUSION	44
7.1 Fase I: Control de oscurecimiento oxidativo	44
7.1.1 Explantes con oscurecimiento oxidativo en la fase I	44
7.1.2 Explantes verdes en la fase I	45
7.1.3 Selección de los mejores tratamientos de la fase I	49
7.2 Fase II: Inducción y crecimiento de brotes adventicios	49
7.2.1 Explantes con oscurecimiento oxidativo en la fase II	50
7.2.2 Explantes verdes en la fase II	51
7.2.3 Respuesta de los explantes	55
7.2.3.1 Crecimiento de los explantes	55
7.2.3.2 Formación de brotes	55
7.2.3.3 Ausencia de respuesta	56
7.2.4 Comparación de la respuesta de los explantes al cultivo <i>in vitro</i>	59
7.2.4.1 Explantes vivos en la fase I	59
7.2.4.2 Explantes vivos en la fase II	59
7.2.4.3 Explantes que presentaron respuesta	59
8. CONCLUSIONES	61
9. RECOMENDACION	62
10. BIBLIOGRAFIA	63
11. APENDICE	65

INDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1.	Contenido de la pulpa del fruto del aguacate.	30
2.	Tratamientos de la fase I, para los explantes de los cultivares de aguacate Fuerte y Booth 7.	37
3.	Tratamientos de la fase II, para los explantes de los cultivares de aguacate Fuerte y Booth 7.	41
4.	Respuesta de las yemas axilares de aguacate <i>Persea americana</i> Mill. cv. Fuerte, en medio basal MS líquido, suplementado con diferentes combinaciones de BAP y GA ₃	46
5.	Respuesta de las yemas axilares de aguacate <i>Persea americana</i> Mill. cv. Booth 7, en medio basal MS líquido, suplementado con diferentes combinaciones de BAP y GA ₃	46
6.	Respuesta de las yemas axilares de aguacate <i>Persea americana</i> Mill. cv. Fuerte, y Booth 7, en medio basal MS líquido, utilizando el mejor tratamiento según el cultivar	49
7.	Respuesta de las yemas axilares de aguacate <i>Persea americana</i> Mill., cv. Fuerte, en medio basal MS sólido, suplementado con diferentes combinaciones de AIB y BAP	52
8.	Respuesta de las yemas axilares de aguacate <i>Persea americana</i> Mill., cv. Booth 7 en medio basal MS sólido, suplementado con diferentes combinaciones de AIB y BAP	52
9	Tipos de respuesta obtenidos a partir de yemas axilares de aguacate <i>Persea americana</i> Mill., cv. Fuerte, en el medio basal MS sólido, suplementado con diferentes combinaciones de AIB y BAP	56
10	Tipos de respuesta obtenidos a partir de yemas axilares de aguacate <i>Persea americana</i> Mill., cv. Booth 7, en el medio basal MS sólido, suplementado con diferentes combinaciones de AIB y BAP	57
11	Prueba de medias del porcentaje los explantes de aguacate <i>Persea americana</i> Mill., cv. Fuerte y Booth 7	60
12-A	Requerimientos del medio de cultivo basal de Murashige y Skoog	71
13-A	Requerimientos de las soluciones concentradas de concentración conocida	72

INDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Respuesta de las yemas axilares de aguacate <i>Persea americana</i> Mill. cv. Fuerte, en medio basal MS líquido, suplementado con diferentes combinaciones de AIB y GA ₃	47
2	Respuesta de las yemas axilares de aguacate <i>Persea americana</i> Mill. cv. Booth 7, en medio basal MS líquido, suplementado con diferentes combinaciones de AIB y GA ₃	48
3	Respuesta de las yemas axilares de aguacate <i>Persea americana</i> Mill. cv. Fuerte, en medio basal MS sólido, suplementado con diferentes combinaciones de AIB y BAP	53
4	Respuesta de las yemas axilares de aguacate <i>Persea americana</i> Mill. cv. Booth 7, en el medio basal MS sólido, suplementado con diferentes combinaciones de AIB y BAP	54
5	Tamaño promedio de elongación de los explantes de aguacate <i>Persea americana</i> Mill. cv. Fuerte y Booth 7, cultivados en medio basal MS, suplementado con diferentes combinaciones de AIB y BAP	58

"RESPUESTA DE LOS CULTIVARES DE AGUACATE *Persea americana* Mill.

FUERTE Y BOOTH 7, AL CULTIVO *in vitro* DE YEMAS AXILARES "

"RESPONSE OF AVOCADO *Persea americana* Mill., VARIETIES

FUERTE AND BOOTH 7, TO *in vitro* CULTURE OF AXILLARY BUDS"

RESUMEN

Se estudió la respuesta de yemas axilares de aguacate *Persea americana* Mill., de los cultivares Fuerte y Booth 7, al cultivo *in vitro*. Este trabajo se llevó a cabo en el laboratorio de Cultivo de Tejidos de la Facultad de Agronomía de la Universidad de San Carlos de Guatemala, durante los meses de noviembre de 1998 a abril de 1999.

El estudio se dividió en dos fases, la primera consistió en el control del oscurecimiento oxidativo y adaptación del material vegetal al medio de cultivo. En esta fase se utilizó el medio basal de Murashige y Skoog (MS), en forma líquida (con los macronutrientes al 50 % de la dosis recomendada), suplementado con ocho concentraciones de la citocinina bencil aminopurina (BAP) y la giberelina ácido giberélico (GA₃).

La fase II, consistió en la inducción y crecimiento de brotes adventicios; aquí se utilizó el medio basal MS sólido (con los macronutrientes al 50 % de la dosis recomendada), suplementado con dieciséis concentraciones de la auxina ácido indolbutírico (AIB) y la citocinina bencil aminopurina (BAP).

La fuente de los explantes fueron plantas injertadas de un año de edad, de cada uno de los cultivares evaluados; dichas plantas se mantuvieron bajo condiciones controladas de fitosanidad, fertilización, riego, etc.

El tamaño inicial de los explantes fue de 10 mm, dichos explantes se mantuvieron bajo condiciones de incubación dentro de tubos de ensayo. Los explantes fueron subcultivados a cada 3 semanas, haciendo un total de 3 subcultivos.

En la fase I, el oscurecimiento oxidativo de los explantes fue alto, 79 % del total de explantes, para el cultivar Fuerte y 73 % para el cultivar Booth 7. El porcentaje de explantes que se conservaron verdes para el cultivar Fuerte fue de 21 % y un 27 % para el cultivar Booth 7.

Para la fase II, los porcentajes de oscurecimiento oxidativo del total de explantes, fueron 69 % y 72%, mientras que los porcentajes de explantes verdes fueron 31 % y 28 %, para los cultivares Fuerte y Booth 7, respectivamente.

Del total de explantes que se conservaron verdes, un 9 % presentó elongación, en ambos cultivares; en un 1 % y 3 % del total de explantes, se obtuvieron brotes, para los cultivares Fuerte y Booth 7. Un 21 % del total de explantes solamente se mantuvo verde (sin presentar elongación o brotes), para el cultivar Fuerte, mientras que para el cultivar Booth 7, este porcentaje fue de 16 %.

Los cultivares Fuerte y Booth 7, no presentaron diferencias significativas, en cuanto a la respuesta de las yemas axilares, al cultivo *in vitro*. En base a la prueba de medias de T, los porcentajes de explantes vivos en la fase I y fase II, y explantes con respuesta, fueron estadísticamente iguales.

1. INTRODUCCION

Guatemala es reconocida como un país que contiene alta diversidad genética en cuanto a la flora, debido a la posición geográfica que ocupa así como a su compleja topografía. De esta manera en sus catorce zonas ecológicas de vida se pueden encontrar abundantes taxa. (1)

Pese a la abundante riqueza fitogenética en Guatemala, poca investigación se ha desarrollado de ésta. Los árboles frutales no escapan de la realidad antes mencionada, a pesar de que pueden constituirse en una alternativa de ingresos económicos para nuestro país, o también como fuente valiosa de alimentos para nuestra población. (6)

El aguacate *Persea americana* Mill., es un árbol de hoja perenne, de fruta subtropical que produce una de las contribuciones más extraordinarias y nutritivas de Mesoamérica al suplemento alimenticio mundial. (20)

Guatemala dadas sus características topográficas, climáticas y edafológicas es considerada como uno de los centros de origen del aguacate, junto con el resto de países centroamericanos y México. (9) De esta región se han seleccionado materiales con fines de mejoramiento genético por países en donde esta especie ha sido introducida. (13) De esta manera se han hecho selecciones de alto valor económico obteniéndose variedades comerciales como: Nabal, Panchoy, Hass, Fuerte, Booth 7 y Booth 8.

El método tradicional de propagación de aguacate es por medio del injerto. Sobre patrones obtenidos a partir de semillas, son injertadas variedades productoras, pero los resultados obtenidos no son los esperados, en cuanto a producción y resistencia a patógenos.

Una de las técnicas más eficientes en la propagación clonal de plantas, es el cultivo de tejidos vegetales, la cual consiste en cultivar diferentes porciones de una planta en un medio nutritivo artificial, bajo condiciones asépticas y en condiciones controladas de luz, temperatura y humedad relativa. Bajo los postulados de la totipotencia celular, en donde toda célula posee toda la información genética para regenerar plantas completas, los tejidos así cultivados pueden ser multiplicados en forma masiva. Las principales ventajas de esta novedosa técnica se centran en la obtención de plántulas libres de patógenos y con la misma identidad genética de la planta madre. (8)

La investigación estudió la respuesta de los cultivares de aguacate, Fuerte y Booth 7, al cultivo *in vitro*, usando como explantes yemas axilares. El medio basal de cultivo utilizado fue el de Murashige y Skoog, líquido y sólido, suplementado con tres tipos de reguladores de crecimiento: auxinas, giberelinas y citocininas (AIB, GA₃ y BAP), en distintas concentraciones.

Existen limitantes, para el cultivo *in vitro* de yemas axilares de aguacate, tales como el oscurecimiento oxidativo, el cual es debido a la oxidación de compuestos fenólicos, lo cual es una característica típica de las plantas con crecimiento secundario (leñosas).

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El método tradicional de propagación del cultivo de aguacate *Persea americana* Mill., es por medio del injerto. Las plantas utilizadas como patrones provienen de semillas de las cuales no se conoce su procedencia. Posteriormente se injertan variedades productoras conocidas sobre éstos patrones desconocidos, pero las plantas obtenidas, no producen los resultados esperados, en cuanto a resistencia a plagas y enfermedades y especialmente en cuanto a fructificación.

Debido a lo anterior, se hace necesaria la búsqueda de métodos de propagación clonal, en los cuales mediante la aplicación de inductores, se estimula el crecimiento y brotación de los explantes, permitiendo obtener una gran cantidad de plantas en poco tiempo. Por lo que en el presente trabajo, se estudió la respuesta de las yemas axilares de aguacate al cultivo *in vitro*, como una medida tendiente a desarrollar tecnología para mejorar el proceso de propagación del cultivo.

3. MARCO TEORICO

3.1 MARCO CONCEPTUAL

3.1.1 Aplicación e importancia de la biotecnología en el desarrollo agrícola.

Según Vásquez, Carrillo y Mejía (26), la biotecnología es un conjunto de técnicas que incluyen la manipulación de organismos o parte de ellos con el fin de integrarlos al proceso de producción; la cual basa su desarrollo en importantes descubrimientos y estudios hechos en las ciencias biológicas como la Fisiología y la Genética.

Los estudios desarrollados sobre genética molecular por O. T. Avery y por Jim Watson y Francis Crik, acerca de la estructura y composición del material genético, permitieron sentar las bases del término acuñado por Morgan, de Totipotencia Celular, refiriéndose a la capacidad que tiene una célula de desarrollar por regeneración un organismo completo. (26)

Como producto de este desarrollo científico hubo un subsecuente desarrollo tecnológico, que concluyó en la adopción y constante especialización de un conjunto de técnicas, que van desde sencillas en relación a niveles, implementos y capacitación del personal, como podrían ser el cultivo de meristemas y hojas *in vitro*; hasta fascinantes y complejas como la del ADN recombinante o Ingeniería Genética. (26)

Todo este desarrollo tuvo lugar en países como Estados Unidos, Japón y Francia entre otros, donde fueron invertidos multimillonarias sumas de dinero en su fase investigativa y recientemente en la comercialización de los productos al tercer mundo como un mercado potencial. (26)

En general se puede afirmar que la importancia de esta técnica, radica en que a medida que en su conjunto se integren grupos multidisciplinarios en el cultivo, se hacen más eficaces y eficientes los sistemas productivos en general. Por citar un ejemplo, en Inglaterra en 1,968 fueron propagadas con un escaso número de patrones más de un millón de plantas con genotipos de alta productividad de manzanas y melocotón en un período de un año, lo cual hubiera sido técnicamente imposible por cualquier técnica de propagación antes conocida. (27, 26)

En Guatemala cuyo sustento económico es la actividad agrícola, es de esperarse que la Biotecnología alcance una gran aplicación, sustentado principalmente en el mejoramiento genético de cultivos de exportación, basándose principalmente en las técnicas más sencillas y de menores volúmenes de inversión como el cultivo *in vitro* de puntas meristemáticas, yemas axilares y hojas. (26)

3.1.2 Micropropagación

La palabra micropropagación, utilizada por primera vez en 1968 por Hartman y Kester en su conocido libro sobre propagación de plantas, parece haber ganado una amplia aceptación como término general para designar varias de las técnicas utilizadas en la multiplicación *in vitro*. (8)

Originalmente, la micropropagación se definió como "cualquier" procedimiento aséptico que comprenda la manipulación, en las plantas, de órganos, tejidos o células que produzcan poblaciones de plántulas y que permitan el desvío tanto del proceso sexual normal como de la propagación vegetativa no aséptica que se practica convencionalmente. La micropropagación es prácticamente una multiplicación masiva *in vitro*. (8, 27)

La micropropagación clonal implica que cada una de las plántulas que se produce pueda crecer y ser fenotípica y genotípicamente idéntica a la planta original de la que se deriva. (8)

3.1.2.1 Clon.

Actualmente el código oficial de la nomenclatura de las plantas cultivadas define la palabra clon como: "un conjunto genéticamente uniforme de individuos, originalmente derivados de un solo individuo mediante propagación asexual, por ejemplo, por medio de estacas, divisiones, injertos o apomixis obligada". (8)

3.1.2.2 Fines del cultivo de tejidos vegetales.

Los principales fines del cultivo de tejidos vegetales son: la micropropagación masiva, el mejoramiento genético y la producción de metabólicos secundarios. (25)

A. Micropropagación masiva.

Básicamente, todas las células vegetales poseen la característica de la totipotencia, es decir la capacidad de desarrollar una planta completa mediante el proceso de regeneración. Existen técnicas convencionales de propagación que utilizan esta característica particular de las plantas, tal como la injertación con todas sus variantes. Así también la técnica de cultivo de tejidos vegetales utiliza esta característica, aunque más eficientemente que las técnicas tradicionales, debido a que proporciona un ambiente artificial favorable para el desarrollo de las plantas. (25)

a. Ventajas de la micropropagación masiva.

Las ventajas en comparación con los sistemas convencionales de propagación son:

- Incremento acelerado del número de plantas derivadas por genotipo.
- Reducción del tiempo de multiplicación.

- Posibilidad de multiplicar grandes cantidades de plantas en una superficie reducida, a bajos costos y en tiempos económicamente costeables.
- Mayor control sobre la sanidad del material que se propaga.
- Facilidad para transportar el material *in vitro* de un país a otro, con menos restricciones aduaneras.
- Posibilidad de multiplicar rápidamente una variedad de la cual sólo existan pocos individuos.
- Normalmente, se eliminan diversas enfermedades en el proceso, por consiguiente, facilita la producción y la calidad de las plantas.
- Se puede propagar en cualquier época del año y/o medio ambiente.
- Permite planificar la producción de acuerdo con la demanda. (25, 27)

3.1.2.3 El cultivo de tejidos en la propagación clonal.

Dentro de los métodos de propagación existentes, la propagación sexual posee grandes ventajas sobre el desarrollo de los recursos fitogenéticos, a través de cruzamientos específicos que permitan la formación de híbridos con buenas características productivas, siempre y cuando se garanticen adecuadamente las características genéticas de las líneas o cultivares producidos, mediante un adecuado proceso de producción y certificación de los mismos. Desafortunadamente, para muchas especies de árboles, la producción de semillas genéticamente puras a un bajo costo y en gran cantidad es técnicamente difícil, sobre todo en aquellas especies que poseen polinización cruzada (alógamas). Para estas especies la clonación de árboles maduros puede ser una buena opción, que a la vez puede conjugarse con técnicas de cruzamiento dirigidas (polinización artificial). Dentro de este contexto los métodos de propagación asexuales tradicionales como la producción de estacas acodos e injertos son efectivas cuando se requiere únicamente de un número reducido de individuos o cuando existe a disposición suficiente material vegetal para satisfacer los requerimientos de producción, sin embargo la propagación de genotipos silvestres prometedores y el desarrollo de los mismos es bastante pausado, a menos que se logre incorporar técnicas de propagación más efectivas como lo es la propagación *in vitro*.

