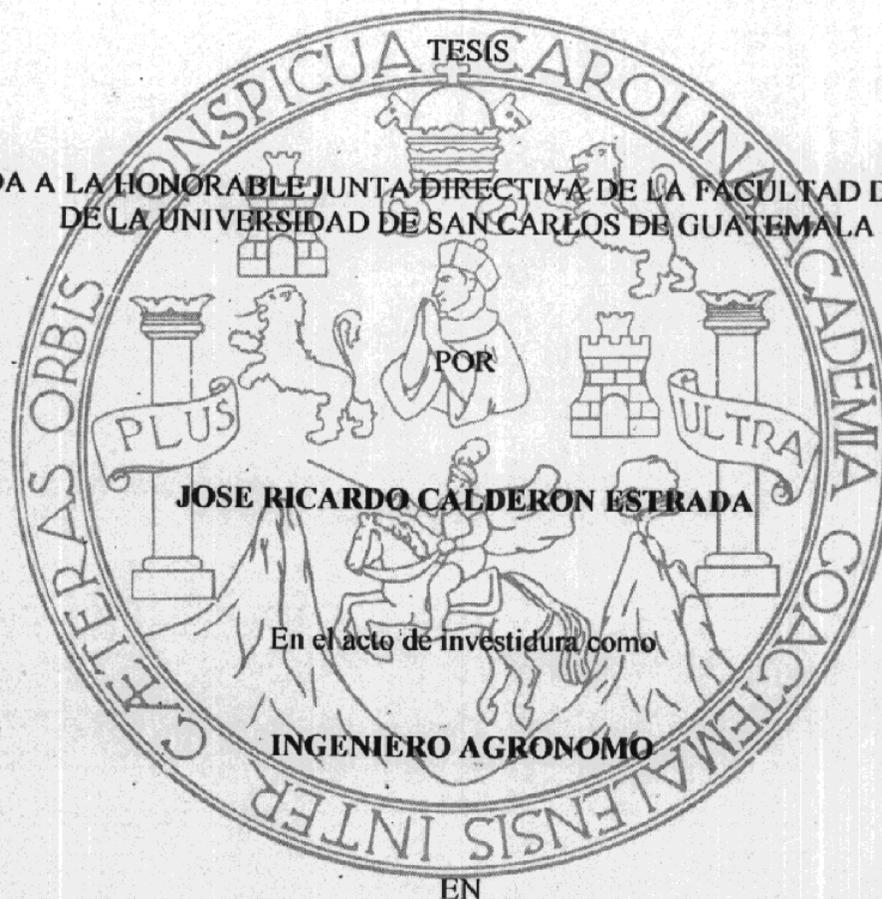


UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE AGRONOMIA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES AGRONOMICAS

“RESPUESTA DE DOS CULTIVARES DE AGUACATE *Persea americana* Mill. var. GUATEMALENSIS cv. HASS Y var. AMERICANA cv. BOOTH-8 AL CULTIVO DE TEJIDOS *in vitro*.”

PRESENTADA A LA HONORABLE JUNTA DIRECTIVA DE LA FACULTAD DE AGRONOMIA
DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA



SISTEMAS DE PRODUCCION AGRICOLA
EN EL GRADO ACADEMICO DE
LICENCIADO

GUATEMALA, ABRIL DE 2,000

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 RODRÍGUEZ QUEZADA

Guatemala, Marzo de 2000.

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

Señores miembros:

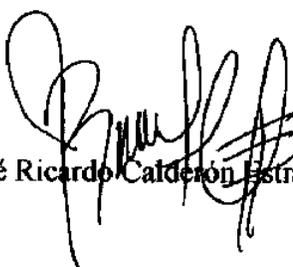
De conformidad con las normas establecidas en la Ley Orgánica de la Universidad de San Carlos de Guatemala, tengo el honor de someter a vuestra consideración, el trabajo de tesis titulado:

“RESPUESTA DE DOS CULTIVARES DE AGUACATE *Persea americana* Mill. var. GUATEMALENSIS cv. HASS Y var. AMERICANA cv. BOOTH-8 AL CULTIVO DE TEJIDOS *in vitro*.”

Como requisito previo a optar el 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,


José Ricardo Calderón Estrada

ACTO QUE DEDICO

A:

DIOS

MIS PADRES:

JOSE LEON CALDERON MEJIA (Q.E.P.D.)
BLANCA ROSA ESTRADA HERNANDEZ

Como muestra de agradecimiento a su amor, especialmente a mi madre por su esfuerzo, apoyo moral y económico.

MIS ABUELOS:

JOSE LEON CALDERON MEJIA
JUANA ELISA MEJIA ECHEVERRIA (Q.E.P.D.)

En especial para mi mamá Juana.

MIS HERMANOS:

Marck Christian y en especial a Claudia Lisseth ni aun este triunfo puede compensar en forma mínima tanto esfuerzo y sacrificio por ayudarme.

MIS TIOS:

En especial a Rogelia de Morales y Mirian de Meza como una muestra de agradecimiento por su comprensión y apoyo en todo momento.

MIS PRIMOS:

Con Cariño.

MIS AMIGOS:

Luis Felipe Guzmán, Luis Ortiz, David Herrera, Carlos Zabaleta, Juan Carlos Ramírez, Geovanny Villeda, Tulio Villeda, Carlos Hernández, Manuel Gaitán, Miguel López, Miguel Morales, Walter Mus, Rolando Molina, Juan Pablo Mus, Carlos Búcaro, Juan Pablo Prado, Werner Ovando, Luis Mendoza.

Como recuerdo de las experiencias compartidas y muestra de mi amistad.

TESIS QUE DEDICO

A:

MI PATRIA GUATEMALA

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA

FACULTAD DE AGRONOMIA

CENTRO EDUCATIVO JUVENIL, C.E.C. ZACAPA

INSTITUTO EXPERIMENTAL "JOSÉ RODRÍGUEZ CERNA", ZACAPA

COLEGIO CATÓLICO "MARIA INMACULADA", ZACAPA.

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 de tesis

Ing. Agr. Wilmer Méndez (PROFRUTA)

Por su valioso y desinteresado apoyo.