3.1.3 Problemas que limitan el desarrollo del cultivo de tejidos en plantas con crecimiento secundario.

De acuerdo a Randolph y otros (17), son dos los factores que afectan el desarrollo de cultivo de tejidos, tanto a nivel de investigación como comercial: Los factores económicos y los factores técnicos.

3.1.3.1 Factores económicos.

A. Costos por labor.

Los costos por labor constituyen la más grande limitante para la micropropagación a gran escala de plantas leñosas, ya que estos constituyen del 60 % al 80 % de los costos totales. (5, 17)

La forma más viable de reducir dichos costos es reduciendo al mínimo el número de subcultivos ó haciendo más eficiente el desarrollo de las técnicas para micropropagarlos. Un ejemplo ilustrativo de éstos, lo constituye el desarrollo de técnicas para el enraizamiento y desarrollo de brotes en puntas meristemáticas con o sin presencia de auxinas, los cuales, son provocados en diferentes medios de cultivo suplementados con citocininas, los que conducen a una formación rápida de brotes y a un menor número de subcultivos para la liberación de los mismos.

B. La escala de producción.

Si bien es cierto que miles de plantas pueden producirse a partir de un solo explante, el número de subcultivos que deben realizarse para el desarrollo de los mismos, hace técnicamente imposible el logro de los volúmenes considerados como mínimos, que permitan recuperar el alto costo de inversión inicial en

infraestructura, insumos y mano de obra, para que la producción sea económicamente rentable. Para desarrollar esto, se requiere la disposición del suficiente material vegetal considerado como mínimo, para el proceso productivo a gran escala, de tal manera que puedan propagarse miles de plantas en un período relativamente corto.

3.1.3.2 Factores técnicos.

A. Establecimiento del cultivo.

La selección apropiada del material para el establecimiento del cultivo, continua siendo uno de los mayores problemas en algunas plantas, especialmente árboles como coníferas y algunas latifoleadas de los géneros *Juglans*, *Castanea*, *Quercus* y *Distacia*, esto se debe principalmente a que las plantas pueden propagarse hasta que producen frutos y semillas, lo que hace muy difícil su propagación. (4, 5, 17, 22)

Como afirma Roca (19), "la selección del explante esta definida por el objetivo perseguido y la especie vegetal utilizada", si el objetivo final es la obtención de callo, pueden utilizarse una amplia gama de explantes, siempre y cuando pueda inducirse en los mismos la desdiferenciación del tejido, sin embargo para técnicas de producción de órganos directamente, se sugiere utilizar partes que permanecen en crecimiento activo o en constante diferenciación como las puntas meristemáticas y las yemas axilares de los tallos. Los embriones constituyen una buena opción en el caso en que la segregación genética que se da como producto de la unión gamética, no sea un factor aberrante de las plantas propagadas. (19) También debe de tomarse en cuenta que la selección esta ligado a su disponibilidad en el campo, a su fácil manipulación, a su homogeneidad, a su fácil desinfección y a un período de respuesta relativamente corto. (19, 24)

B. Contaminación.

Un continuo problema en las plantas con crecimiento leñoso, es la contaminación durante las fases del cultivo. En las plantas que tienen vellosidad o pubescencia en las puntas meristemáticas y hojas, que es muy común, continúa siendo un verdadero problema. Quizá la parte más importante lo constituye el hecho de que en estas plantas, la contaminación por bacterias pasa inadvertida la mayor parte del tiempo hasta las fases finales del cultivo. (4, 5, 17) Dado que la desinfección o esterilización del tejido influye no sólo en la contaminación o no del mismo, sino también en su capacidad de regenerarse en el medio de cultivo, la técnica de desinfección utilizada, debe de estar orientada a lograr un mínimo de contaminación y oxidación prematura del explante por efectos de plasmólisis. (19)

Existe una amplia gama de compuestos químicos que se pueden utilizar como desinfectantes para los explantes, siendo en la actualidad casi generalizado el empleo de etanol al 70 % y del hipoclorito de sodio comercial con el 1% al 3 % de ingrediente activo. Muchas veces resulta de gran utilidad la aplicación de un agente tensoactivo que disminuya la tensión superficial del agua y permita una mayor penetración del agente desinfectante, como por ejemplo Tween 20 a razón de 4 a 10 gotas por litro. (24)

C. Fenolización del tejido.

Otro problema no menos importante es la decoloración del tejido o explante por la formación de fenoles y polifenoles en el mismo, el cual es apreciado directamente en la decoloración del medio a las orillas del explante. Esto puede ser eliminado utilizando antioxidantes como el ácido cítrico (150 mg/l), sumergiendo los explantes al momento de realizar el lavado, o con carbón activado en dosis de 1000 mg/l en el medio de cultivo. (4, 5, 17)

Bidwell (2), indica que ennegrecimiento del explante es causado por la oxidación de compuestos

fenólicos, en la herida del tejido. Estos compuestos son exudados dentro del medio, son atrapados por el agar y acumulados, formando un área negra alrededor del expante. Esta puede interferir con la absorción de nutrientes, resultando en una inhibición del crecimiento.

Menciona además que al herir o romper los tejidos, se estimula mucho la respiración por tres razones: La primera es la rápida oxidación de los compuestos fenólicos, que tiene lugar cuando la organización que mantiene a éstos sustratos separados de sus oxidasas, se rompe. La segunda, son los procesos normales de glicólisis y catabolismo oxidativo, que aumenta conforme la disrupción de la célula o células causa una mucho mayor accesibilidad de los sustratos, a la maquinaria enzimática de la respiración. Tercero, la consecuencia general de la herida es la reversión de ciertas células al estado meristemático, seguido por la formación de callo y la "curación" o reparación de la herida, tales células y tejidos en activo crecimiento tienen tasas respiratorias muy superiores a los tejidos maduros o en descanso. (2)

Se conocen varias enzimas que oxidan a los fenoles dando quinonas. Dos de los más importantes son la monofenol oxidasa (tirosinasa) y la polifenol oxidasa (catecol oxidasa). Estas enzimas participan en la característica "reacción traumática" de las plantas y contribuyen a la respiración traumática, convirtiendo los fenoles liberados en la herida a quinonas. El color café en la herida (por ejemplo cuando a un tubérculo de papa o una manzana se le hace un corte o se golpea), es un resultado de dicha reacción. Es evidente por la rápida reacción que ocurre al herir, que tanto la enzima como el sustrato, (los cuales parecen ser solubles), deben haber estado apartados uno del otro en la célula normal, aprisionados en diferentes compartimientos celulares. (2)

D. Estabilidad genética.

Debido a que esta variable se origina a nivel celular, la estabilidad genética de las plantaciones

micropropagadas, puede ser un factor fundamental para el desarrollo de plantaciones comerciales de gran escala.

La variación genética y epigenética que se da en los explantes y propágulos, puede dar como resultado un aspecto y comportamiento diferentes a los que se producen por métodos de propagación tradicionales. (8, 17)

En general, la propagación con altas concentraciones hormonales puede causar una mayor variación; también influye en esto el tipo de explante que se utiliza y el tipo de desarrollo del mismo. Se ha demostrado que la propagación por medio de puntas meristemáticas y yemas axilares provocan un mínimo de variabilidad, mientras que por otro lado la formación y regeneración de callo, es desventajosa para la formación de clones fieles al tipo. Para el control de dicha variación Hartman (8), propone el desarrollo de cuatro fases:

- Selección del cultivar: hace referencia a la identificación de la naturaleza y caracteres genéticos, lo cual determinará el sistema de propagación que se escoja.
- Selección del explante específico y su fuente: asegurarse de que el material vegetal utilizado sea del cultivar correcto y que no constituya una variante del mismo.
- Selección del procedimiento de propagación: en general, las técnicas que permiten la regeneración de plantas de manera más rápida y eficiente (cultivo de meristemas y yemas para producir organogénesis o embriogénesis directa), son preferibles a las que incluyen la regeneración del callo, que cuando forma parte del proceso, no debe ser subcultivado más de tres veces.
- Observación de plantas propagadas: al final de la etapa de multiplicación, debe comprobarse por inspección la existencia de plantas aberrantes o fuera del tipo y eliminarse. Esta inspección debe hacerse en todo tiempo y clasificar por uniformidad a las plantas que deben pasar a la etapa de acondicionamiento o pretrasplante. Seguidamente deben realizarse pruebas de descendencia, que garanticen que las plantas producidas son apropiadas para el propósito a que se destinan, para lo cual

puede recurrirse a pruebas como el análisis fenotípico de la progenie o el uso de isoenzimas como marcadores genéticos. (8)

E. Vitrificación.

La vitrificación de los explantes es un problema común en la micropropagación de plantas con crecimiento secundario, que se caracteriza por la acumulación de agua y la apariencia traslúcida de las hojas. Las hojas vitrificadas tienen en apariencia un parénquima de empalizada apropiado, pero poseen grandes espacios intercelulares, la cutícula cerosa es muy delgada y con pocos estomas, de los cuales la mayoría no son funcionales. Bajos niveles de etileno y de vapor de agua en la atmósfera del medio de cultivo, reducen la vitrificación, también puede ser minimizada por la reducción de amonio y de los niveles de reguladores de crecimiento, principalmente citocininas en el medio de cultivo, aunque a su vez se reduce el número de brotes producidos. También puede ser reducida limitando la absorción de agua del explante, aumentando la concentración de agar o usando otro tipo de sostén como el Gelrite. (19)

3.1.4 Técnicas de micropropagación para la formación de clones en plantas con crecimiento secundario.

3.1.4.1 Elongación de meristemos, puntas y yemas axilares.

Este tipo de propagación ocurre generalmente cuando las yemas se encuentran en dormancia, mediante la manipulación de hormonas, principalmente citocininas en el medio de cultivo. Este método es más común en maderas duras que en coníferas, su principal ventaja consiste en que se mantiene un índice adecuado de estabilidad genética, lo que es de gran ayuda para la formación de clones fieles al tipo. Se han propagado patrones de los géneros *Vitis*, *Sequoia* y *Pinus*, entre otros. (4, 17)

El cultivo de meristemas apicales ofrece un rápido y eficiente método para la propagación vegetativa a gran escala de plantas, así como para eliminar las infecciones virales.

Doods (4), señala que entre mayor es el tamaño del explante mayor es la probabilidad de regeneración del mismo, agrega también que un procedimiento que no envuelva el desarrollo de la fase de enclamiento es preferible, porque la inestabilidad genética que incluye el desarrollo de esta fase, puede constituir un factor aberrante para las plantas formadas.

En la mayoría de los casos, el medio basal Murashige y Skoog, propicia un normal desarrollo del explante bajo condiciones del cultivo estándares, generalmente se suplementan reguladores del crecimiento, en especial citocininas, son agregadas también las giberelinas para la iniciación de las yemas y en algunos casos se suplementan concentraciones bajas de auxinas ya que activan la acción de la citocinina. (4. 19, 24)

3.1.4.2 Organogénesis directa.

En la organogénesis directa, la iniciación de brotes es producida y posteriormente son enraizados; raramente se da el caso contrario, (rizogénesis) La iniciación de brotes es producida, generalmente a través de suplementar al medio citocininas (BAP, zeatina, kinetina ó 2IP), sin presencia de auxinas, para su posterior traslado a medio de enraizamiento, en el cual se da el proceso inverso, suplementando al medio con auxinas (ANA, AIB, 2,4-D) y reduciendo o eliminando la presencia de citocininas. (4, 5, 8, 17)

El hallazgo del factor que promovía la división celular, en preparaciones degradadas de ADN, identificado como cinetina por Miller, condujo al estudio realizado por Skoog, en el que se demostró la importancia de las proporciones de auxina:citocinina, en la determinación de la respuesta morfogénica *in vitro*. Una proporción alta de auxina, comparada con la de citocinina, favorecía la formación de raíces,

mientras que una proporción baja, favorecía la formación de yemas. Por otra parte, la adición al medio de ciertos compuestos como la caseína hidrolizada (CH), modificaba la actividad reguladora de las proporciones de los reguladores antes citados, esto sugirió que el balance de ciertos factores, afectaba el proceso de diferenciación, entre los que destaca el explante, el medio de cultivo y el balance hormonal. En cuanto al explante, el tamaño y el desarrollo fisiológico del mismo, son los factores a tomar en cuenta; generalmente, los explantes grandes son más difíciles de esterilizar que los explantes pequeños, pero generalmente los primeros poseen un potencial regenerador considerablemente mayor. En cuanto a la edad fisiológica del explante, el potencial organogénico es inversamente proporcional a su edad fisiológica, es decir, que entre mayor sea la juvenilidad del explante mayor será la probabilidad de obtener una respuesta favorable. (19)

En lo que a medio se refiere, la concentración de sales en el medio, junto con la adición de reguladores del crecimiento, son los factores más importantes, utilizándose medios como el MS, White, Gambor y WPM, preferiblemente para el desarrollo de plantas con crecimiento secundario. (8, 19)

Con una concentración alta de citocininas, en relación a la de las auxinas, se logra la producción de órganos, evitándose la fase de encallamiento, también las giberelinas pueden jugar un papel importante en la producción de brotes laterales, aunque en altas concentraciones puede inhibir la diferenciación del explante. (19)

3.1.4.3 Embriogénesis somática

La embriogénesis somática consiste en la formación de embriones, a partir de células somáticas, que se desarrollan sobre las zonas de corte del explante (embriogénesis directa), o mediante la formación y regeneración de callo (embriogénesis indirecta). Hasta el momento pocas plantas leñosas han sido propagadas por este método, sin embargo, se ha estado desarrollando y perfeccionando principalmente

en coníferas, *Pinus oocarpa* Schiede y *Cupressus lucitanica* L. (4, 5, 17)

La totipotencialidad de las células vegetales cultivadas *in vitro*, fue establecida por Reinert y Steward en 1958, quienes descubrieron la inducción de embriones somáticos derivados de callos, producidos a partir de ápices radicales de zanahoria *Daucus carota* L. Steward señala que la suplementación de auxinas y de agua de coco son importantes para la formación de callos embriogénicos. (19)

El explante, el medio de cultivo y los reguladores del crecimiento son los factores que influyen en el desarrollo de esta técnica. Son pocos los explantes que tienen la habilidad de producir callos embriogénicos, comúnmente se usan plántulas en crecimiento, cotiledones, embriones tanto sexuales como apomicticos, primordios de hoja y ápices caulinares. Se ha logrado producir embriones en plantas con crecimiento secundario, a través del empleo de tejido nucelar y óvulos inmaduros en especies de los géneros *Mangifera*, *Citrus*, *Eugenia* y *Mirciaria*. (19)

En cuanto a los medios de cultivo, el medio MS con algunas modificaciones, en cuanto al aumento de la concentración de sales y de azúcares, ha presentado resultados satisfactorios para el desarrollo de programas de investigación. (19)

3.1.5 Medios de cultivo.

Una vez definido el objetivo perseguido con el cultivo *in vitro* de un determinado explante, es necesario elegir un medio apropiado de cultivo. En general los medios de cultivo se encuentran constituidos por los siguientes componentes (14, 21):

3.1.5.1 Sales inorgánicas.

A. Macronutrientes.

Los tejidos en cultivo requieren de una fuente continua de compuestos inorgánicos. Además de carbono, hidrógeno y oxígeno, los elementos más requeridos son principalmente: N, P, K, Ca, Mg y S.

El nitrógeno se adiciona en grandes cantidades y se encuentra presente en el medio en forma de nitrato o iones de amonio, o la combinación de ambos iones. El sulfato de magnesio ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) satisface tanto el requerimiento de magnesio como el de azufre. El fósforo puede adicionarse en cualquiera de las formas $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ ó KH_2PO_4 . El potasio se encuentra en grandes cantidades en la naturaleza, es un catión que se agrega en forma de KCl, KNO_3 , ó KH_2PO_4 . El calcio se adiciona con $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$ ó la forma anhidra de cualquier sal. El sodio es un catión que no es requerido por plantas superiores, sin embargo, puede ser un elemento esencial para cultivos de halófitas, o plantas C4. El cloro está presente en la forma de KCl ó $CaCl_2$. (21)

B. Micronutrientes:

Para una adecuada actividad metabólica, las células vegetales requieren de micronutrientes. Los más esenciales son: Fe, Mn, Zn, Bo, Cu, Co y Mo. Los últimos cinco elementos son fundamentales para la síntesis de clorofila y la función de los cloroplastos.

El hierro es requerido para la formación de precursores de la clorofila. El manganeso es necesario para el mantenimiento de la ultraestructura y el proceso fotosintético (la actividad del fotosistema II es proporcional al contenido de manganeso). El cobre y cinc son requeridos para la oxidación e hidroxilación de compuestos fenólicos. El molibdeno y hierro forman parte de las enzimas nitrato reductasa y

nitrogenasa. El cobalto es el metal componente de la vitamina B12. El boro es necesario para el mantenimiento de la actividad meristemática, está involucrado en la síntesis de bases nitrogenas, en particular uracilo.

Varios micronutrientes están relacionados con la actividad de los reguladores de crecimiento. Ejemplos: Zn-auxinas (Zn está relacionado con la síntesis de triptófano, precursor del AIA). Deficiencia de boro reprime la síntesis de citocininas, pero aumentan los niveles de auxinas.

Agentes quelatos: son compuestos cuyas moléculas son capaces de detener un ión de un metal con varias uniones químicas, formando un anillo complejo (quelato), ejemplo: EDTA (ácido etilendinitrotetracético). Bajas concentraciones de EDTA estimulan el crecimiento, haciendo que el hierro esté disponible en bajas cantidades. (21)

3.1.5.2 Vitaminas.

Las plantas verdes se consideraban normalmente autótrofas para las vitaminas, pero puede ser necesario añadir al medio algunas de ellas, hasta cuando los cultivos crezcan o se hayan vuelto verdes. En la mayoría de los medios, la tiamina, la piridoxina y el ácido nicotínico, se consideran benéficas y se añaden de forma rutinaria. Las vitaminas son necesarias para llevar a cabo una serie de reacciones catalíticas en el metabolismo y son requeridas en pequeñas cantidades.

Las vitaminas más empleadas son: Tiamina (Vitamina B1), se añade como tiamina HCl, en cantidades que varían de 0.1 a 30 mg/l. Esta es realmente la única vitamina esencial para el crecimiento de células vegetales. Acido Nicotínico (Niacina). Piridoxina (Vitamina B6), se añade como piridoxina-HCl. Mio-inositol, no es propiamente una vitamina, sino un azúcar-alcohol, tiene un efecto estimulante sobre la morfogénesis, partiendo probablemente en la vía biosintética del ácido galacturónico. El ácido pantoténico

ayuda al crecimiento de ciertos tejidos. El ácido fólico disminuye la proliferación de tejido en la oscuridad, mientras que en la luz la aumenta, esto es debido a que en presencia de luz, es hidrolizado a ácido P-aminobenzóico. Riboflavina es inhibidor del crecimiento de raíces. La vitamina E ayuda a la formación de callos que provienen de embriones y en cultivos en suspensión, ayuda a la viabilidad de células. (29)

3.1.5.3 Reguladores del crecimiento.

En cultivo de tejidos se utilizan propiamente cuatro grupos (21):

A. Auxinas.

Las auxinas comprenden una gran familia de sustancias, que tienen en común la capacidad de producir un agrandamiento y alargamiento celular; sin embargo, se ha encontrado al mismo tiempo que promueven la división celular en el cultivo de tejidos. (11)

Entre las auxinas tenemos: ácido indolbutírico (AIB), se utiliza en un rango de 0.1-10 mg/l. Acido indolacético (AIA), se utiliza en un rango de 0.1-10 mg/l. Acido naftalenacético (ANA), ácido 2,4-Diclorofenoxiacético (2,4-D). Acido paracloro fenoxiacético (PCA), se utiliza en un rango de 0.001-10 mg/l. (29)

También se utiliza ampliamente un buen número de sustancias que provocan un efecto fisiológico similar y que se han producido sintéticamente. (11)

B. Citocininas.

Skoog *et al*, propusieron el término cinina como un nombre genérico para sustancias naturales y sintéticas, que presentaban los mismos tipos de actividad biológica que la cinetina (6-furfuril-aminopurina). Con el fin de evitar confusión con el término cinina, según se utiliza en los sistemas animales, un poco más

tarde se adoptó la palabra citocinina para designar las sustancias de división celular. (11)

Las citocininas promueven la división celular y organización de callos. Las más utilizadas son: benciladenina (BA), cinetina y zeatina, en concentración de 0.03-30 mg/l. La BA es la citocinina de empleo más generalizada. La cinetina estimula la formación de brotes y yemas adventicias. (21)

C. Acido giberélico

Luego de su aislamiento a partir del hongo *Gibberella fujikuroi*, el ácido giberélico (AG₃), se convirtió en un tema de intensa investigación, aunque la adición de este compuesto a los medios de cultivo de tejidos, ha sido ocasional, a pesar de sus efectos fisiológicos tan amplios. Se sabe que hay varias giberelinas, relacionadas con el AG₃, que son productos complejos del metabolismo del hongo o de plantas superiores, y que son capaces de intervenir en el crecimiento de muchas plantas ocasionando especialmente un alargamiento celular. (11) El ácido giberélico promueve la elongación y reprime la formación de brotes de cualquier clase de tejido organizado. (21)

D. Acido abscísico.

Se utiliza en casos muy especiales, estimula la sincronización durante la embriogénesis en ciertos cultivos, también inhibe el crecimiento. (21)

3.1.5.4 Aminoácidos.

Ningún aminoácido es esencial para el crecimiento de tejidos *in vitro*, sin embargo existen varios que se han utilizado experimentalmente. Los aminoácidos proporcionan una fuente inmediata de nitrógeno al tejido y su asimilación puede ser más rápida que el nitrógeno inorgánico proporcionado por el medio.

Los aminoácidos también pueden actuar como agentes quelantes. A continuación se indican las funciones principales de los aminoácidos en sistemas *in vitro*. La glutamina y asparagina son transportadores de nitrógeno, L-arginina estimula raíces, L-serina es empleada en cultivo de microsporas y L-cisteína es un agente reductor. (13)

3.1.5.5 Carbohidratos.

Son utilizados como fuente de energía y como reguladores osmóticos. La sacarosa es el azúcar empleado universalmente. Le siguen en importancia glucosa, maltosa, rafinosa, fructuosa, galactosa, manosa y lactosa. (21)

3.1.5.6 Agua.

El agua utilizada para la preparación de soluciones debe ser bidestilada, tridestilada o desmineralizada.

3.1.5.7 Agentes solidificantes.

Comúnmente se ha empleado el agar como un sistema de "soporte", para la preparación de medios sólidos o semisólidos. Las ventajas que representa el agar son:

- Con agua el agar forma geles que se derriten a 100 °C y se solidifican a 45 °C. Esto significa que este gel es estable a todas las temperaturas de incubación.
- El agar no es alterado por las enzimas vegetales.
- El agar no reacciona con los constituyentes del medio.
- No interfiere con la movilización de los constituyentes del medio.

Otros compuestos se han empleado para substituir el agar, sin embargo, pocos han tenido éxito. Posiblemente el que más popularidad ha alcanzado es el "Gelrite". Debido a que el agar es costoso, es importante tomar en cuenta otros compuestos que nos permitan substituir este soporte. (21)

3.1.5.8 Suplementos no definidos.

Algunos de los suplementos utilizados han sido:

A. Levadura y extracto de malta.

La levadura y el extracto de malta de cebada generalmente se suministran en concentraciones respectivas de 0.5% hasta 1% v/v. Estas dos sustancias se pueden considerar también como buenas fuentes de nitrógeno reducido, de precursores potenciales de las adenil-citocininas. (11, 21)

B. Agua de Coco.

Un paso importante en el desarrollo de las técnicas actuales para estimular la división celular de explantes, fue la observación de que el agua de coco (AC), a niveles relativamente bajos (5% - 10% v/v), podía interactuar con las auxinas y promover el crecimiento, en situaciones en que por sí solas eran ineficientes.

El agua de coco (AC), es un medio muy complejo, con una amplia gama de componentes orgánicos e inorgánicos; tiene buena capacidad de amortiguación (buffer), y no es raro encontrar sales en ella. Aunque el AC es muy rica en magnesio y fosfato, no todos los elementos minerales que contiene son indispensables y se pueden reemplazar por un medio salino basal. El contenido de azúcar, de alrededor de 2.5%, no es algo fuera de lo común y se puede reemplazar (se han identificado sustitutos como glucosa, fructosa, sacarosa y otros azúcares). Adicionalmente, se encuentra en ella nitrógeno no protéinico soluble, en forma de aminoácidos. (11)

C. Caseína hidrolizada.

La caseína hidrolizada (CH), digerida enzimáticamente, se ha utilizado de forma rutinaria como un suplemento de medios de cultivo para plantas; se prefiere esta caseína porque la hidrólisis ácida destruye el triptófano presente en la sustancia. (11)

D. Antioxidantes: como el ácido ascórbico.

E. Absorbentes: como el carbón activado. (21)

3.1.6 Factores físicos del ambiente en los cultivos

La luz y la temperatura son los principales factores del ambiente de los cultivos. La humedad relativa a menudo es cercana al 100% en los recipientes de cultivo. (21)

3.1.6.1 Necesidades de luz.

Los requerimientos de luz se dividen en diferentes parámetros: la potencia luminosa por unidad de superficie (o intensidad), expresada en Watts/m^2 , la duración de iluminación expresada en horas/día y la calidad espectral de la luz recibida. En los tejidos cultivados, la fotosíntesis no es una actividad necesaria, ya que la energía se proporciona en forma de glúcidos. Sin embargo, según observaciones, la fotosíntesis no se suprime por completo, sino que sólo se reduce de manera considerable, tal vez por la presencia de azúcares en el medio. Además, la luz es indispensable para regular ciertos procesos morfogénéticos, como lo comprueban numerosos estudios. (29)

A. Intensidad luminosa.

Algunos fracasos en los cultivos de tejidos, han sido causados por usar una intensidad de luz excesiva, del orden de la que se utiliza en los fitotrones: 50 Watts/m², o sea, unos 10,000 lux. Por lo general, en las salas de cultivo de tejidos, las intensidades luminosas varían de 5 a 25 Watts/m² (1000 a 5000 lux), con uso muy común de 10 a 15 Watts/m². A menudo, en la fase 3 de la multiplicación vegetativa, se tiende a aumentar la intensidad luminosa, para "fortalecer" y preparar a las plántulas que van a ser trasladadas al invernadero para plantas. (29)

B. Periodo de iluminación.

En apariencia, no hay muchos datos relacionados con la influencia eventual del período de iluminación en la morfogénesis de los tejidos (sobre todo si ésta actúa en forma análoga a la fotoperiodicidad en plantas completas). Parece que en la mayoría de los casos lo que más importa es la cantidad de energía luminosa recibida (intensidad por período de iluminación).

En la práctica, la mayoría de los cuartos de incubación de tejidos tienen un período de iluminación de 16 a 18 horas/día. (29)

C Calidad de la luz.

Los extraordinarios trabajos de Seibert, demuestran que en los callos de tabaco, la luz azul (banda espectral de casi 467 nm), o violeta (banda espectral de 419 nm), induce la formación de yemas, y que la luz roja (banda espectral de 660 nm), induce la rizogénesis. Estos resultados, indican que los procesos morfogenéticos son regulados por los pigmentos fotorreceptores: fitocromos y otros. Por lo tanto, sería interesante combinar dos tipos de tubos fluorescentes: uno, rico en radiaciones azules y otro, más rico en

radiaciones rojas. Por lo general, la referencia "luz de día de lujo", es más rica en radiaciones azules y la referencia "blanco brillante de lujo", es más rica en radiaciones rojas. Además es necesario asegurarse con el proveedor, de las curvas espectrales de emisión. Por lo general, los tubos fluorescentes blancos del comercio son suficientes. (29)

Aunque la longitud de onda de luz influye en la división celular y la diferenciación de órganos en micropropagación, se aprovecha la luz blanca proveniente de tubos fluorescentes, excepto en casos particulares. (25)

3.1.6.2 Influencia de la temperatura.

La temperatura de los cuartos de incubación de tejidos, se regula en forma constante de 22-25 °C. Esta práctica es criticable, puesto que la temperatura real de los tejidos en el interior de los recipientes de cultivo, puede ser mayor en 2 a 4 °C a la del cuarto (según mediciones hechas con termopares). En la práctica se regulará la temperatura del cuarto en 2 °C por debajo de la que se desee para los tejidos cultivados. Las especies de clima templados están "acostumbradas" a temperaturas más bajas que las especies tropicales, por esta razón sería interesante tener en los cuartos de incubación una temperatura del orden de 20 ± 1 °C para las primeras y del orden de 25 ± 1 °C para las segundas. (29)

3.1.7 Descripción del cultivo de aguacate.

3.1.7.1. Origen y dispersión.

Poblaciones silvestres de *Persea americana* Mill., se encuentran desde México hasta Colombia y de ellas podrían originarse quizás en domesticaciones separadas, los tipos cultivados. De éstos se reconoció desde el tiempo de los primeros cronistas, que podrían separarse en tres grupos: La raza guatemalteca, la

raza mexicana y la raza antillana. (9, 12)

La descripción original del aguacate fue *Persea americana* por Miller, en 1768, partiendo probablemente de una árbol antillano. La tendencia actual es clasificar la raza antillana como *Persea americana* var. *americana*, la raza guatemalteca como *P. americana* var. *guatemalensis* y la raza mexicana como *P. americana* var. *drymifolia*. Diferentes especies guatemaltecas primitivas de *Persea* que son arboles grandes (*P. nubigena*, *P. steyermakii* y un tipo silvestre primitivo conocido como aguacate de mico), pueden ser los progenitores de la raza guatemalteca típica de aguacates. Todas las especies *Persea* estudiadas tienen un número cromosómico de $2n = 24$. (9)

3.1.7.2 Clasificación botánica.

REINO	Plantae
SUBREINO	Embriobionta
DIVISION	Magnoliophyta
CLASE	Magnoliopsida
SUBCLASE	Magnoliidae
ORDEN	Magnoliales
FAMILIA	Lauraceae
GENERO	<i>Persea</i>
ESPECIE	<i>Persea americana</i> Mill. (6)

3.1.7.3 Descripción botánica.

A. Aspecto general.

Es una especie perenne de tallo aéreo (o epigeo), con características leñosas y follaje siempre

verde, su raíz es bastante superficial. (20)

a. Raíces.

Las raíces son superficiales, dependiendo de la variedad, suelo y otras condiciones de producción. La profundidad alcanzada puede ser de 1 a 1.5 metros, en suelos sueltos es mayor. La raíz del aguacate se caracteriza por tener muy pocos pelos radicales, y la absorción de agua y nutrientes se realiza principalmente en las puntas de las raíces a través de los tejidos primarios; esto determina la susceptibilidad del árbol al exceso de humedad, que induce a las asfixias y ataques de hongos que pudren los tejidos. (20)

b. Hojas.

Sus hojas son simples y enteras. De forma elíptica y nervadura pinnada (de pluma). La inserción en el tallo es peciolada. Cuando es joven presenta un color rojizo (contenido de pigmentos en las vacuolas), y una epidermis pubescente; al llegar a la madurez estas hojas se tornan lisas, coriáceas y de un verde intenso y oscuro. La hoja adulta tiene una dimensión aproximada de 15 centímetros de largo por 6 centímetros de ancho. (20)

El árbol está normalmente cubierto de hojas y una vez cumplido su ciclo, éstas caen, siempre que ya se hayan renovado en las ramas. En algunas variedades, antes de la floración hay una defoliación de corto tiempo, lo que significa que dichos árboles están vegetando fuera de su hábitat, es decir que no es una variedad apropiada para esa zona. (20)

c. Ramas.