CONTENIDO

INDICE DE CUADROS	iv
INDICE DE FIGURAS	vi
INDICE DE ABREVIATURAS	vii
RESUMEN	viii
I. INTRODUCCION	1
II. DEFINICION DEL PROBLEMA	2
III. MARCO TEORICO	3
3.1 MARCO CONCEPTUAL	3
3.1.1 Aplicación e importancia de la Biotecnología en el desarrollo agrícola	3
3.1.2 Definición de cultivo de tejidos	3
3.1.2.1 Explante	4
3.1.2.2 Tamaño del explante	4
3.1.2.3 Asepsia del explante	5
3.1.3 Medio de cultivo	5
3.1.4 Componentes del medio de cultivo	5
3.1.4.1 Sales inorgánicas	6
3.1.4.1.a Adición de macronutrientes	6
3.1.4.1.b Adición de micronutrientes	6
3.1.4.2 Fuentes de carbono	7
3.1.4.3 Vitaminas	7
3.1.4.4 Agente gelificante	7
3.1.4.5 Reguladores del crecimiento	7
3.1.4.5.a Efecto de las auxinas	8
3.1.4.5.b Efecto de las citocininas	8
3.1.4.5.c Interacción auxina-citocinina	9
3.1.4.5.d Efecto de las giberelinas	11
3.1.4.6 Otros Componentes del medio de cultivo	11
3.1.4.7 Algunos antibióticos utilizados dentro del medio de cultivo	12
3.1.4.8 Modificación del potencial redox (pH)	12
3.1.4.9 Forma de preparar el medio de cultivo	13
3.1.5 Ventajas y desventajas de la micropropagación	13
3.1.6 Problemas que limitan el desarrollo del cultivo de tejidos en plantas con crecimiento secundario	14
3.1.6.1 Factores económicos	14
3.1.6.1.a El costo por labor	14
3.1.6.1.b La escala de producción	14
3.1.6.2 Factores técnicos	15

3.1.6.2.a	Establecimiento del cultivo	15
3.1.6.2.b	Contaminación de los cultivos	15
3.1.6.2.c	Fenolización del tejido	15
3.1.6.2.d	Estabilidad genética del material vegetal	16
3.1.6.2.e	Vitrificación de los explantes	16
3.1.7	Propagación del aguacate	17
3.1.7.1	Problemas en la propagación del aguacate	17
3.1.7.2	Propagación de árboles injertados sobre plántulas provenientes de semilla y sobre patrones clonales	17
3.1.8	Cultivo <i>in vitro</i> de ápices y yemas axilares para la obtención rápida de plantas	18
3.1.9	Conservación <i>in vitro</i> de <i>Persea americana</i>	18
3.1.10	Avances en la reproducción de aguacate <i>in vitro</i>	20
3.1.10.1	Cultivo de embriones de aguacate	20
3.1.10.2	Iniciación de callos de explantes de aguacate	21
3.1.10.3	Embriogénesis somática en aguacate	21
3.1.10.4	Formación de callos a través de protoplastos de aguacate	22

3.2 MARCO REFERENCIAL:

3.2.1	Origen del aguacate	23
3.2.2	Distribución actual	23
3.2.3	Importancia del aguacate en el mercado mundial	23
3.2.4	Clasificación botánica del aguacate	26
3.2.5	Descripción botánica	26
3.2.5.1	Aspecto general del aguacate	26
3.2.5.2	Desarrollo vegetativo del aguacate	27
3.2.6	Problemas de las enfermedades en el cultivo de aguacate	28
3.2.7	Composición química del aguacate	29
3.2.8	Grupos ecológicos	30
3.2.8.1	Raza mexicana	30
3.2.8.2	Raza guatemalteca	30
3.2.8.3	Raza antillana	31
3.2.9	Variedades	32
3.2.10	Descripción y requerimientos agroclimáticos para los cultivares Hass y Booth-8	33
3.2.10.1	Cultivar Hass	33
3.2.10.2	Cultivar Booth-8	34

IV. OBJETIVOS 35

4.1	Objetivo general	35
4.2	Objetivos específicos	35

V. MATERIALES Y METODOS 36

5.1	Área experimental	36
5.2	Medio nutritivo, equipo y material experimental	36
5.2.1	Medio nutritivo artificial	36
5.2.2	Equipo y cristalería	36
5.2.3	Selección del material experimental	36
5.2.4	Colecta del material experimental	37

5.3	Procedimientos generales	37
5.3.1	Elaboración del medio MS	37
5.3.2	Procedimiento de desinfección del tejido	37
5.3.3	Siembra del tejido en el medio de cultivo	39
5.3.4	Incubación de los cultivos	39
5.3.5	Subcultivos	39
5.4	Fases de la investigación	39
5.4.1	Fase I: Pruebas preliminares para el control del oscurecimiento oxidativo y estimulación del crecimiento de brotes	40
5.4.1.1	Condiciones del medio de cultivo	40
5.4.1.2	Tratamientos	40
5.4.1.3	Unidad experimental	41
5.4.1.4	Variable de respuesta	41
5.4.2	Fase II: Inducción y crecimiento de brotes adventicios	42
5.4.2.1	Condiciones del medio de cultivo	42
5.4.2.2	Tratamientos	42
5.4.2.3	Unidad experimental	43
5.4.2.4	Variables de respuestas	43
5.5	Análisis de la información	44
5.6	Presentación de los resultados	44
VI.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	45
6.1	Material vegetal utilizado como explante	45
6.2	Respuesta del explante a las técnicas de desinfección	45
6.3	Fase I: Respuesta del explante al medio líquido de iniciación para el control del oscurecimiento oxidativo y estimulación para el crecimiento de brotes	48
6.3.1	Oscurecimiento oxidativo del explante	48
6.3.2	Posibles factores limitantes que estimularon oxidación en el explante	51
6.4	Fase II: Respuesta del explante en un medio de inducción para la estimulación y crecimiento de brotes adventicios	53
6.4.1	Tipos de respuesta obtenidas para los cultivares Hass y Booth-8	53
6.4.1.1	Niveles de oxidación	53
6.4.1.2	Explantos con ausencia de respuesta	57
6.4.1.3	Explantos que presentaron formación de callo	58
6.4.1.4	Explantos con brotes adventicios inducidos	58
VII.	CONCLUSIONES	62
VIII.	RECOMENDACIONES	63
IX.	BIBLIOGRAFÍA	64
X.	APENDICE	67

INDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
RESUMEN	Resumen comparativo en las Fases I y II para los explantes de aguacate cv. Hass y Booth-8 .	x
1.	Características físicas y químicas de los reguladores del crecimiento utilizados en el cultivo <i>in vitro</i> .	9
2.	Antibióticos utilizados dentro del medio de cultivo para control de hongos y bacterias.	12
3.	Distribución del cultivo de aguacate por variedades en los principales departamentos de Guatemala.	24
4.	Contenido alimenticio del aguacate comparado con otros frutos.	29
5.	Comparación de las tres razas existentes de aguacate.	32
6.	Tratamientos de los distintas soluciones desinfectantes utilizadas para el control de contaminación y/o oxidación de material vegetal.	38
7.	Tratamientos utilizados para el estudio del oscurecimiento oxidativo y la estimulación del crecimiento brotes con dos diferentes reguladores del crecimiento.	41
8.	Diferentes concentraciones de los reguladores del crecimiento (auxina y citocinina).	42
9.	Presentación de los diferentes tratamientos a evaluar.	43
10.	Diferentes soluciones desinfectantes utilizados para controlar las contaminaciones de los explantes dentro del medio de cultivo.	46
11.	Respuesta del explante de aguacate cv. Hass a un medio líquido de iniciación.	49
12.	Respuesta del explante de aguacate cv. Booth-8 a un medio líquido de iniciación.	50
13.	Respuesta del cultivar Hass a los diferentes tratamientos de las combinaciones de los reguladores del crecimiento en un medio de Inducción.	54
14.	Respuesta del cultivar Booth-8 a los diferentes tratamientos de las combinaciones de los Reguladores del crecimiento en un medio de inducción.	56
15.	Tipo de Respuesta obtenidas para el explante de aguacate cv. Hass.	59

Cuadro		Página
16.	Tipo de Respuesta obtenidas para el explante de aguacate cv. Booth 8.	60
17A.	Requerimientos del medio de cultivo basal de Murashige & Skoog.	68
18A.	Procedimiento de preparación de soluciones concentradas de los reguladores del crecimiento.	68
19A.	Procedimiento para la preparación de soluciones concentradas de concentración conocida.	69

INDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1.	Concentraciones relativas de auxinas y citocininas típicamente requeridas para el crecimiento y morfogénesis.	10
2.	Producción de aguacate en Guatemala utilizando variedades mejoradas (95% Hass), durante el periodo 1994-98. PROFUTA-MAGA-IICA.	25
3.	Fases del crecimiento vegetativo del aguacate. El cultivo del aguacatero. FONAIAP. 1986.	27
4.	Respuesta del explante de aguacate a los distintos tratamientos de desinfección.	47
5.	Comportamiento del explante de aguacate cultivar Hass al medio líquido de iniciación.	49
6.	Comportamiento del explante de aguacate cultivar Booth-8 al medio líquido de iniciación.	51
7.	Comportamiento del explante de aguacate cultivar Hass a un medio de inducción para estimular crecimiento de brotes.	55
8.	Comportamiento del explante de aguacate cultivar Booth-8 a un medio de inducción para estimular el crecimiento de brotes.	57
9.	Tipos de respuesta obtenida para el cultivar Hass.	60
10.	Tipo de respuesta obtenida para el cultivar Booth-8.	61

INDICE DE ABREVIATURAS

MS	=	Murashige & Skoog
BAP	=	6-Bencilaminopurina
AIB	=	Ácido Indol-Butirico
AG₃	=	Ácido Gibelero
PVP	=	Polivinilpirrolidona
var	=	Variedad
cv	=	Cultivar
v/v	=	Volumen/volumen
mg/lit	=	Miligramo por litro
ml/lit	=	Mililitro por litro
DMSO	=	Dimetilsulfoxido

“Respuesta de dos cultivares de Aguacate *Persea americana* Mill. var. guatemalensis cv. Hass y var. americana cv. Booth-8 al Cultivo de Tejidos *in vitro*.”

“Response of two cultivate of Avocado *Persea americana* Mill. var. guatemalensis cv. Hass y var. americana cv. Booth-8) at Tissue culture *in vitro*”

RESUMEN

El aguacate (*Persea americana* Miller) es una planta nativa de las partes altas de México y Centroamérica. Actualmente en Guatemala no se ha logrado generar una tecnología adecuada que permita producir plantas uniformemente genéticas y libres de plagas y enfermedades que comúnmente afectan al cultivo del aguacate. Por lo que este estudio es parte de un proyecto de generación de conocimientos y tecnologías que pretende contribuir a encontrar soluciones a los problemas relacionados con la propagación del aguacate.

La propagación clonal es una de las herramientas utilizadas para la obtención de especies con las mismas características genéticas; y actualmente la Micropropagación es la técnica utilizada para la producción masiva de muchas especies de importancia económica.

En el presente trabajo se investigó la respuesta de dos cultivares de Aguacate, Hass y Booth-8, al cultivo de tejido *in vitro*, utilizando el medio de inducción MS (Murashige & Skoog) estimulando yemas laterales con diferentes combinaciones de reguladores del crecimiento. La investigación fue dividida en dos fases: la Fase I, tuvo como finalidad controlar el osourecimiento oxidativo; uno de los principales problemas en especies leñosas como el aguacate; el cual promueve la oxidación y por lo tanto la muerte de los explantes. En esta fase se evaluaron diferentes combinaciones de citocinina: 6-Bencilaminopurina (BAP) y giberelina: ácido giberelico (AG₃). Los niveles utilizados fueron para el BAP 0.0, 1.0 y 2.0 mg/lit y para el AG₃ 0.0, 0.5 y 1.0 mg/lit. Anterior a esta fase fue necesario establecer un proceso de desinfección de los explantes que fueron extraídos de plantas de vivero; las cuales fueron confinadas bajo condiciones controladas, por ejemplo, control fitosanitario, fertilización y riego. Luego los explantes recolectados fueron trasladados al laboratorio. El proceso de desinfección más efectivo fue utilizar alcohol al 70% durante 25 segundos, hipoclorito de sodio (NaOCl) al 1.04% durante 5 minutos y la combinación de productos como el Benomyl (0.5 gr/lit) y Bavisitín (0.5 ml/lit). Luego los explantes fueron inoculados en tubos de ensayo en un medio líquido con puentes de papel dentro de la campana de flujo laminar. En esta fase se realizaron dos subcultivos con intervalos de 8 días.

A lo largo de todo el proceso en esta fase, se pudo observar que el oscurecimiento de los explantes fue mucho mayor de los que se obtuvieron con algún tipo de respuesta. El cultivar Hass durante la fase I, presentó 33 explantes vivos, el 31%, mientras que para el cultivar Booth-8 se obtuvieron 26 explantes vivos, el 24%. Lo cual dio como resultado que para el cultivar Hass, se utilizó el tratamiento 7 (2.0 mg/lit BAP + 0.0 mg/lit AG_3) porque obtuvo menos explantes oxidados; mientras que para el cultivar Booth 8 se utilizó el tratamiento 5 (1.0 mg/lit BAP + 0.5 mg/lit AG_3).