El aguacate es sensible a las quemaduras provocadas por el sol y su susceptibilidad es variable según las variedades. Las ramas son abundantes, generalmente son delgadas y frágiles, por lo que se pueden romper al cargar muchos frutos y por la acción del viento. Las heladas también dañan los tejidos, recomendándose la protección de las plantas con paja o papel en los primeros años de implantación del huerto. (20)

d. Flor.

Las flores son hermafroditas (poseen los dos sexos), actinomorfas (simétricas), de color verde amarillento y con un diámetro aproximado de 1 cm. La inflorescencia (agrupación de las flores), es una panícula (racimo de racimos), que puede ser axilar o terminal. Se estiman unas 200 flores por panícula. Consta de un perigonio con dos verticilos trímeros. En la parte superior de la panícula se encuentra una yema vegetativa. (12)

En androceo está compuesto por 12 estambres, insertos por debajo del ovario o alrededor del mismo. De estos estambres, sólo 9 son funcionales. El gineceo posee un solo pistilo, un ovario súpero (por encima del pedúnculo), es unilocular y con un solo óvulo. (12)

e. Biología floral.

El aguacate produce miles de flores por planta. Las panículas se abren por períodos largos, pueden ser semanas o meses. Sin embargo, el número de flores que se fecunda y producen fruto es muy bajo. La polinización presenta características muy especiales, esta especie puede dividirse en dos grupos, según su comportamiento floral: Grupo A: las flores se abren por primera vez a media mañana, los sépalos

y pétalos se extienden hacia afuera y los estambres se encuentran adheridos a los pétalos, formando ángulo recto, con el eje de la flor y están completamente cerrados. El pistilo en cambio queda solo en el centro con el estilo recto y receptivo, listo para ser fecundado. La secreción de néctar de las glándulas de los estambres es muy activa y atrae a muchos insectos. Grupo B: hacia el medio día se cierran las flores por completo, para abrirse de nuevo al día siguiente por la tarde. Entonces los doce estambres aparecen erectos y emiten polen en abundancia, mientras que el estilo esta marchito y no es receptivo. En éstos árboles las flores por la mañana funcionan como femeninas y pistiladas, y por la tarde del segundo día como masculinas. (12)

f. Fruto.

El fruto es una baya que posee un pericarpio delgado, grueso o quebradizo, un mesocarpio carnoso (con un porcentaje de grasa que varía de 5 a 30%), y el "hueso" (protección seminal). Las características de los frutos son muy variables según la raza y el cultivar. Predominan los frutos en forma de pera, aunque hay también esféricos y ovoides. Son por lo general asimétricos, con un lado más grueso en que se halla más fibra y haces vasculares. El color externo va desde amarillento hasta morado o casi negro y la superficie de lisa y brillante hasta corrugada y opaca. El peso del fruto es diferente según el tipo ecológico, oscilando de 50 gramos a 2.5 kilogramos. (20)

En el fruto los tejidos externos, epidermis e hipodérmis, se separan en la madurez fácilmente del mesocarpio carnoso, rico en aceite, que constituye la parte comestible. La epidermis compuesta por células isodiamétricas de paredes fuertes, tiene numerosos estomas y esta recubierto por una capa de cera. El mesocarpio es rico en aceite, el cual llega a constituir hasta el 30 % del peso, este aceite es muy nutritivo, fácil de digerir y aumenta conforme madura el fruto. La pulpa del aguacate es además rica en proteínas y contiene buena cantidad de vitaminas A y C; la proporción de azúcar es relativamente baja. (20)

La semilla ovoide ocupa gran parte del fruto; está compuesta por dos cotiledones carnosos y un embrión pequeño y no contiene endosperma. La testa esta constituida por una o cinco capas externas de esclerénquima y varias de parénquima; la más externa, inmediata a las capas del esclerénquima, esta rellena de taninos, que le dan el color oscuro característico. (20)

En México, según el Instituto Nacional de Nutrición, una muestra de 100 gramos de pulpa de aguacate arrojó un contenido de grasa del 16 %, además de otros valores: (20)

Cuadro 1. Contenido de la pulpa del fruto del aguacate.

COMPUESTO	CANTIDAD
Calorías	152
Proteínas	1.6 g
Grasa	Grasa
Hidratos de carbono	4.8 G
Calcio	24 mg
Fósforo	47 mg
Hierro	0.53 mg
Tiamina	0.09 mg
Riboflavina	0.14 mg
Niacina	1.9 mg
Acido ascórbico	14 mg

3.1.7.4 Grupos ecológicos.

A. Raza mexicana.

Persea americana var. drymifolia. Es originaria de los valles de México, de regiones con alturas de 1,500 a 2,000 msnm. Este aguacate posee en las hojas un olor característico de anís, esto lo diferencia en primera instancia de los demás.

Los árboles son altos, de corteza delgada, con numerosas ramas delgadas y con gran cantidad de lenticelas. Las hojas verde-oscuras y lustrosas son pequeñas, de 8 a 10 cm. de largo; los brotes son vellosos y de color verde pálido o plateado; las flores son verde claro.

El peso del fruto generalmente es menor de 250 gramos, caracterizándose por sus frutos pequeños, ya que las otras razas llegan a alcanzar un peso hasta 10 veces superior. La corteza de la baya es delgada y lisa, de color verde o casi negros. (20)

La raza mexicana es la más resistente a las bajas temperaturas. Las plantas jóvenes resisten de -3 a -4 °C y las plantas adultas de -4 a -7 °C, pueden tolerar hasta -10 °C, si la duración de la helada es corta.

Presentan cierta incompatibilidad para injertarse en patrones antillanos. La raza mexicana es susceptible a los suelos calcáreos (de pH alto), y a la salinidad, siendo el pH óptimo entre 5.5 y 6.5. Los climas muy cálidos dificultan la maduración del fruto e inducen al aumento de las enfermedades criptogámicas, tales como la antracnosis (*Colletotrichum* o *Gloeosporium*). (20)

B. Raza antillana.

Esta raza se sitúa ecológicamente en lugares bajos (menos de 500 msnm.), cálidos y de una alta humedad relativa. El aspecto del árbol no es tan vigoroso como en la raza mexicana; las hojas llegan a sobrepasar los 20 centímetros de longitud y son de un color verde claro, amarillento, sin olor a anís. Los nuevos brotes tienen al principio una coloración rojiza, pasando luego al verde y al amarillo sin vellocidades.

El peso de la fruta oscila entre 250 gramos y 2.5 kilogramos, constituyendo la raza con mayor tamaño de baya. El fruto posee un pericarpio coriáceo y liso, que se desprende fácilmente una vez maduro; el color es verde, tendiendo a oscurecerse, presentando además pecas pequeñas. La pulpa es abundante, de color amarillo y sabor dulce, el hueso es grande y se suelta en la madurez. (20)

C. Raza guatemalteca.

Originaria de Guatemala, de regiones con alturas de 500 a 1000 msnm. El árbol es de gran tamaño y con hojas anchas y largas, de 15 a 18 cm. Generalmente es poco recomendada para su uso como patrón, siendo además un árbol que posee marcadas tendencias a la alternancia por su gran producción de frutos.

Igual que la raza antillana sus hojas son inodoras. El peso de los frutos es de 125 gramos a 2.5 kilogramos y su tamaño es más variado que el la raza antillana. La baya presenta una corteza gruesa y dura; su contenido de aceite es similar al de la raza mexicana, es decir de mediano a alto (un 20%). La resistencia al frío respecto a las otras razas es intermedia, las plantas jóvenes resisten entre -2 y -4 °C, y las adultas entre -3 y -5 °C. (20)

3.2 Marco referencial.

3.2.1 Localización del experimento.

El presente trabajo de investigación se realizó en el laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales de la Facultad de Agronomía de la Universidad de San Carlos de Guatemala. El laboratorio está ubicado en el salón C-16, tercer nivel del edificio T-8, en la Ciudad Universitaria, zona 12 de la Ciudad de Guatemala.

3.2.2 Cultivares a utilizar.

3.2.2.1 Cultivar Fuerte.

Cultivar obtenido de la hibridación de la raza mexicana con la guatemalteca. Posee una marcada tendencia a la vecería, también llamada alternancia en la producción, la cual tiene que ser corregida

mediante diversos cuidados por parte del fruticultor. El árbol es poco desarrollado y sus ramas se extienden hacia el costado y abajo.

Su pulpa arroja un contenido oleoso del 22% (oscilando entre 15% y 26%). La baya tiene una forma típicamente piriforme, tamaño y peso medio de 300 gramos (entre 200 y 350 gramos). La epidermis es flexible y elástica, de color verde sin brillo. Su mesocarpio es vistoso y no posee fibras, dándole una buena calidad culinaria y facilidad para pelarlo. Su semilla es mediana, de forma cónica y muy adherida a la pulpa. Su calidad y su resistencia al transporte (que es una importante característica comercial), lo ubican entre los aguacates más difundidos en América y Europa. (20)

Esta variedad tiene tendencia a la formación de frutos no polinizados y sin semillas, que son más alargados y pequeños (parecidos al pepino), y a los que se conoce como pepinillos o cukes (en Norteamérica). Es muy exigente en la floración y en el período de cuajado, pues es sensible al frío y a las temperaturas elevadas, situaciones que afectan los órganos de la flor y la viabilidad del polen. Es importante determinar correctamente el hábitat al que se destinará el cultivo. (20)

3.2.2.2 Cultivar Booth 7.

Se originó en el huerto de Will Booth, Homestead, Florida, como un cultivar guatemalteco de origen desconocido, en una plantación mixta con aguacates de las Antillas. La semilla se plantó en 1920. Fructificó por primera vez en 1927. Se propagó comercialmente en 1935. Fruto redondo ovalado, de tamaño medio, con peso de 280 a 560 gramos. Cáscara lustrosa, verde brillante, ligeramente granulada, gruesa y leñosa. La pulpa amarillo claro, de buen sabor. Semilla mediana y firme. Contenido de aceite de 7% a 14 %. El árbol se desarrolla vigorosamente, con tendencia a extenderse. El cultivar es prolífico con la mayoría de sus frutos dispuestos aisladamente. Muchos árboles se sobrecargan y muestran agotamiento y tendien a una producción alterna. El fruto soporta una refrigeración moderada. (20)

4. OBJETIVOS

- 4.1 Estudiar la respuesta de las yemas axilares del aguacate *Persea americana* Mill., cultivares Fuerte y Booth 7, al cultivo *in vitro*; utilizando el medio basal de cultivo Murashige y Skoog (MS), suplementado con distintas concentraciones de auxinas, citocininas y giberelinas.

- 4.2 Comparar la respuesta de las yemas axilares, de los cultivares de aguacate Fuerte y Booth 7, al cultivo *in vitro*.

5. HIPOTESIS

- 5.1 Las yemas axilares de aguacate *Persea americana* Mill., cultivares Fuerte y Booth 7, responden en forma positiva al cultivo *in vitro*.
- 5.2 Habrá diferencia en la respuesta al cultivo *in vitro* de yemas axilares, de los cultivares de aguacate Fuerte y Booth 7.

6. METODOLOGIA

6.1 Fases de la investigación.

El estudio se dividió en dos fases: la primera fue el control de oscurecimiento oxidativo y la adaptación del material vegetal al medio de cultivo, usando como explantes yemas axilares de *Persea americana* Mill., de los cultivares Fuerte y Booth 7. La segunda fase fue la inducción y crecimiento de brotes adventicios, a partir del material obtenido en la fase I

6.1.1 Fase I: Control del oscurecimiento oxidativo y adaptación del material vegetal al medio de cultivo.

Uno de los principales problemas en algunas especies leñosas, como el aguacate, que se cultivan *in vitro*, es el oscurecimiento oxidativo.

6.1.1.1 Tratamientos de la fase I.

Se evaluaron dos reguladores de crecimiento, la citocinina bencilaminopurina (BAP) y la giberelina ácido giberélico (GA_3) cada uno con tres concentraciones, las cuales fueron: 0, 1, 2 mg/l y 0, 0.5, 1 mg/l respectivamente; se incluyó además un testigo, para un total de 9 tratamientos.

Cuadro 2. Tratamientos de la fase I, para los explantes de aguacate de los cultivares Fuerte y Booth 7.

Tratamiento	Concentración de reguladores	
	Citocinina (BAP) (mg/l)	Giberelina (GA ₃) (mg/l)
T ₁	1	0
T ₂	2	0
T ₃	1	0.5
T ₄	2	0.5
T ₅	1	1
T ₆	2	1
T ₇	0	0.5
T ₈	0	1
T ₉	0	0

Todos los tratamientos anteriores se evaluaron separadamente para los cultivares Fuerte y Booth 7. De éstos se seleccionó el mejor tratamiento para cada uno de los cultivares, y este se uso para obtener el material a usar en la fase II.

6.1.1.2 Repeticiones de la fase I.

En esta fase se trabajó con un total de 10 repeticiones para ambos cultivares evaluados.

6.1.1.3 Medio de cultivo para la fase I.

Para la fase I, se utilizó el medio nutritivo basal líquido, descrito por Murashige y Skoog (MS) con puentes de papel filtro, (para reducir la oxidación), con los macronutrientes reducidos al 50 %, más 3.7 g/l de polyvinylpyrrolidone (PVP) (antioxidante). A este medio se le adicionó 1 gr/l de benomyl (Benlate) (fungicida), más 10 mg/l de tetraciclina (bactericida). Esto se hizo en la campana de flujo laminar, después de haber autoclaveado el medio, debido a la degradación de dichos productos con el calor y la presión. El pH del medio de cultivo se ajustó a 5.4.

6.1.1.4 Procedencia del material vegetal.

El material vegetal utilizado se obtuvo de plantas injertadas de los cultivares Fuerte y Booth 7. Las plantas tenían un año de edad, a las cuales se les proporcionó el manejo siguiente: aspersión con insecticidas y fungicidas a cada 20 días, fertilización con una fórmula compuesta (triple 15), a cada 30 días, riego a cada 4 días.

6.1.1.5 Colecta del material vegetal.

Las yemas axilares fueron colectadas entre las 7 y 8 horas. Los explantes se cortaron con un largo aproximado de 3 centímetros, fueron envueltos en papel toalla, colocados dentro de una bolsa plástica (para evitar la deshidratación), y transportados en condiciones de baja temperatura.

6.1.1.6 Preparación y lavado del material vegetal.

En el laboratorio se procedió a cortar los explantes a un tamaño aproximado de 2 cms. Luego se lavó el material con una corriente de agua durante 10 minutos. Seguidamente se limpió con un cepillo suave, jabón líquido y agua destilada.

6.1.1.7 Solución antioxidante.

Posteriormente, se colocó el material en un erlenmeyer con una solución de 150 mg/l de ácido cítrico y 100 mg/l de ácido ascórbico, manteniéndolo en agitación constante durante 4 horas. (para reducir la oxidación)

6.1.1.8 Desinfección del material vegetal.

El procedimiento de desinfección consistió en: paso del material en una solución de alcohol etílico al 70%, por 30 segundos; luego fue trasladado a una solución de 0.5 gramos por litro de benomyl (Benlate) más 0.5 mililitros de Tween 20, en donde se mantuvo en agitación durante 15 minutos. Por último el material fue pasado por una solución de hipoclorito de sodio al 10% más 0.5 mililitros de Tween 20, durante 5 minutos.

Seguidamente el material fue llevado a la campana de flujo laminar, la cual fue desinfectada una hora antes de cada sesión de trabajo con alcohol al 70%; los explantes fueron lavados tres veces con agua destilada estéril y colocados en frascos de vidrio.

6.1.1.9 Siembra del material vegetal.

El material vegetal fue disectado dentro de cajas de petri, las cuales en su interior tenían papel filtro. Se cortó la parte de la yema axilar que presentaba oscurecimiento oxidativo, dejando el explante con un tamaño aproximado de 10 milímetros. Posteriormente se colocó el explante dentro de un tubo de ensayo el cual contenía medio basal MS líquido (con puentes de papel filtro).

6.1.1.10 Incubación de los cultivos

Las siembras se mantuvieron en el cuarto de incubación, con luz blanca de 1000 a 3000 lux de intensidad aproximadamente. La temperatura media del cuarto fue de 23 °C y un fotoperíodo programado de 16 horas de luz.

6.1.1.11 Unidad experimental.

La unidad experimental estuvo constituida por una yema axilar de aguacate de cada uno de los cultivares, dentro de un tubo de ensayo de 50 mililitros, el cual contenía 15 mililitros de medio de cultivo.

6.1.1.12 Variables respuesta de la fase I.

- Número y porcentaje de explantes con oscurecimiento oxidativo.
- Número y porcentaje de explantes verdes.

6.1.1.13 Toma de datos para la fase I.

Se tomó como explante oxidado aquel que presentaba una coloración oscura parcial o totalmente, después de 2 semanas de incubación. Los explantes verdes fueron aquellos que no presentaron oscurecimiento oxidativo. En esta fase se seleccionó el mejor tratamiento para cada uno de los cultivares, posteriormente, estos tratamientos se utilizaron para obtener el material experimental a usarse en la fase II.

6.1.2 Fase II: Inducción y crecimiento de brotes adventicios.

Una vez adaptado el material vegetal al medio de cultivo, aquellos explantes que se conservaron verdes, pasaron a la fase II de la investigación.

6.1.2.1 Tratamientos de la fase II.

En esta fase se evaluó la auxina ácido indol butírico (AIB) y la citocinina bencilaminopurina (BAP); cada una con 4 concentraciones que fueron: 0.5, 1, 3, 5 mg/l y 0.5, 3, 5, 7 mg/l, respectivamente.

Cuadro 3. Tratamientos de la fase II, para los explantes de aguacate de los cultivares Fuerte y Booth 7.

Tratamiento	Concentración de reguladores	
	Auxina (AIB) (mg/l)	Citocinina (BAP) (mg/l)
T1	0.5	0.5
T2	1	0.5
T3	3	0.5
T4	5	0.5
T5	0.5	3
T6	1	3
T7	3	3
T8	5	3
T9	0.5	5
T10	1	5
T11	3	5
T12	5	5
T13	0.5	7
T14	1	7
T15	3	7
T16	5	7
T17	0	0

Todos los tratamientos anteriores se evaluaron separadamente para los cultivares Fuerte y Booth 7.

6.1.2.2 Repeticiones de la fase II.

Para ambos cultivares se trabajó con 4 repeticiones. El número de repeticiones en esta fase dependió de la cantidad de explantes que sobrevivieron de la fase anterior.

6.1.2.3 Medio de cultivo para la fase II.

Para la fase II, se utilizó el medio basal MS sólido, con los macronutrientes reducidos al 50%, adicionándole 3.7 g/l de polyvinylpyrrolidone (PVP), 250 mg/l de carbón activado (absorbente), y conteniendo diferentes concentraciones de auxinas y citocininas, para la inducción y crecimiento de brotes adventicios.

6.1.2.4 Siembra del material vegetal.

Los explantes fueron subcultivados de la fase I (dentro de la campana de flujo laminar), se les cortó la parte que presentaba oxidación, y se colocaron dentro de los tubos de ensayo con medio basal MS sólido.

6.1.2.5 Incubación de los cultivos.

Las siembras se mantuvieron en el cuarto de incubación, con luz blanca de 1000 a 3000 lux de intensidad aproximadamente. La temperatura media del cuarto fue de 23 °C y un fotoperíodo programado de 16 horas de luz.

6.1.2.6 Unidad experimental.

La unidad experimental estuvo constituida por una yema axilar de aguacate de cada uno de los cultivares, dentro de un tubo de ensayo de 50 mililitros, el cual contenía 15 mililitros de medio de cultivo.

6.1.2.7 Variables respuesta de la fase II.

- Número y porcentaje de explantes con oscurecimiento oxidativo.
- Número y porcentaje de explantes verdes.
- Número, porcentaje y tamaño de los explantes con elongación.
- Número, porcentaje y tamaño de los explantes con brotes.

6.1.2.8 Toma de datos.

Para la cuantificación de los explantes con oxidación y verdes, se tomó el mismo criterio usado en la fase I. Se tomó como explantes con elongación, aquellos en los cuales la yema creció. Los explantes con

brotos, fueron aquellos en los cuales los primordios foliares se abrieron, hubo un desarrollo del meristemo y crecimiento de pequeñas hojas. Las variables respuesta de la fase II, se midieron después de la onceava de incubación.

6.1.2.9 Análisis de la información.

De acuerdo al objetivo del trabajo, de conocer la respuesta del aguacate al cultivo *in vitro*, se planteó un análisis descriptivo en base a frecuencias, medias y porcentajes de las variables respuesta. Se hizo una prueba de T, para la comparación de los porcentajes obtenidos de las variables respuesta: explantes vivos en la fase I y fase II y explantes con elongación o brotes.

7. RESULTADOS Y DISCUSION

7.1 Fase I. Control del oscurecimiento oxidativo y adaptación del material vegetal al medio de cultivo.

7.1.1 Explantes con oscurecimiento oxidativo en la fase I.

La muerte de las yemas axilares en los diferentes tratamientos, se debió a efectos de degradación del tejido, debido a la oxidación y la constante liberación de compuestos al medio de cultivo. Este fenómeno es un efecto fisiológico y químico bastante severo, al grado que algunas yemas axilares a las 24 de horas de haber sido sembradas, mostraron degradación de tejido tornándose de color negro.

Las yemas axilares que no mostraron oxidación de forma rápida, permanecieron de color verde durante aproximadamente 4 días, posteriormente empezaron a tornarse de color café, en la parte basal en contacto con el medio, manteniéndose la parte aérea verde, la cual terminó degradándose.

Los explantes expelieron alrededor de su base, compuestos producto de la degradación del tejido y en casos más severos en todo el medio. Las yemas axilares, luego de transcurridos 10 a 14 días, mostraron una coloración negra y se observaron completamente deshidratadas.

La oxidación del explante, siendo severa, no permitió que las yemas axilares absorvieran los nutrientes necesarios, para la adaptación y crecimiento posteriores.

Según George (7), la superficie de corte de muchos explantes, inicia a decolorarse poco tiempo después de la extracción. Los explantes, o partes de ellos, frecuentemente se oscurecen cuando son introducidos dentro del frasco de cultivo, donde ellos pueden a veces exudar coloraciones oscuras dentro del medio. Este tipo de oscurecimiento u oscurecimiento esta asociado con las heridas. No todos los

compuestos producidos son inhibitorios, pero frecuentemente se encuentra una decoloración; el crecimiento es inhibido y los tejidos pueden morir, a menos que se tomen medidas para evitarlo.

Los explantes pueden a veces producir pigmentos (rosados, rojo, café, rojizo, negro o azul), a veces después de la extracción, o los cultivos pueden dar esto durante el crecimiento subsecuente. En algunos casos, la formación en este estado, es debido a daño o senescencia de algunas células, causados por un inapropiado medio de cultivo. La secreción de sustancias en cultivos establecidos, no afecta el crecimiento cuando la decoloración ocurre en forma mínima después del aislamiento, pero cuando esto ocurre, el crecimiento es generalmente impedido. (7)

Se puede observar en el cuadro 4, que un 79 % del total de explantes del cultivar Fuerte, se oxidaron; el tratamiento de 1 mg/l de GA_3 y el tratamiento sin aplicación de reguladores, fueron los que mostraron la peor respuesta con un 100 % de oxidación; mientras que el tratamiento de 2 mg/l de BAP mostró la menor oxidación con un 60 % (figura 1)

Para el cultivar Booth 7, se obtuvo un 73 % de explantes oxidados, siendo el mejor tratamiento la combinación de 2 mg/l de BAP y 0.5 mg/l de GA_3 , en el cual un 50 % de los explantes se oxidaron. Los tratamientos con 100 % de oxidación fueron aquellos a los que se les agregó GA_3 (100 %). (Cuadro 5 y figura 2)

7.1.2 Explantes verdes en la fase I.

Estos explantes permanecieron de color verde, pero no mostraron ningún tipo de crecimiento. Se puede observar en el cuadro 4, que un 21 % del total de explantes del cultivar Fuerte permanecieron verdes; el tratamiento con 2 mg/l de BAP fue el que mejor resultados mostró, ya que se conservaron verdes un total de 4 explantes equivalente a un 40 % (figura 1)

Para el cultivar Booth 7, se obtuvo un 27 % de explantes verdes, siendo el mejor tratamiento la combinación de 2 mg/l de BAP y 0.5 mg/l de GA₃, en el cual un 50 % de los explantes permanecieron verdes. (Cuadro 5 y figura 2)

De acuerdo con los cuadros 4 y 5, se puede observar que el cultivar Booth 7 superó en un 6 % al cultivar Fuerte, en cuanto a explantes verdes. Para ambos cultivares los mejores tratamientos fueron: 2 mg/l de BAP más 0.5 mg/l de GA₃ y 2 mg/l de BAP.

Cuadro 4. Respuesta de las yemas axilares de aguacate *Persea americana* Mill., cv. Fuerte, en medio basal MS líquido, suplementado con diferentes combinaciones de BAP y GA₃.

No	TRATAMIENTO	OXIDADOS	%	VERDES	%
1	1.0 mg/l BAP	7	70	3	30
2	2.0 mg/l BAP	6	60	4	40
3	1.0 mg/l BAP + 0.5 mg/l GA ₃	7	70	3	30
4	2.0 mg/l BAP + 0.5 mg/l GA ₃	7	70	3	30
5	1.0 mg/l BAP + 1.0 mg/l GA ₃	8	80	2	20
6	2.0 mg/l BAP + 1.0 mg/l GA ₃	7	70	3	30
7	0.5 mg/l GA ₃	9	90	1	10
8	1.0 mg/l GA ₃	10	100	0	0
9	Testigo	10	100	0	0
TOTAL DE EXPLANTES		71	78.89	19	21.11

Cuadro 5. Respuesta de yemas axilares de aguacate *Persea americana* Mill., cv. Booth 7, en medio basal MS líquido, suplementado con diferentes combinaciones de BAP y GA₃.

No	TRATAMIENTO	OXIDADOS	%	VERDES	%
1	1.0 mg/l BAP	7	70	3	30
2	2.0 mg/l BAP	6	60	4	40
3	1.0 mg/l BAP + 0.5 mg/l GA ₃	6	60	4	40
4	2.0 mg/l BAP + 0.5 mg/l GA ₃	5	50	5	50
5	1.0 mg/l BAP + 1.0 mg/l GA ₃	7	70	3	30
6	2.0 mg/l BAP + 1.0 mg/l GA ₃	6	60	4	40
7	0.5 mg/l GA ₃	10	100	0	0
8	1.0 mg/l GA ₃	10	100	0	0
9	Testigo	9	90	1	10
TOTAL DE EXPLANTES		66	73.33	54	26.67

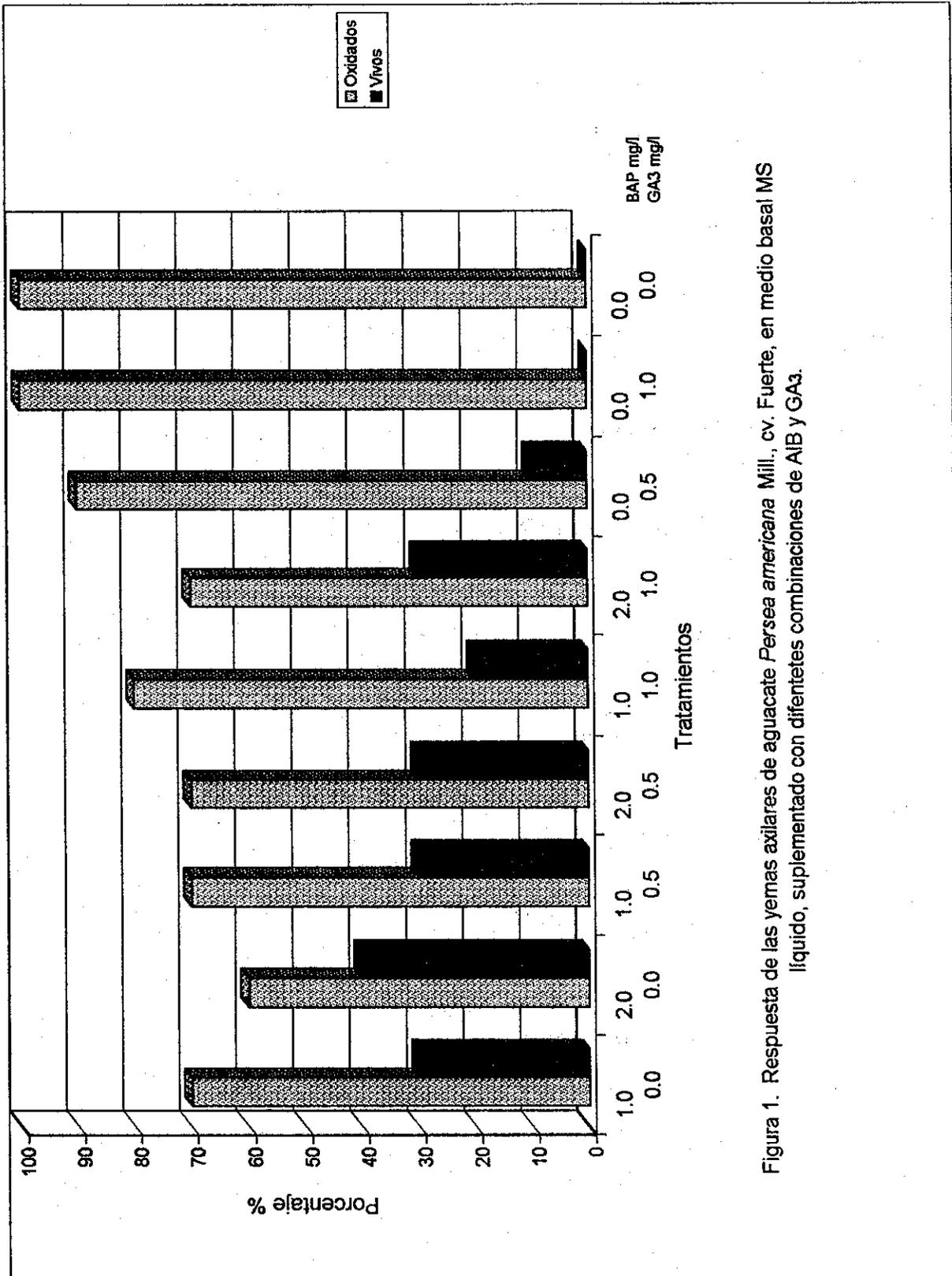


Figura 1. Respuesta de las yemas axiliares de aguacate *Persea americana* Mill., cv. Fuerte, en medio basal MS líquido, suplementado con difentes combinaciones de AIB y GA₃.