Esta diferencia entre tratamientos pudo deberse a la variabilidad entre cultivares, a las condiciones de temperatura dentro del cuarto de crecimiento, a la intensidad luminica y al efecto que tiene el ambiente gaseoso dentro del tubo de ensayo que contenían los explante.

En la Fase II de la investigación se evaluaron diferentes combinaciones de citocinina: 6-Bencilaminopurina (BAP) y auxina: Ácido Indol-butirico (AIB). Siendo los niveles de BAP 0.0, 0.5, 3.0, 5.0 y 7.0 mg/lit y de AIB 0.0, 0.5, 1.0, 3.0 y 5.0 mg/lit. La duración de esta fase fue de 9 semanas, realizándose 3 subcultivos con 3 semanas de intervalo.

Al igual que en la fase anterior se manifestó mayor porcentaje de explantes con oscurecimiento oxidativo; en el cultivar Hass se observó el 76% de oxidación y en el cultivar Booth-8 el 73%. En esta fase no existió diferencia alguna en cuanto al control de la oxidación.

De los 25 explantes vivos del cultivar Hass, el 60% manifestó ausencia de respuesta, es decir, solo se mantuvieron con una coloración verde. En el cultivar Booth-8 de los 28 explantes vivos, el 39% no respondió a los distintos tratamientos. Aquí se pudo observar que el cultivar Booth-8 manifestó una leve diferencia en cuanto a explantes sin respuesta.

El porcentaje de explantes con formación de callo fue mayor en el cultivar Booth-8 (43%) que en el cultivar Hass (28%). Los callos formados presentaron las mismas características en cuanto a color y consistencia.

En el cultivar Booth-8, el 18% de los explantes presentaron formación de brotes, los cuales tenían una elongación entre 3-6 mm; mientras que para el cultivar Hass el 12% de los explantes presentaron una elongación de brotes de 4.5 mm. También se pudo observar que al no continuar con los subcultivos de explantes con brotes a nuevos medios de cultivo; éstos iniciaban un proceso detrimental en su crecimiento y desarrollo, y a la vez se estimulaba el proceso de oxidación de los mismos. Los tratamientos que respondieron mejor a la formación de brotes fueron los que tenían una concentración de 3mg/lit de BAP.

En síntesis y como puede apreciarse en el cuadro resumen, la diferencia entre cultivares y respuesta de los explantes a la propagación in vitro fue mínima.

CUADRO RESUMEN. Resumen comparativo en las Fases I y II para los explantes de aguacate cv. Hass y Booth-8.

Cultivar	E x p l a n t e s									
	Verdes		Oxidados		Sin Respuesta		Con Callo		Con Brote	
	Número	Porcentaje	Número	Porcentaje	Número	Porcentaje	Número	Porcentaje	Número	Porcentaje
Hass										
Fase I	33	31	75	70	-	-	-	-	-	-
Fase II	25	25	77	76	15	60	7	28	3	12
Booth-8										
Fase I	26	24	82	76	-	-	-	-	-	-
Fase II	28	28	74	73	11	39	14	43	5	18

I. INTRODUCCION

El aguacate, *Persea americana* Mill., tiene como centro de origen Guatemala, algunos estados del sureste mexicano y el resto de Centroamérica. La planta se identifica como *Persea americana* y se distinguen tres razas, de acuerdo a su región geográfica y a características genéticas particulares. Las razas son: *P. americana* var. *guatemalensis* (raza guatemalteca); *P. americana* var. *drymifolia* (raza mexicana) y *P. americana* var. *americana* (raza antillana). (33)

El aguacate, es un cultivo relativamente nuevo en algunas áreas del mundo. De las regiones de origen ha salido diferente germoplasma para países como Israel, Estados Unidos, Sudáfrica, Nueva Zelanda, Australia, España y otros. Estos países han realizado mejoramiento genético para obtener variedades mejoradas de gran potencial productivo y económico. Se prevee a este cultivo como prospecto comercial tanto para el mercado interno como para la exportación, la cual es ahora de interés en el establecimiento de industrias de aguacate en muchas ciudades. El desarrollo de cultivares superiores es básico para establecer cualquier agroindustria del aguacate.

Actualmente la industria mundial de aguacate es todavía joven en comparación con otras industrias agrícolas, pero ha tomado gran auge en los últimos doce años y prosigue su expansión, llegando en la actualidad a cultivarse en casi 50 países del mundo. Los productores más grandes son, en orden de volumen producido: México, Estados Unidos, República Dominicana, Brasil, Israel, España, Indonesia, Haití, Venezuela, Colombia y Sudáfrica (3). Aun Guatemala siendo centro de origen no es considerado un país con potencial económico para la exportación del aguacate. Según el Departamento de Cuarentena Vegetal del Ministerio de Agricultura de Guatemala, se ha logrado incursionar en la exportación del aguacate a países Centroamericanos: como El Salvador, Honduras, Nicaragua y Costa Rica, pero ha sido una demanda muy poco significativa, ya que carecen de los volúmenes necesarios demandados y no cumplen con las normas de calidad exigidas por dichos países. Siendo México el país que tiene el mayor volumen de exportación a nivel regional y mundial. (17)

En Guatemala escasamente se tienen cuantificadas las áreas de mayor producción del aguacate, pero de acuerdo con informes técnicos del programa PROFRUTA-MAGA-IICA, se ha estimado que los cultivares Hass y Booth-8 son los de mayor distribución en el país. (17)

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. Bajo los postulados de la totipotencia celular, en donde toda célula vegetal posee la información genética para regenerar plantas completas, los tejidos así cultivados pueden ser multiplicados en forma masiva. Las principales ventajas de estas novedosas técnicas se centran en la obtención de plántulas libres de patógenos y fieles a la identidad de la planta madre.

Todo el proceso de investigación permitió obtener las distintas respuestas de los cultivares de aguacate, Hass y Booth-8, utilizando como explante yemas laterales con varios primordios foliares, utilizando como medio de inducción el de Murashige y Skoog; se evaluó el efecto de la combinación de tres tipos diferentes de reguladores del crecimiento, siendo el Ácido Indol-butírico (AIB), el 6-Bencilaminopurina (BAP) y el Ácido Giberélico (AG₃) en diferentes concentraciones. Lo cual se cree que puede ser el proceso promisorio para el desarrollo *in vitro* del aguacate.

II. DEFINICION DEL PROBLEMA

Siendo Guatemala centro de origen del aguacate y con ecosistemas propicios para el desarrollo de una gran diversidad genética, no se han logrado generar los conocimientos apropiados para obtener una tecnología adecuada para que los productores puedan tener plantaciones que produzcan frutos que satisfagan las exigencias del mercado internacional. Lo anterior se traduce en los sistemas deficientes de propagación, proliferación de plagas y enfermedades en los cultivos y en las cosechas, desuniformidad genética en las plantaciones comerciales, deficiencia en la calidad del fruto, materiales genéticos poco adecuados para la comercialización. Al no existir una tecnología apropiada a nuestro medio, las plantaciones comerciales se establecen y manejan en forma inadecuada, como resultado los productores tienen que abandonar sus plantaciones después de haber hecho grandes inversiones. A pesar de lo anterior, existe un grupo considerable de productores con la confianza de que la tecnología tiene que mejorar para producir frutos de buena calidad.

El presente estudio es parte de un proyecto cuyos objetivos son la generación de conocimientos y tecnologías de propagación de aguacate, que contribuya a solucionar los problemas relacionados con la desuniformidad genética del cultivo; el cual consistió en establecer el protocolo para la propagación clonal de material vegetal de los cultivares Hass y Booth-8 utilizando diferentes dosis de auxina y citocinina para estimular la inducción y proliferación de brotes adventicios.

III. REVISION DE LITERATURA

3.1 MARCO CONCEPTUAL:

3.1.1 Aplicación e importancia de la Biotecnología en el desarrollo agrícola:

Según Vázquez, Carrillo y Mejía (28), 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 que fueron desarrollados sobre genética molecular por O.T. Avery (1944) y por Jim Watson y Francis Crick (1951) acerca de la estructura y composición del material genético permitieron sentar las bases de lo que muchos llaman ahora la revolución biológica. Ello también permitió darle solidez científica al término acuñado por Morgan (1901) de Totipotencia Celular, refiriéndose a la capacidad que tiene una célula de desarrollar por regeneración un organismo completo. (28)

Todo este desarrollo tuvo lugar en países como Estados Unidos, Japón, Francia, entre otros, donde fueron invertidos multimillonarios sumas de dinero en su fase investigativa y recientemente en la comercialización de los productos al tercer mundo como un mercado potencial. (28)

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, hojas, etc. (28)

3.1.2 Definición de cultivo de tejidos:

En primer término, el cultivo de tejidos *in vitro* comprende, en su acepción amplia, un heterogéneo grupo de técnicas mediante las cuales un explante (parte separada de un vegetal, por ejemplo: protoplasto, célula, tejido, órgano) se cultiva asépticamente en un medio de composición química definida y se incuba en condiciones ambientales controladas. (20)

En segundo término, los objetivos perseguidos con la utilización del cultivo *in vitro* de tejidos vegetales son numerosos y diferentes. Brevemente, las posibilidades de aplicación de tales cultivos se pueden resumir así: a) estudios básicos de fisiología, genética, bioquímica, y ciencias afines; b) bioconversión y producción de compuestos útiles; c) incremento de la variabilidad genética; d) obtención de plantas libres de patógenos; e) propagación de plantas; y f) conservación e intercambio de germoplasma. (20)

Para Aguilar (1) y Villalobos (32) el cultivo de tejidos combina las técnicas corrientes de fitomejoramiento con los nuevos métodos biotecnológicos y ofrece la oportunidad de reducir el tiempo requerido para la producción de variedades mejoradas. En la mayoría de los cultivos de importancia económica se necesita de siete a diez años, después del cruzamiento, para saber si se ha obtenido una variedad mejorada, mientras en cultivo de tejidos las mutaciones que

parecen prometedoras pueden identificarse en un año o dos. Esto ofrece la ventaja de reducción del tiempo y volumen de siembra en campo requeridos por los métodos convencionales.

De estas consideraciones surge que el establecimiento de cultivos de tejidos, es decir, la separación del explante y las operaciones relacionadas con su incubación *in vitro*, dependerá en gran medida del tipo de explante y del sistema de cultivo que se emplee, los que a su vez dependerá del objetivo perseguido. La respuesta obtenida con el cultivo *in vitro* de un determinado explante decidirá sobre su utilidad para el logro de un objetivo propuesto. Es necesario recalcar que, para su aplicación en la agricultura, cualquier sistema de cultivo *in vitro* debe lograr como producto final la regeneración de plantas enteras. (1) (32)

3.1.2.1 Explante:

La elección de un explante apropiado constituye el primer paso para el establecimiento de los cultivos; en primera instancia, dicha elección está determinada por el objetivo perseguido y la especie vegetal utilizada. (20)

Si el objetivo final es la producción de callos, es factible la utilización de una vasta gama de explantes que, cultivados en condiciones apropiadas, permiten la proliferación callosa. Cualquier explante que contenga células nucleadas vivas se puede emplear potencialmente para la obtención de callos. (20)

Es muy frecuente la utilización de ápices o meristemos caulinares, hojas, entrenudos, cotiledones, raíces, anteras e inclusive tejidos altamente diferenciados como los provenientes de los frutos. Esta facilidad para la proliferación callosa puede hacerse extensiva a células y protoplastos, con el empleo de técnicas y medios de cultivo más elaborados. El establecimiento de cultivos que persiguen determinados objetivos pueden limitar aún más la elección del tipo de explante. (20)

La propagación *in vitro* de la mayoría de las plantas leñosas requiere la utilización de explantes provenientes de materiales juveniles. (20)

3.1.2.2 Tamaño del explante:

El tamaño del explante es otro aspecto que se debe tener en cuenta para el establecimiento de los cultivos; cuanto más grande sea, mayores son las posibilidades de obtener proliferación callosa, aunque ello trae aparejadas mayores probabilidad de heterogeneidad y de contaminación con microorganismos. Existe un tamaño mínimo del explante, variable según el material vegetal, por debajo del cual no se obtienen proliferación callosa u otras respuestas deseables.

Se debe tener en cuenta la incidencia de otros factores que a menudo pueden alterar las respuestas de los explantes cultivados; entre estos factores están la época del año en que se realizan los cultivos, especialmente cuando los explantes se obtienen de plantas de invernaderos o campo. Otro factor serían los pretratamientos a los explantes y las condiciones de crecimiento de las plantas donantes de los mismos. (24)

Según Villalobos (1982) (34), el tamaño del explante no tiene mayor influencia. Solamente en el caso de que se pretenda obtener plantas libres de virus, los meristemos (sin primordios foliares) tienen una alta probabilidad de diferenciar plantas libres de estos patógenos; sin embargo, es más difícil regenerar de ellos plantas completas.