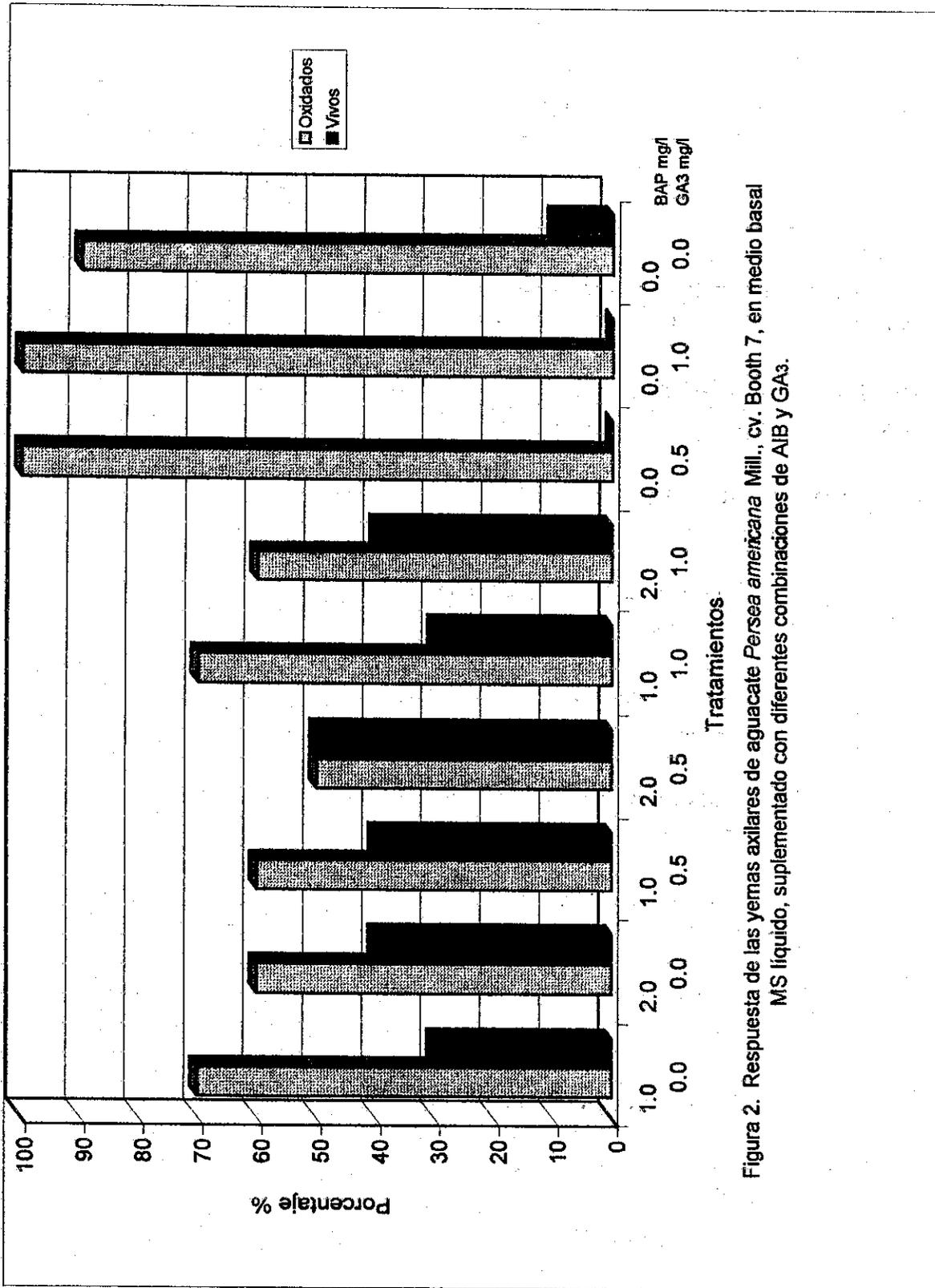


Figura 2. Respuesta de las yemas axilares de aguacate *Persea americana* Mill., cv. Booth 7, en medio basal MS líquido, suplementado con diferentes combinaciones de AIB y GA₃.

7.1.3 Selección de los mejores tratamientos de la fase I.

Para la obtención de material experimental a utilizarse en la fase II, se seleccionaron los mejores tratamientos para cada cultivar. Para el cultivar Fuerte, se utilizó el tratamiento de 2 mg/l de BAP, el cual resultó ser el mejor en la fase I; para el cultivar Booth 7, el tratamiento utilizado fue el de 2 mg/l de BAP más 0.5 mg/l de GA₃.

En el cuadro 6, se observa que para el cultivar Fuerte el 42 %, de los explantes se conservó verde; mientras que un 46 % se mantuvo verde en el cultivar Booth 7. Del total de los explantes verdes se tomaron 68 de cada cultivar, que fueron los que se utilizaron para la fase II de la investigación.

Cuadro 6. Respuesta de yemas axilares de aguacate *Persea americana* Mill., cv. Fuerte y Booth 7, en medio basal MS líquido, utilizando el mejor tratamiento según el cultivar.

TRATAMIENTO	CULTIVAR	OXIDADOS	%	VERDES	%
2.0 mg/l BAP 2.0 mg/l BAP+0.5 mg/l GA ₃	Fuerte	104	57.78	76	42.22
	Booth 7	98	54.44	82	45.56

7.2 Fase II: Inducción y crecimiento de brotes adventicios.

Los explantes que se mantuvieron verdes en la fase I (cuadro 6), fueron trasladados a medio basal MS sólido, en los cuales se subcultivó a cada 3 semanas, haciendo un total de 3 subcultivos. Se trabajó con un total de 4 repeticiones para cada tratamiento.

Se evaluaron en total 17 tratamientos, combinando diferentes concentraciones de la auxina ácido indolbutírico (AIB) (0.5, 1, 3 y 5 mg/l); con la citocinina bencilaminopurina (BAP) (0.5, 3, 5 y 7 mg/l). Se observó la oxidación de los explantes y la elongación o brotes de los mismos

7.2.1 Explantes con oscurecimiento oxidativo en la fase II.

En la fase II de la investigación, el proceso de oxidación de los explantes se siguió observando, tal y como se detalla en el cuadro 7. El 69 % del total de explantes del cultivar Fuerte se oxidaron; los tratamientos de 5 mg/l de AIB más 0.5 mg/l de BAP, 5 mg/l de AIB más 5 mg/l de BAP y 5 mg/l de AIB más 7 mg/l de BAP, fueron los que mostraron un 100 % de oxidación; mientras que el tratamiento de 1 mg/l de AIB más 3 mg/l de BAP, mostró el menor porcentaje de oxidación con un 25 %. (Figura 3)

Para el cultivar Booth 7, se obtuvo un 72 % de explantes oxidados, siendo el mejor tratamiento la combinación de 3 mg/l de AIB y 5 mg/l de BAP, en el cual sólo un 25 % de los explantes se oxidaron. Los tratamientos con 100 % de oxidación, fueron los que se les agregó 0.5 mg/l de AIB más 5 mg/l de BAP, 5 mg/l de AIB más 3 mg/l de BAP, 0.5 mg/l de AIB más 5 mg/l de BAP, 0.5 mg/l de AIB más 7 mg/l de BAP y 5 mg/l de AIB más 7 mg/l de BAP. (Cuadro 8 y figura 4)

De acuerdo con George (7), la oxidación pudo deberse a diferentes factores tales como:

Efecto del genotipo: la extensión del oscurecimiento y la inhibición del crecimiento que ocurre en cultivos, es muy dependiente del genotipo, siendo especialmente severo en géneros que naturalmente contienen alto niveles de taninos u otros hidroxifenoles, tal como *Castanea*, *Hamamelis*, *Juglans*, *Quercus*, *Paeonia*, *Rhododendron* y muchas coníferas. (7)

Diferentes genotipos, no sólo se diferencian en la cantidad de sustancias fenólicas producidas, sino las sustancias a veces varían en su toxicidad, o las plantas muestran diferentes susceptibilidades.

Efecto de la fuente de explantes: los tejidos juveniles son a veces menos propensos a oscurecimiento que otros más viejos. Este fue el caso con *Rosa spp* variedad "Paul's Scarlet"; pero explantes muy nuevos de *Coffea arabica* son mas probables a mostrar oxidación fenólica cuando se toman de tejidos viejos.

Para esta investigación los explantes fueron tomados de plantas jóvenes (1 año de edad), las cuales se mantuvieron bajo condiciones de invernadero y con un manejo controlado.

Efecto de la época del año: un factor adicional que influencia el apareamiento de oscurecimiento, puede ser la época del año en que los cultivos son extraídos. En *Hamamelis*, el oscurecimiento fue alto cuando los explantes fueron extraídos en mayo, y bajo, cuando fueron extraídos en julio y agosto. (7)

Efecto de las enzimas: algunos explantes se ennegrecen debido a la acción de enzimas de oxidación que contienen cobre, a veces llamadas polifenol oxidasa, fenolasa y tirosinasa (monofenol oxidasa), las cuales son liberadas, sintetizadas o se presentan debido a sustratos y condiciones de oxidación, cuando los tejidos son lesionados o senescentes. Los sustratos para estas enzimas (son varios en diferentes tejidos), son comúnmente tirosina e hidroxifenoles, así como ácido clorogénico. (7)

Efecto de los reguladores de crecimiento: la formación de polifenoles en explantes recién extraídos, pueden ser influenciados por reguladores de crecimiento, pero los resultados no son consistentes y compuestos que inducen oscurecimiento en una especie no tienen efecto en otra. (7)

7.2.2 Explantes verdes en la fase II.

Se puede observar en el cuadro 7, que un 31 % del total de explantes del cultivar Fuerte permanecieron verdes; el tratamiento de 1 mg/l de AIB más 3 mg/l de BAP fue el que mejor resultados mostró, ya que se conservaron verdes 75 % de los explantes. (figura 3)

Para el cultivar Booth 7 (cuadro 8 y figura 4), se obtuvo un 28 % de explantes verdes, siendo el mejor tratamiento la combinación de 3 mg/l de AIB más 5 mg/l de BAP, en el cual un 75 % de los explantes permanecieron verdes.

Cuadro 7. Respuesta de las yemas axilares de aguacate *Persea americana* Mill. cv. Fuerte en medio basal MS sólido, suplementado con diferentes combinaciones de AIB y BAP.

No	TRATAMIENTO	OXIDADOS	%	VERDES	%
1	0.5 mg/l AIB + 0.5 mg/l BAP	3	75	1	25
2	1.0 mg/l AIB + 0.5 mg/l BAP	2	50	2	50
3	3.0 mg/l AIB + 0.5 mg/l BAP	3	75	1	25
4	5.0 mg/l AIB + 0.5 mg/l BAP	4	100	0	0
5	0.5 mg/l AIB + 3.0 mg/l BAP	2	50	2	50
6	1.0 mg/l AIB + 3.0 mg/l BAP	1	25	3	75
7	3.0 mg/l AIB + 3.0 mg/l BAP	2	50	2	50
8	5.0 mg/l AIB + 3.0 mg/l BAP	3	75	1	25
9	0.5 mg/l AIB + 5.0 mg/l BAP	2	50	2	50
10	1.0 mg/l AIB + 5.0 mg/l BAP	3	75	1	25
11	3.0 mg/l AIB + 5.0 mg/l BAP	2	50	2	50
12	5.0 mg/l AIB + 5.0 mg/l BAP	4	100	0	0
13	0.5 mg/l AIB + 7.0 mg/l BAP	3	75	1	25
14	1.0 mg/l AIB + 7.0 mg/l BAP	3	75	1	25
15	3.0 mg/l AIB + 7.0 mg/l BAP	3	75	1	25
16	5.0 mg/l AIB + 7.0 mg/l BAP	4	100	0	0
17	Testigo	3	75	1	25
TOTAL DE EXPLANTES		47	69.12	21	30.88

Cuadro 8. Respuesta de las yemas axilares de aguacate *Persea americana* Mill., cv. Booth 7, en medio basal MS sólido, suplementado con diferentes combinaciones de AIB y BAP.

No	TRATAMIENTO	OXIDADOS	%	VERDES	%
1	0.5 mg/l AIB + 0.5 mg/l BAP	4	100	0	0
2	1.0 mg/l AIB + 0.5 mg/l BAP	3	75	1	25
3	3.0 mg/l AIB + 0.5 mg/l BAP	3	75	1	25
4	5.0 mg/l AIB + 0.5 mg/l BAP	2	50	2	50
5	0.5 mg/l AIB + 3.0 mg/l BAP	2	50	2	50
6	1.0 mg/l AIB + 3.0 mg/l BAP	3	75	1	25
7	3.0 mg/l AIB + 3.0 mg/l BAP	2	50	2	50
8	5.0 mg/l AIB + 3.0 mg/l BAP	4	100	0	0
9	0.5 mg/l AIB + 5.0 mg/l BAP	4	100	0	0
10	1.0 mg/l AIB + 5.0 mg/l BAP	2	50	2	50
11	3.0 mg/l AIB + 5.0 mg/l BAP	1	25	3	75
12	5.0 mg/l AIB + 5.0 mg/l BAP	3	75	1	25
13	0.5 mg/l AIB + 7.0 mg/l BAP	4	100	0	0
14	1.0 mg/l AIB + 7.0 mg/l BAP	2	50	2	50
15	3.0 mg/l AIB + 7.0 mg/l BAP	3	75	1	25
16	5.0 mg/l AIB + 7.0 mg/l BAP	4	100	0	0
17	Testigo	3	75	1	25
TOTAL DE EXPLANTES		49	72.06	19	27.94

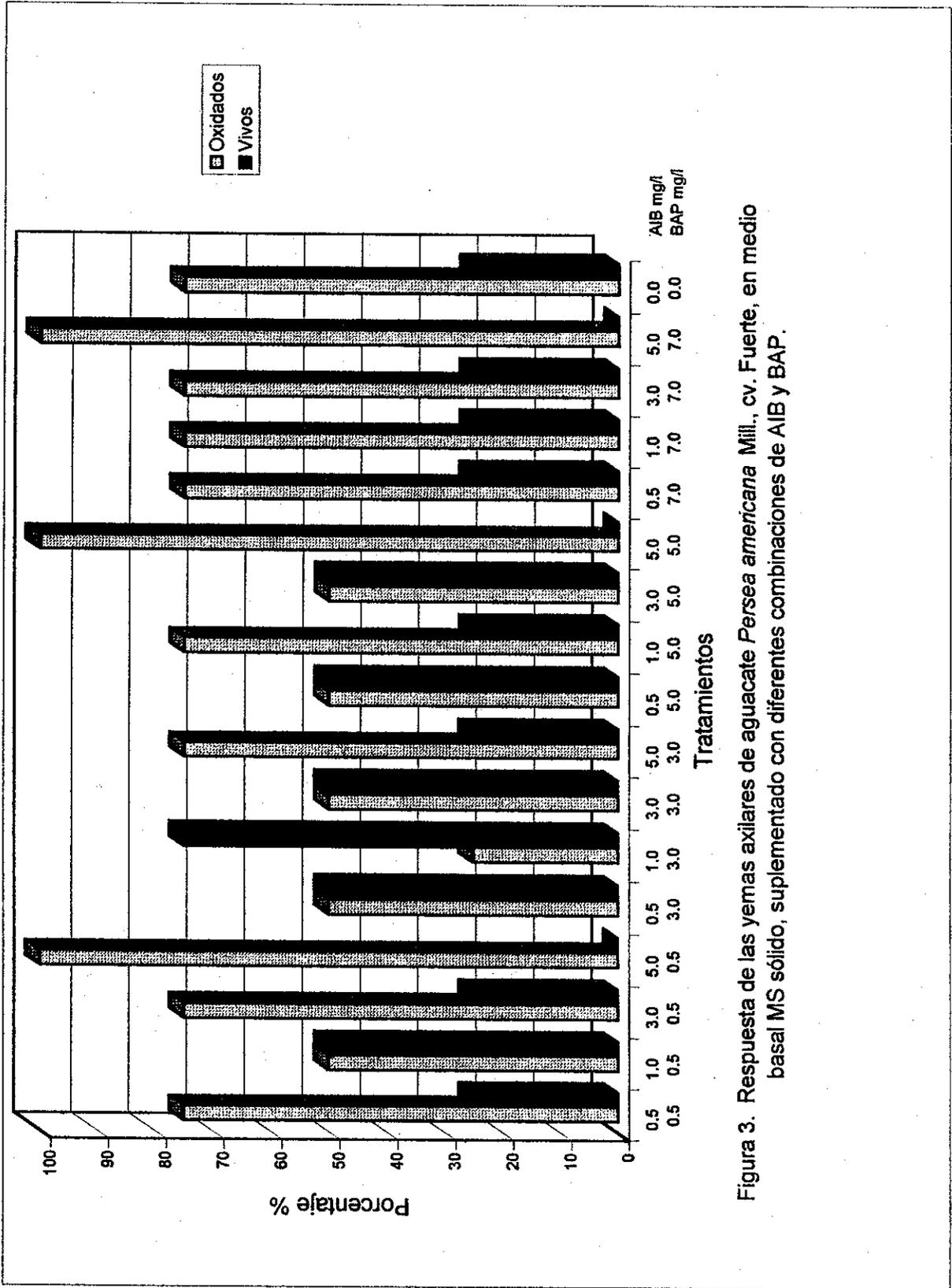


Figura 3. Respuesta de las yemas axilares de aguacate *Persea americana* Mill., cv. Fuerte, en medio basal MS sólido, suplementado con diferentes combinaciones de AIB y BAP.