3.1.2.3 Asepsia del explante:

La asociación explante-medio y las condiciones físicas en que normalmente se incuban los cultivos conforman un ambiente propicio para la proliferación de microorganismos (bacterias, hongos), los cuales pueden destruir tales cultivos, competir con el explante por el medio de cultivo o modificarlo. Evitar las contaminaciones con microorganismos es un aspecto básico que se debe tener en cuenta para el éxito, no solamente en el establecimiento de los cultivos sino en su ulterior incubación y manipulación. (20)

Es difícil lograr cultivos completamente estériles en el estricto sentido de la palabra. Para establecer cultivos asepticos es conveniente o necesario: a) trabajar en ambientes adecuados; b) esterilizar los medios de cultivo; c) desinfectar superficialmente los explantes, liberándolos de bacterias y hongos exógenos; y d) realizar los cultivos respetando ciertas normas de asepsia. (20)

3.1.3 Medio de cultivo:

Hurtado y Merino (9) y Villalobos (32) indican que el éxito del cultivo de tejidos de plantas está influenciado por la composición química de los medios de cultivo. Se ha determinado que utilizando las sustancias químicas necesarias y las condiciones apropiadas de nutrientes así como su forma química adecuada se ha establecido cultivos para casi todas las partes de una plantas en diversas especies vegetales.

Villalobos (32) indica que para el crecimiento adecuado de las plantas se necesita que las mismas tomen del suelo cantidades importantes de macronutrientes como lo son: las sales de nitrógeno, potasio, calcio, fósforo, magnesio, cobre, molibdeno y cobalto. Un medio de cultivo contiene estos elementos y carbohidratos, normalmente sacarosa, este último compuesto sirve para reemplazar al carbono que la planta normalmente fija por medio de la fotosíntesis. Se sabe también que se obtienen mejores resultados al incluir compuestos orgánicos en pequeñas cantidades tales como vitaminas, aminoácidos y reguladores de crecimiento.

3.1.4 Componentes del medio de cultivo:

En la actualidad existen innumerables formulaciones cada una de las cuales contiene entre 15 y 35 compuestos químicos que suministran: (20)

- a) Agua (agua de intercambio iónico o agua destilada)
- b) Sales inorgánicas (macronutrientes y micronutrientes)
- c) Fuentes de Carbono
- d) Vitaminas
- e) Agente Gelificante (en el caso de medios semisólidos)
- f) Sustancias reguladoras del crecimiento
- g) pH (exponente del ión hidrógeno)
- h) Otros compuestos

3.1.4.1 Sales inorgánicas:

3.1.4.1.a Adición de macronutrientes:

Estos son importantes en el crecimiento y desarrollo celular, un medio de cultivo consta de los siguientes macronutrientes: (1) (32)

- Nitrógeno se adiciona en grandes cantidades en forma de nitrato o iones de amonio o combinando ambas formas. Existen varias influencias del nitrógeno. En concentraciones altas, promueve el enraizamiento. Mientras que en concentraciones bajas, promueve el desarrollo de callo.
- Magnesio y azufre se adicionan normalmente en forma de sulfato de magnesio ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$). Este elemento es un componente importante de la molécula de clorofila.
- Fósforo se adicionan cualquiera de las formas siguientes: Fosfato ácido de potasio ($NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ ó KH_2PO_4). Este es un elemento necesario para el metabolismo de las plantas. Principalmente, es utilizado para sintetizar ATP como fuente de energía.
- Potasio se agrega en cualquiera de las formas siguientes: cloruro de potasio, nitrato de potasio, fosfato ácido de potasio (KCl , KNO_3 ó KH_2PO_4). Existe relación entre el potasio iónico y la diferenciación de órganos.
- Calcio se adicionan en cualquiera de las siguientes formas: cloruro de calcio dihidratado, nitrato de calcio ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$, $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$ ó la forma anhidra de cualquier sal). El calcio es el componente de la pared celular.
- El sodio, este catión no es requerido por plantas superiores, sin embargo, puede ser un elemento esencial para cultivos de halófitas o plantas C_4 .
- El cloro está presente en la forma de KCl ó $CaCl_2$.

3.1.4.1.b Adición de micronutrientes:

Aguilar (1) y Villalobos (32) dicen que estos son necesarios ya que son componentes de las proteínas de las células vegetales y tienen importancia a nivel fisiológico y metabólico.

- Hierro se añade en forma de quelatos de hierro (fe-EDTA), puesto que de la forma sulfato precipita y no es disponible a las células. Es requerido para la formación de precursores de la clorofila.
- Manganeso importante en la actividad fotosintética ya que cuando este elemento no se encuentra presente disminuye la actividad fotosintética (la actividad del fotosistema II es proporcional al contenido de Mn).
- Zinc y cobre son requeridos para la oxidación e hidroxidación de compuestos fenólicos.
- Cobalto es metal componente de la vitamina B_{12} .
- Boro necesario para el mantenimiento de la actividad meristemática.

3.1.4.2 Fuentes de carbono:

Muy pocos cultivos in vitro son autótrofos, y por lo tanto es necesario agregar al medio una fuente de carbono. La sacarosa (2% a 5%) es el azúcar que más se utiliza, y se puede reemplazar por glucosa y en menor medida por fructuosa; en general, la maltosa y la galactosa son menos efectivas. La incorporación de mioinositol (promueve la producción de células y órganos) al medio (100 mg/litro) generalmente da como resultado un mejor crecimiento de los callos y suspensiones celulares. (20)

Una disminución en la concentración de azúcar en el medio favorecen la restauración de la capacidad organogénica de los cultivos, al aumentar su concentración en el medio actúan como regulador osmótico y al disminuirla se limita la fuente artificial de carbono. (20)

3.1.4.3 Vitaminas:

Son necesarias para llevar a cabo una serie de reacciones catalíticas en el metabolismo y son requeridas en pequeñas cantidades, las más usadas son: Tiamina, conocida como vitamina B₁, en cantidades que varía de 0.1 a 0.3 mg/litro, esta es realmente la única vitamina esencial para el crecimiento de las células vegetales. Se adiciona también Pyridoxina (vitamina B₆) y ácido nicotínico. (27)

El Myo-Inositol, no es propiamente una vitamina, sino un azúcar-alcohol. Tiene un efecto estimulante sobre la morfogénesis, participando probablemente en la vía biosintética del ácido galacturónico. (20)

El ácido fólico disminuye la proliferación de tejido en la obscuridad, mientras que en a luz la aumenta, esto es debido a que en presencia de luz, es hidrolizado a ácido P-aminobenzoico. (20)

3.1.4.4 Agente gelificante:

En los medios semisólidos comúnmente se adiciona Agar (0.6% a 1.0%). Se debe considerar especialmente la pureza del agar, ya que es frecuente la presencia de impurezas de naturaleza variada; la marca comercial y las concentraciones del agar utilizada puede alterar las respuestas del cultivo. (20)

3.1.4.5 Reguladores del crecimiento:

La presencia de hormonas vegetales se ha observado desde fines del siglo pasado, las numerosas investigaciones posteriores pusieron de manifiesto su existencia. Las primeras en ser descubiertas fueron las auxinas, en 1934; las giberelinas y las citocininas en la década de 1950. Estos tres tipos de reguladores ejercen una acción estimulante sobre el metabolismo celular. (31)

Estas diversas sustancias son de naturaleza endógena, es decir, que pueden sintetizarse por el vegetal; además, existen otras que el hombre sintetiza, cuyas fórmulas químicas son similares o diferentes a las sustancias naturales pero presentan una actividad fisiológica semejante. Todas estas sustancias endógenas y de síntesis se incluyen en la categoría de reguladores del crecimiento (cuadro 1). (31)

Todos estos compuestos tienen algunas características en común:

- actúan en dosis muy bajas; en dosis altas son tóxicas, lo que ha permitido que algunas se utilicen como herbicidas;
- sólo interactúan con los otros reguladores; el funcionamiento está determinado por el equilibrio establecido entre ellos;
- intervienen en múltiples fenómenos fisiológicos, lo que implica varias modalidades de acción, por esta razón, la noción de "hormonas específicas" en la actualidad se ha abandonado;
- aquí hay que observar una diferencia importante entre reguladores endógenos y reguladores de síntesis: los primeros los controla la maquinaria metabólica celular, por lo tanto son controlados o eliminados rápidamente; en contraste los segundos persisten durante mucho tiempo y a menudo se prefieren debido a sus aplicaciones prácticas.

3.1.4.5.a Efecto de las auxinas:

La auxina interviene en numerosos fenómenos fisiológicos, su acción depende de su concentración y sus interacciones con los otros reguladores. Al estudiar por separado los diversos efectos es posible observar lo siguiente:

(31)

- una clara acción sobre el crecimiento celular: este efecto se debe al aumento consecutivo de la plasticidad en la pared esquelética y a la penetración de agua en la célula; la resistencia de la pared disminuye y la célula se alarga;
- modificación de la permeabilidad de la membrana (membrana plásmica) que se entiende por un rechazo de iones H^+ , lo que provoca una acidificación responsable de la disminución de la resistencia de la pared y absorción de iones K^+ ;
- estimulación de la división celular en las células de origen cambial (esta acción ha posibilitado los primeros éxitos de los cultivos in vitro). Este efecto se ha calificado como "histogéneo", ya que conduce a numerosas células, todas ellas semejantes, que forman un "callo".

Las auxinas, ácido indolbutírico (AIB) y el ácido indolacético (AIA) son usadas en rango que varía de 0.1 a 10 mg/l; el ácido naftalenacético (ANA) y el ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4-D) se usan en un rango de 0.001 a 10 mg/l.

3.1.4.5.b Efecto de las citocininas:

Las citocininas se descubrieron en forma accidental en un cultivo in vitro. Se sabía que en los medios de cultivo, la adición de leche de coco provocaba un efecto favorable en la multiplicación celular y en la formación de yemas. Las investigaciones que intentaron descubrir el factor responsable de este efecto condujeron al aislamiento de un complejo activo de naturaleza púrica, el cual no pudo identificarse. Esto permitió hacer investigaciones con las purinas y, en

1956 Skoog aisló, a partir de ADN desnaturalizado, una sustancia muy activa. Las citocininas son muy activas y, al igual que la auxina, presentan numerosas acciones siendo las principales: (31)

- un efecto en la división celular; en este proceso son indispensables, pero ineficaces en ausencia de auxina; las dos se complementan, la auxina favorece la duplicación de los ácidos desoxirribonucleico (ADN) y la citocinina hace posible la separación de los cromosomas;
- un papel muy claro en la organogénesis, en la que brindan estimulación considerable a la formación de yemas;
- las citocininas (9), promueven la división celular y la organización de callos. Es decir que promueven la diferenciación de yemas y brotes adventicios de callos y órganos.

CUADRO 1. Características físicas y químicas de los reguladores del crecimiento utilizados en el cultivo *in vitro*.

Nombre	Solubilidad	Estabilidad	Conservación
AUXINAS			
AIA (Ácido Indol-3-acético)	Poco soluble en agua, solubles en etanol o metanol a 96°C.	Poco soluble se degrada con la luz.	Algunos días 4-5°C, oscuridad
ANA (Ácido Naftalenacético)	Soluble en metano y etanol a 96°C. Solubilidad en agua = 38 mg/l a 17°C	Estable a 120°C	4-5°C oscuridad o congelador
2,4D (Ácido 2,4 diclorofenoxiacético)	Poco soluble en agua, disolver en etanol, calentar, ligeramente Diluir poco a poco en agua.	Estable a 120°C	4-5°C oscuridad o congelador
CITOCININAS			
FAP (6 furfuri-aminopurina) cinetina	Solubles en NaOH, HCl (N), DMSO	Estable a 120°C en una solución acuosa. Se degrada con la luz.	4-5°C oscuridad o congelador
BAP (6-benzilaminopurina)	Solubles en NaOH, HCl (N), DMSO		4-5°C oscuridad o congelador
BA (benziladenina)			
2ip (Isopentiladenina)	Solubles en NaOH, HCl (N), DMSO		4-5°C oscuridad o congelador
Z (Zeatina)	Solubles en NaOH, HCl (N), DMSO	Estable a 120°C	4-5°C oscuridad o congelador
GIBERELINA			
AG ₃ (Ácido giberílico A ₃)	Soluble en metano-etanol, solución acuosa de bicarbonato de sodio, Moderadamente soluble en agua.	Poco estable se degrada con el calor	En alcohol puro y 4-5°C, oscuridad.

Fuente. Cultivo in vitro, H. Vidale. 1986.