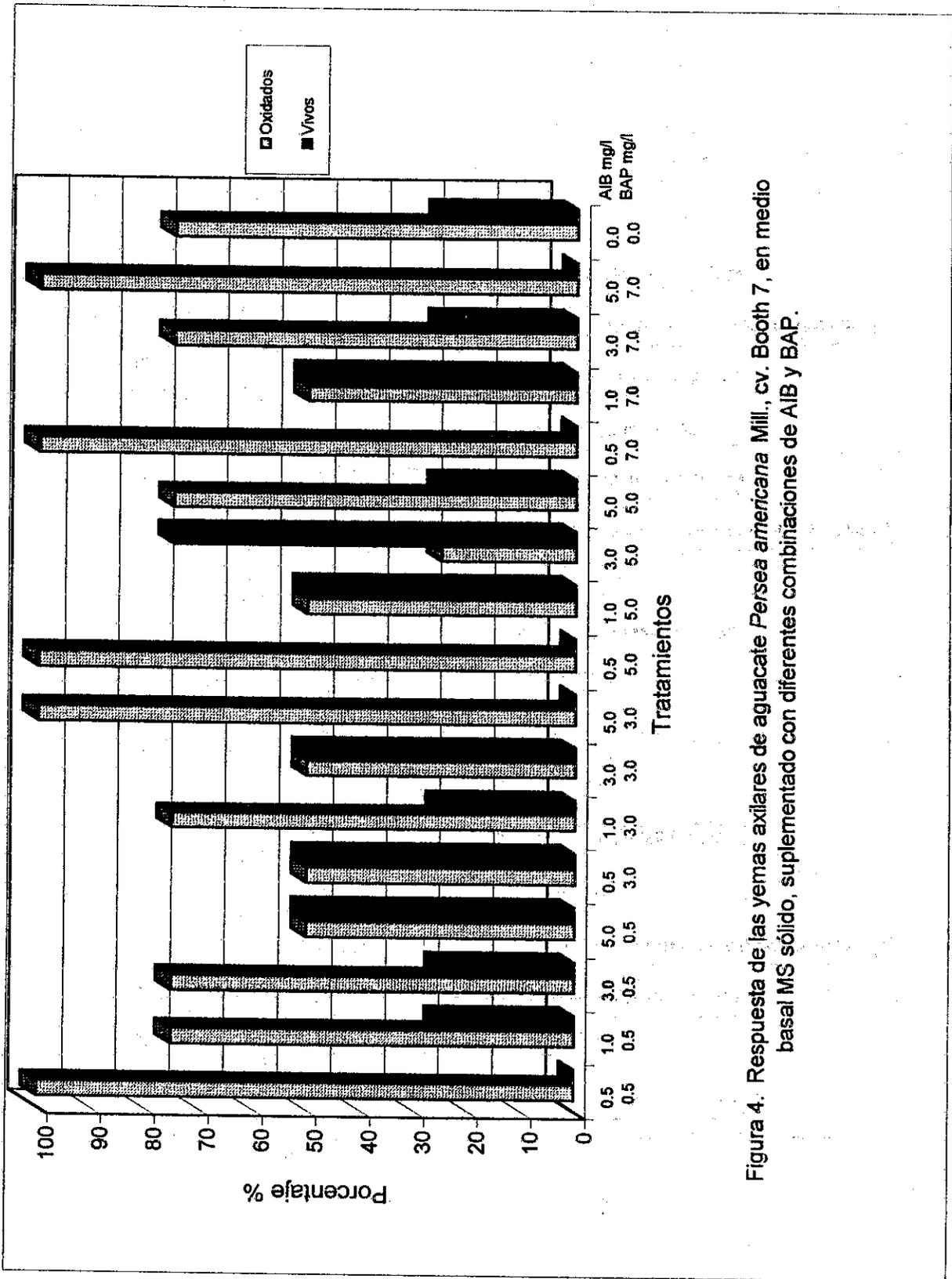


Figura 4. Respuesta de las yemas axilares de aguacate *Persea americana* Mill., cv. Booth 7, en medio basal MS sólido, suplementado con diferentes combinaciones de AIB y BAP.

7.2.3 Respuesta de los explantes en la fase II.

En cuanto a la respuesta de los explantes, se obtuvo dos diferentes tipos: elongación del explante y formación de brotes.

7.2.3.1 Elongación de los explantes.

El crecimiento de los explantes se midió tomando como referencia la elongación de la yema, lo cual se observó desde la cuarta hasta la sexta semana. El crecimiento fue demasiado lento y hubo un estancamiento o letargo a partir de la sexta semana de incubación.

Para el cultivar Fuerte, los explantes alcanzaron una longitud promedio de 3.83 milímetros, después de 11 semanas de cultivo, con un valor de 9 % de explantes elongados. (Cuadro 9 y figura 5)

En el cultivar Booth 7, los explantes alcanzaron una longitud promedio de 5 milímetros, después de 11 semanas de cultivo, correspondiente a un 9 % del total de explantes. (Cuadro 10 y figura 5)

7.2.3.2 Formación de brotes.

En los explantes con formación de brotes, se obtuvo una apertura de los primordios foliares, y luego hubo un desarrollo del meristemo, del cual brotaron pequeñas hojas, pero después de la octava semana de incubación el proceso anterior se detuvo.

En el cultivar Fuerte, sólo se observó un explante con brotación, correspondiente al tratamiento de 3 mg/l de AIB y 5 mg/l de BAP. (Cuadro 9)

Para el cultivar Booth 7, se observó brotación de la yema en dos tratamientos, los cuales se presentan en el cuadro 10 y figura 5.

7.2.3.3 Ausencia de respuesta.

La ausencia de respuesta se definió como la carencia de elongación y emisión de brotes, aunque los explantes hayan permanecido de color verde, después de 11 semanas de incubación.

Los valores observados fueron, para el cultivar Fuerte, en un 21 % de los explantes; mientras que para el cultivar Booth 7, el porcentaje fue de 16 (Cuadros 9 y 10)

Cuadro 9. Tipos de respuesta obtenidos a partir de yemas axilares de aguacate *Persea americana* Mill., cv. Fuerte, en medio basal MS sólido, suplementado con diferentes combinaciones de AIB y BAP.

No	TRATAMIENTO	TIPO DE RESPUESTA			LONGITUD PROMEDIO DE ELONGACION
		# EXPLANTES BROTADOS	# EXPLANTES ELONGADOS	NINGUNA RESPUESTA	
1	0.5 mg/l AIB + 0.5 mg/l BAP	--	--	1	--
2	1.0 mg/l AIB + 0.5 mg/l BAP	--	--	2	--
3	3.0 mg/l AIB + 0.5 mg/l BAP	--	--	1	--
4	5.0 mg/l AIB + 0.5 mg/l BAP	--	--	0	--
5	0.5 mg/l AIB + 3.0 mg/l BAP	--	1	1	3 mm
6	1.0 mg/l AIB + 3.0 mg/l BAP	--	1	2	4 mm
7	3.0 mg/l AIB + 3.0 mg/l BAP	--	--	2	--
8	5.0 mg/l AIB + 3.0 mg/l BAP	--	1	--	3 mm
9	0.5 mg/l AIB + 5.0 mg/l BAP	--	2	--	2 mm
10	1.0 mg/l AIB + 5.0 mg/l BAP	--	--	1	--
11	3.0 mg/l AIB + 5.0 mg/l BAP	1	--	1	4 mm
12	5.0 mg/l AIB + 5.0 mg/l BAP	--	--	0	--
13	0.5 mg/l AIB + 7.0 mg/l BAP	--	1	--	3 mm
14	1.0 mg/l AIB + 7.0 mg/l BAP	--	--	1	--
15	3.0 mg/l AIB + 7.0 mg/l BAP	--	--	1	--
16	5.0 mg/l AIB + 7.0 mg/l BAP	--	--	0	--
17	Testigo	--	--	1	--
TOTAL DE EXPLANTES		1 (1.47%)	6 (8.82%)	14 (20.59%)	

Cuadro 10. Tipos de respuesta obtenidos a partir de yemas axilares de aguacate *Persea americana* Mill. cv. Booth 7, en medio basal MS sólido, suplementado con diferentes combinaciones de AIB y BAP.

No	TRATAMIENTO	TIPO DE RESPUESTA			LONGITUD PROMEDIO DE ELONGACION
		# EXPLANTES BROTADOS	# EXPLANTES ELONGADOS	NINGUNA RESPUESTA	
1	0.5 mg/l AIB + 0.5 mg/l BAP	--	--	0	--
2	1.0 mg/l AIB + 0.5 mg/l BAP	--	--	1	--
3	3.0 mg/l AIB + 0.5 mg/l BAP	--	1	--	4 mm
4	5.0 mg/l AIB + 0.5 mg/l BAP	--	--	2	--
5	0.5 mg/l AIB + 3.0 mg/l BAP	1	--	--	5 mm
6	1.0 mg/l AIB + 3.0 mg/l BAP	--	1	--	6 mm
7	3.0 mg/l AIB + 3.0 mg/l BAP	--	1	1	6 mm
8	5.0 mg/l AIB + 3.0 mg/l BAP	--	--	0	--
9	0.5 mg/l AIB + 5.0 mg/l BAP	--	--	0	--
10	1.0 mg/l AIB + 5.0 mg/l BAP	1	--	1	5 mm
11	3.0 mg/l AIB + 5.0 mg/l BAP	--	1	2	6 mm
12	5.0 mg/l AIB + 5.0 mg/l BAP	--	--	1	--
13	0.5 mg/l AIB + 7.0 mg/l BAP	--	--	0	--
14	1.0 mg/l AIB + 7.0 mg/l BAP	--	2	--	4 mm
15	3.0 mg/l AIB + 7.0 mg/l BAP	--	--	1	--
16	5.0 mg/l AIB + 7.0 mg/l BAP	--	--	0	--
17	Testigo	--	--	1	--
TOTAL DE EXPLANTES		2 (2.94%)	6 (8.82%)	11 (16.18%)	

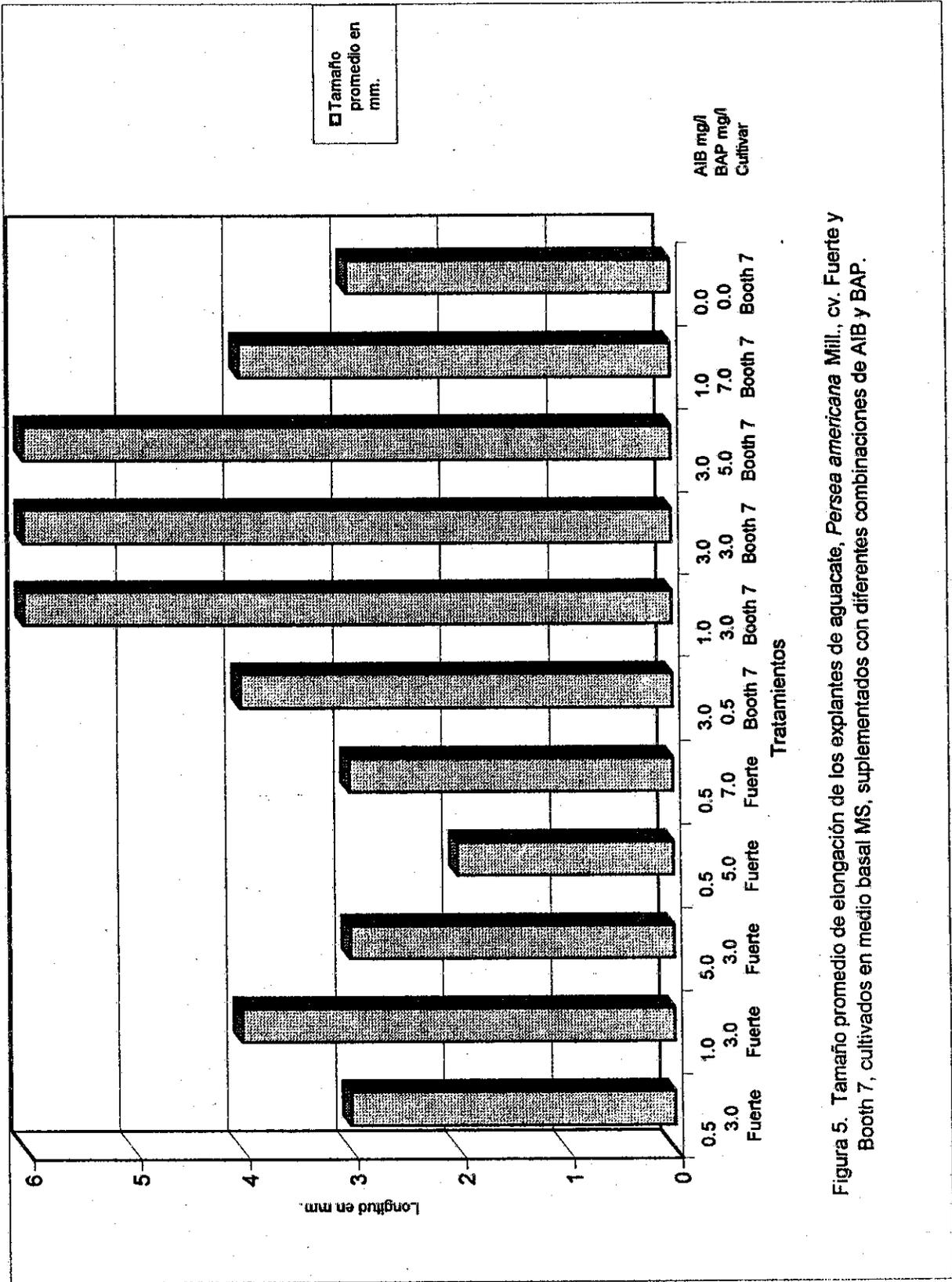


Figura 5. Tamaño promedio de elongación de los explantes de aguacate, *Persea americana* Mill., cv. Fuerte y Booth 7, cultivados en medio basal MS, suplementados con diferentes combinaciones de AIB y BAP.

7.2.4 Comparación de la respuesta al cultivo *in vitro*, entre los cultivares de aguacate *Persea americana* Mill., Fuerte y Booth 7.

7.2.4.1 Explantes verdes en la fase I.

En la fase I, para el cultivar Fuerte, el 21 % de los explantes se conservó verde, mientras que para el cultivar Booth 7, el porcentaje fue de 27, del total de explantes. Se realizó la prueba de medias de la variable respuesta explantes verdes de ambos cultivares evaluados. La probabilidad de obtener un valor mayor que $T = 0.7036$ es alta (0.4818), lo cual indica que no se encontraron diferencias significativas. Por lo tanto la cantidad de explantes verdes fue similar en los dos cultivares evaluados.

7.2.4.2 Explantes verdes en la fase II.

En el cultivar Fuerte, se mantuvieron verdes un 31 % de los explantes y para Booth 7 fue el 28 %. En base a la prueba de medias, el valor de $\text{Prob.} > |T| = 0.6995$ es alto ($T = -0.3894$), por lo que se concluye que no hay diferencias significativas entre el número de explantes verdes en la fase II, entre ambos cultivares.

7.2.4.3 Explantes que presentaron elongación y brotes.

El porcentaje de explantes que mostraron elongación y brotes, para el cultivar Fuerte, fue de 10% y para el cultivar Booth 7, de 12 %. El valor de $T = 0.2760$ y la $\text{Prob.} > |T| = 0.7843$, lo cual indica que no hubieron diferencias significativas en la cantidad de explantes que mostraron elongación y brotes, entre los cultivares evaluados.

Cuadro 11. Prueba de medias del porcentaje de explantes verdes en la fase I y fase II y explantes con elongación y brotes, cv. Fuerte y Booth 7.

FASE	CULTIVAR	%	T	PROB > T
Explantes verdes en la fase I	Fuerte Booth 7	21.11 26.67	0.7036	0.4918 NS
Explantes verdes en la fase II	Fuerte Booth 7	30.88 27.94	-0.3894	0.6995 NS
Explantes con elongación y brotes	Fuerte Booth 7	10.29 11.76	0.2760	0.7843 NS

NS : no hay significancia.

8. CONCLUSIONES

- 8.1 La principal limitante en el cultivo *in vitro* de yemas axilares de aguacate, *Persea americana* Mill., fue el oscurecimiento oxidativo. El mismo se observó en el 79% y 73% del total de explantes de la fase I, y en la fase II, en el 69% y 72%, para los cultivares Fuerte y Booth 7, respectivamente.
- 8.2 En la fase II, el 9% del total de explantes presentaron elongación, en ambos cultivares. El 1% y el 3%, presentaron brotes, y el 21% y 16% del total de explantes, únicamente se mantuvieron verdes, para los cultivares Fuerte y Booth 7, respectivamente.
- 8.3 Estadísticamente entre los cultivares de aguacate, Fuerte y Booth 7, no se encontraron diferencias significativas, para los porcentajes de explantes verdes, en las fases I y II, y el porcentaje de explantes con elongación o brotes.

9. RECOMENDACION

- 9.1 Realizar estudios detallados del proceso de oxidación de los explantes; el cual es determinante para el establecimiento de cultivos *in vitro*. Para esto se sugiere utilizar alto número de repeticiones y unidades experimentales grandes.

10. BIBLIOGRAFIA.

1. AZURDIA, C.A.; GONZALEZ SALAM, M. 1986. Informe final de recolección de algunos cultivos nativos de Guatemala. Guatemala, Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Agronomía. 256 p.
2. BIDWEL, R. 1990. Fisiología vegetal. México, A.G.T. Editores. 784 p.
3. DALSAO, L.; GUEVARA, E. 1989. Multiplicación clonal *in vitro* del aguacate *Persea americana* cv. "Fuerte". Agronomía Costarricense Volumen (C.R.) 13(1): 61-71.
4. DODDS, H.; ROBERTS, L. 1986. Experiments in plant tissue culture. 2 ed. EE.UU., Cambridge University Press. 232 p.
5. EVANS, D. *et al.* 1983. Handbook of plant and cell culture. EE.UU., Macmillan Publishing. v. 2 - 5.
6. FUENTES VELASQUEZ, C.E. 1997. Caracterización agromorfológica "*in situ*" de aguacate criollo *Persea americana* Mill., del departamento de Sololá, Guatemala. Tesis Ing. Agr. Guatemala, Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Agronomía. 64 p.
7. GEORGE, E.F. 1993. Plant propagation by tissue culture. 2 ed. EE.UU., Edignton Exegetics. p. 640- 651.
8. HARTMAN, H.T.; KESTER, D.T. 1989. Propagación de plantas. Trad. por Antonio Marino. México, Continental. 760 p.
9. HOYT, E. s.f. Conservando los parientes silvestres de las plantas cultivadas. Trad. por Enriquez Forera. México, IPGRI. 53 p.
10. HURTADO, M. *et al.* 1987. Cultivo de tejidos vegetales. México, Trillas. 232 p.
11. KRIKORIAN, A.D. 1989. Medios de cultivo: generalidades, composición y preparación. *In* Cultivo de tejidos en la agricultura, fundamentos y aplicaciones. Ed. William Roca; Luis A Mroginski. Colombia, CIAT. p 42-69.
12. LEON, J. 1987. Botánica de los cultivos tropicales. 2 ed. Costa Rica, IICA. 432 p.
13. MORERA, J.A. 1993. Los recursos fitogenéticos, una opción para el desarrollo agrícola del trópico americano. Costa Rica, CATIE. 326 p.
14. MROGINSKI, L.A.; ROCA, W.M. 1988. Establecimiento de cultivos de tejidos vegetales *in vitro*. Cali, Colombia, CIAT. p. 20-40.
15. MURASHIGE, T. 1974. Plant propagation through tissue culture. Ann. Rev. Plant. Physiol. (EE.UU.) 25: 135-166.
16. PLIEGO ALFARO, F.; BERGH, B.O. 1992. Avocado; biotechnology of perennial fruit crops. Wallingford, UK. p. 323-333.
17. RANDOLPH, H. *et al.* 1985. Tissue culture in forestry and agriculture. EE.UU., Plenum. 379 p.

18. ROCA CANET, C.E. 1996. Respuesta de dos diferentes tipos de explante de zapote *Pouteria sapota* L. Cronquist a diferentes medios de cultivo *in vitro*. Tesis Ing. Agr. Guatemala, Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Agronomía. 83 p.
19. ROCA W.M.; MROGINSKI, L.A. 1991. Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones. Cali, Colombia, CIAT. 970 p.
20. RODRIGUEZ SUPPO, F. 1982. Cultivo del aguacate. México, AGT Editores. p. 9-28.
21. ROSSEL, C.H.; VILLALOBOS A, V.M. 1989. Fundamentos teórico-prácticos del cultivo de tejidos vegetales. *In* Cultivo de tejidos en la agricultura, fundamentos y aplicaciones. Ed. William Roca; Luis A. Mroginski. Colombia, CIAT. p. 70-90.
22. THOMAS, B. 1989. *In vitro* propagation of *Oxidendrum arboreum* from mature trees. Hort. Science (EE.UU.) 24(4): 62-68.
23. THORPE, T.A. 1980. Organogenesis *in vitro*: structural, physiological and biochemical aspects. International review of cytology, supplement IIA. Nueva York, EE.UU., Academic Press. p. 71-111.
24. _____ 1988. Plant tissue culture and applications in agriculture. New York, EE.UU., Academic Press. 177 p.
25. USUI, K. *et al.* 1996. Principios básicos del cultivo de tejidos vegetales. Ed. por R.V. Pernillo; A.E. Ramírez. Guatemala, Instituto de Ciencia y Tecnología Agrícolas. 166 p.
26. VAZQUEZ, F.; CARRILLO, E.; MEJIA, L. 1991. Biotecnología y su aplicación en la agricultura guatemalteca. Guatemala, Instituto de Ciencia y Tecnología Agrícolas. 22 p.
27. VIDALLIE, H. 1986. Cultivo *in vitro*. Trad. por María Eugenia de Aragón Espejo. México, Científica. p. 43-51.
28. VILLACINDA MALDONADO, R.W. 1994. Respuesta de la especie tres puntas *Neurolaena lobata* L. a la propagación *in vitro*. Tesis Ing. Agr. Guatemala, Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Agronomía. 93 p.
29. VILLALOBOS, V.M.; THORPE, T.A. 1991. Micropropagación: conceptos, metodología y resultados. *In* Cultivo de tejidos en la agricultura, fundamentos y aplicaciones. Ed. William Roca; Luis A Mroginski. Colombia, CIAT. p. 127-141.
30. WEAVER, R.J. 1989. Reguladores del crecimiento de las plantas en la agricultura. México, Trillas. 622 p.



Vo. B. Rolando Barrios.

11. APENDICES



APENDICE 1

Elaboración de soluciones concentradas de concentración conocida.

Los componentes del medio de cultivo se agrupan en los siguientes conjuntos: macroelementos, microelementos, quelatos de hierro, vitaminas y reguladores del crecimiento.

Para la elaboración de volúmenes considerables de medio, es conveniente tener los ingredientes en forma de soluciones concentradas. La utilización de las soluciones concentradas, permite reducir pasos en la preparación del medio y aumentar la precisión en el pesaje de los diferentes componentes del medio. En la mayoría de oportunidades, varios componentes son combinados para minimizar el número de soluciones concentradas.

Inicialmente se seleccionará la concentración y volumen que se va a utilizar para cada una de las soluciones concentradas (5x, 10x, 100x, etc). Se harán los cálculos necesarios de la cantidad del componente o componentes de la solución concentrada de acuerdo a los requerimientos del medio MS, se anotará la información en la boleta correspondiente y se procederá a pesar.

En un beaker esterilizado previamente se vaciará agua destilada a un tercio de la capacidad del recipiente. Se vaciarán los reactivos uno por uno hasta disolverse completamente con ayuda de un agitador magnético. En caso de la solución de hierro, sus componentes se disolverán en forma separada en agua a 40 grados centígrados.

Después que todas las soluciones estén preparadas se transferirán a balones para aforar, se ajustarán a los volúmenes deseados con agua destilada, evitando que no queden remanentes de los reactivos en los recipientes en donde se prepararon.

Cada solución concentrada se guardará en envases separados, previamente rotulados, anotando lo siguiente: Tipo de solución concentrada y concentración, cantidad de solución concentrada, fecha de elaboración y vencimiento, cantidad a agregar por litro de medio. Los envases conteniendo las soluciones concentradas se almacenarán en la refrigeradora a una temperatura entre 2 - 6 grados centígrados.

Generalmente las soluciones concentradas se preparan de cada uno de estos grupos. Una solución puede ser 100, 10, 5, etc. (100x, 10x, 5x) veces mas concentrada que lo requerido para un litro de medio de cultivo.

La mayoría de los componentes de los medios básicos son completamente solubles en agua. Los reguladores del crecimiento se diluyen en pequeños volúmenes de bases (NaOH-KOH), ácidos (HCl) o alcohol etílico, luego se ajustan al volumen requerido con agua destilada.

Elaboración de los medios de cultivo.

A continuación se describe la forma de elaboración de los medios de cultivo. A manera de ilustración se describe la elaboración de un litro de volumen.

En un recipiente de 1000 ml., balón aforado o Erlenmeyer, agregará 300 a 400 ml de agua destilada. Se colocará dentro del recipiente una barra magnética y colocará el recipiente sobre el agitador-calentador magnético. Se agregarán los componentes del medio de cultivo en el siguiente orden: Solución concentrada de macroelementos, solución concentrada de microelementos, solución concentrada de hierro y la solución concentrada de vitaminas. Se agregarán los reguladores del crecimiento según las dosis.

Finalmente se agregará la sacarosa, se aforará con agua destilada para completar el volumen de 1 litro. Se ajustará el pH a 5.8 utilizando soluciones de 0.1 y 1.0 N de KOH o NaOH y HCl según sea necesario.

Mientras se ajuste el pH se mantendrá el recipiente sobre el agitador-calentador magnético. Se agregarán 0.7% de agar o 1.5 a 2.5 g/l de phytigel. La preparación se calentará por 8 a 10 minutos en el horno microondas hasta disolver el agar completamente.

El medio de cultivo se distribuirá en frascos de cultivo, previamente rotulados con la siguiente información: Código del medio y fecha de elaboración. Los frascos de cultivo conteniendo el medio de cultivo se esterilizarán en el autoclave durante 20 minutos, a una presión de 1.05 Kg/cm² y a una temperatura de 121 grados centígrados. Después de la esterilización, los recipientes conteniendo el medio se colocarán en un lugar adecuado a temperatura ambiente, hasta que solidifique y enfríe. Finalmente serán almacenados en el refrigerador hasta su uso.

APENDICE 2

CONTROL DE LA CONTAMINACION

La contaminación de los explantes fue minimizada a través de:

1. Manejo de la fuente de los explantes.

A las plantas de donde se obtuvieron los explantes, se les proporcionó un adecuado manejo, que consistió en aspersiones de biocidas en forma constante, fertilizaciones, riegos, limpias, etc.

2. Proceso de desinfección.

El proceso de desinfección fue establecido en base a pruebas en cuanto al tiempo óptimo requerido. Los productos empleados fueron: jabón líquido, alcohol etílico 70% (30 segundos), benlate 1 g/l más 0.5 ml. de Tween 20 (15 minutos en agitación), hipoclorito de sodio 10% más 0.5 ml. de Tween 20 (5 minutos en agitación) y agua destilada estéril.

3. Adición de biocidas al medio de cultivo.

Al medio nutritivo basal MS líquido, se le adicionó 1 g/l de benomil (Benlate) (fungicida) más 10 mg/l de tetraciclina (bactericida). Dichos productos impidieron el desarrollo de contaminantes dentro del medio de cultivo.

4. Asepsia.

Se tuvo especial cuidado en la correcta y adecuada desinfección y manipulación del material; así como también del equipo utilizado para la siembra de los explantes.

CONTROL DE LA OXIDACION

La oxidación de los explantes se trato de minimizar, con las siguientes practicas:

1. Colecta del material vegatal.

El material fue colectado en horas de la mañana y transportado en condiciones de baja temperatura.

2. Solución antioxidante.

Se utilizó una solución de ácido ascórbico (100 mg/l) más ácido cítrico (150 mg/l). Los explantes se colocaron en dicha solución y se mantuvieron en agitación durante 4 horas.

3. Medio de cultivo inicial.

Se utilizó el medio nutritivo basal MS líquido, con puentes de papel filtro, con los macronutrientes reducidos en un 50% de la dosis recomendada.

4. Uso de antioxidantes.

Se adicionó polyvinylpyrrolidone (PVP), 3.7 g/l, a los medios de cultivo líquido y sólido.

5. Uso de absorbentes.

Se adicionó carbón activado, 250 mg/l, al medio de cultivo sólido.

6. Ajuste del pH.

El pH del medio de cultivo fue de 5.4.

CUADRO 12-A Requerimientos del medio de cultivo basal de Murashige y Skoog.

COMPUESTOS	CANTIDAD (1X) (mg/l)	CANTIDAD (1/2X) (mg/l)
NH ₄ NO ₃	1650	825
KNO ₃	1900	950
CaCl ₂ .2H ₂ O	440	220
KH ₂ PO ₄	170	85
MgSO ₄ .7H ₂ O	370	185
KI	0.83	0.415
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.25	0.0125
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.025	0.0125
CoCl ₂ .6H ₂ O	0.025	0.0125
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8.6	4.3
H ₃ BO ₃	6.2	3.1
MnSO ₄ .H ₂ O	22.3	11.15
Na ₂ .EDTA	37.26	18.63
FeSO ₄ .7H ₂ O	27.6	13.8
Acido nicotínico	0.5	0.25
Piridoxina-HCl	0.5	0.25
Tiamina-HCl	0.1	0.05
Glicina	2.0	1.00
Mio-Inositol	100	50
Sacarosa	30,000	15,000
Agar	7,000	3,500
pH	5.7 - 5.8	5.7 - 5.8

CUADRO 13-A Requerimientos de las soluciones concentradas de concentración conocida.

SOLUCIONES CONCENTRADAS	COMPONENTES	CANTIDAD REQUERIDA (para 1 litro) g/l	CANTIDAD REQUERIDA (diferentes volúmenes)
Macro "A" (1X)	NH ₄ NO ₃ KNO ₃	1.65 1.90	agregar directamente agregar directamente
Macro "B" (10X)	CaCl ₂ .2H ₂ O KH ₂ PO ₄	4.4 1.70	1.1 gramos 0.425 (250 ml)
Macro "C" (10X)	MgSO ₄ .7H ₂ O	3.7	0.925 (250 ml)
Micro "A" (1000X)	KI Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.83 0.25	0.2075 0.0625 (250 ml)
Micro "B" (5000X)	CuSO ₄ .5H ₂ O CoCl ₂ .6H ₂ O	0.125 0.125	0.0125 0.0125 (100 ml)
Micro "C" (100X)	ZnSO ₄ .7H ₂ O H ₃ BO ₃ MnSO ₄ .H ₂ O	0.86 0.62 2.23	0.215 0.155 0.5575 (250 ml)
Solución Fe (100X)	Na ₂ EDTA FeSO ₄ .7H ₂ O	3.73 2.76	0.9315 0.69 (250 ml)
Solución vitaminas (1000X)	Acido nicotínico Piridoxina-HCl Tiamina-HCl Glicina	0.5 0.5 0.1 2.0	0.05 0.05 0.02 0.20 (100 ml)
Inositol (100X)	Myo-Inositol	10.0	2.5 (250 ml)



FACULTAD DE AGRONOMIA
CIUDAD UNIVERSITARIA, ZONA 12
GUATEMALA, CENTROAMÉRICA

LA TESIS TITULADA: "RESPUESTA DE LOS CULTIVARES DE AGUACATE Persea americana
Mill. FUERTE Y BOOTH 7, AL CULTIVO in vitro DE YEMAS AXI-
LARES".

DESARROLLO POR EL ESTUDIANTE: CARLOS MOISES HERNANDEZ GONZALEZ

CARNET No: 9310065

HA SIDO EVALUADA POR LOS PROFESIONALES: Ing. Agr. Gustavo A. Alvarez Valenzuela
Ing. Agr. Marco tulio Aceituno Juárez
Ing. Agr. Edwin Enrique Cano Morales
Ing. Agr. Francisco J. Vásquez Vásquez

Los Asesores y las Autoridades de la Facultad de Agronomía, hacen constar que ha
cumplido con las normas Universitarias y Reglamentos de la Facultad de Agronomía
de la Universidad de San Carlos de Guatemala.

Ing. Agr. Domingo Amador Pérez
A S E S O R

Ing. Agr. Edgar Martínez Tambito
A S E S O R

Edgar A. Martínez T.
Ingeniero Agrónomo
Colegiado 415

Ing. Agr. M.Sc. Alvaro Hernández Davila
DIRECTOR DEL IIA.

ALVARO GUSTAVO HERNANDEZ DAVILA
ING. AGRONOMO
COLEGIADO # 602

I M P R I M A S E

Ing. Agr. M.Sc. Edgar Oswaldo Franco Rivera
D E C A N O