3.1.4.5.c Interacción auxina-citocinina:

Según Skoog y Miller (1957) (7), encontraron que la formación de brotes pueden ser inducido previsiblemente de callos de tabaco usando relativamente bajos niveles de auxina y altos niveles de citocinina en el medio de

crecimiento. Desde este descubrimiento muchos aspectos de diferenciación celular y organogénesis en el cultivo de tejidos y órganos ha sido encontrado por una interacción entre concentraciones de citocininas y auxinas. El balance entre estas dos clases de reguladores que usualmente son requeridos para el crecimiento de iniciación o diferenciación en tejidos de cultivos se ilustra en el figura 1. (7)

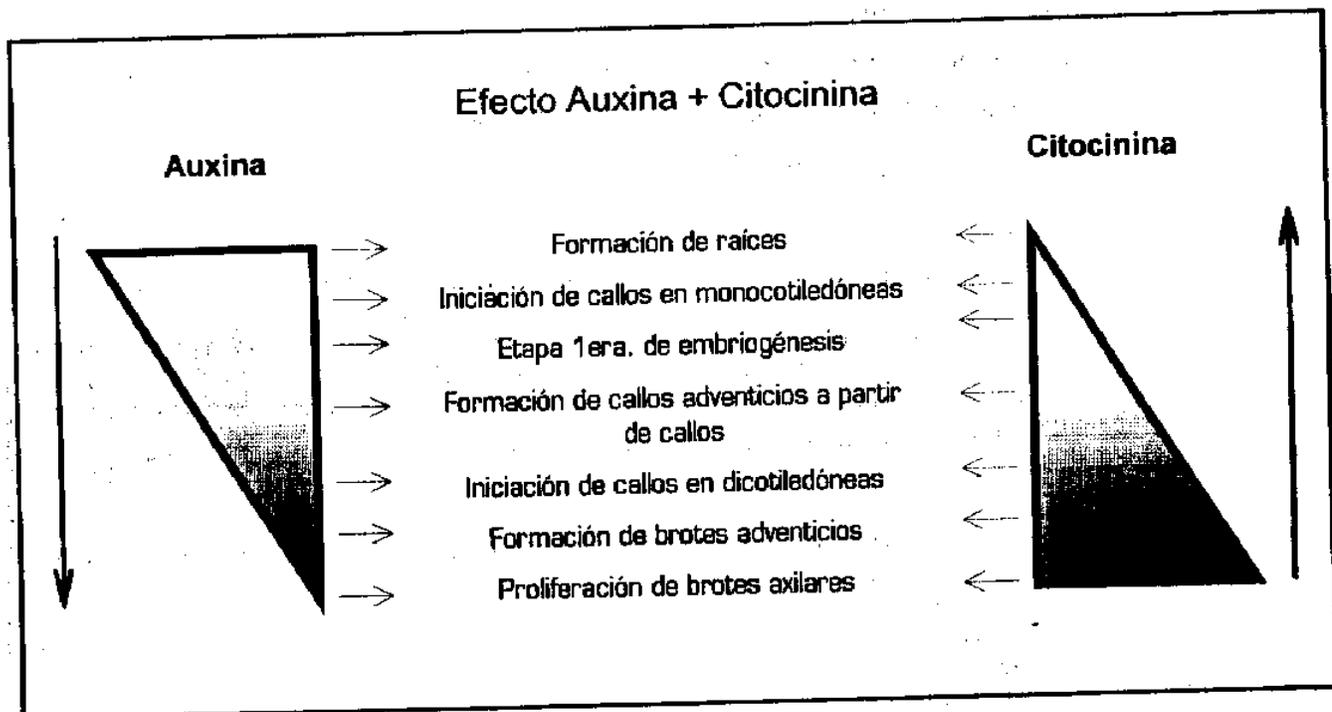


FIGURA 1. Concentraciones relativas de auxinas y citocininas típicamente requeridas para el crecimiento y morfogénesis. Según Skoog y Miller (1957). (7)

Dichas proporciones relativas de auxina y citocinina no siempre producen el resultado típico demostrado en la figura anterior. Por ejemplo:

- La proliferación de brotes axilares en algunas especies puede ser promovido por la presencia de una auxina junto una citocinina.
- El tejido de las monocotiledóneas pueden a menudo ser inducidos desde callos por cultivos en altos niveles de auxina sola, y la citocinina puede ser esencialmente o no importante.
- La organogénesis en monocotiledóneas es con frecuencia promovido por las transferencias de cultivos a un medio sin auxinas, reduciendo las concentraciones de auxinas altamente activas como 2,4-D, o sustituyendo este con otra auxina (AIA o ANA). (7)

Un balance entre estos reguladores del crecimiento es más con frecuencia requerido para la formación de brotes adventicios y meristemas de raíz. La concentración necesaria de cada tipo de regulador difiere mucho de acuerdo a la especie de planta, la condición del cultivo y los componentes usados en la interacción entre 2 clases de reguladores; es a menudo complejo, y más que una simple combinación de sustancias es probablemente para producir resultados óptimos. (7)

A pesar de la frecuencia necesaria tanto de auxinas y citocininas en el cultivo de tejidos, la naturaleza de las interacciones entre 2 tipos de reguladores es rara vez comentado sobre como se da dicha interacción. Todavía hay mucho que aprender; aunque sobre las auxinas y citocininas son normalmente requeridos para el crecimiento y morfogenesis, las auxinas pueden inhibirse durante la acumulación de citocininas, así como las citocininas pueden inhibir a más de algún proceso de la auxina. (7)

3.1.4.5.d Efecto de las giberelinas:

Se utilizan para inducir el desarrollo de embriones adventicios. En la mayoría de los casos, se usa AG_3 , entre varias giberelinas existentes (27). La actividad fisiológica, aplicado a plantas en general, las AG_3 pueden influir en el crecimiento y desarrollo de una variedad. Varios de los efectos del AG_3 en todas las plantas son causados por el selectivo crecimiento o disminución en la biosíntesis y en la actividad de las enzimas. Otro posible resultado es un cambio en la disponibilidad de auxinas endógenas. El ácido giberelico es descubierto para suprimir la síntesis de la fosfatasa y enzimas que tienen que ver con la producción de algunos productos secundarios; y la síntesis de α -amilasa y maltasa son estimulados, por ejemplo durante la germinación de semillas de cereal. (7)

El cultivo de tejidos de plantas puede ser generalmente inducido a crecer y diferenciarse sin giberelinas, aunque el ácido giberelico puede llevar a ser un ingrediente esencial del medio para el cultivo de células en una baja densidad. Cuando el AG_3 es adicionado al medio de cultivo, a menudo produce un efecto que son de similar naturaleza que las auxinas. Altas concentraciones de AG_3 (1-8 mg/lit) induce el crecimiento de células indiferenciadas de callos, y puede promover el crecimiento de callos en combinación con auxinas y bajos rangos de citocininas. (7)

Un factor de crecimiento, que es probablemente una giberelina, es producido por la germinación de embriones de algunas especies de plantas y debe ser transmitido a él endosperma antes que el tejido prolifere para formar callos en el cultivo. Donde la presencia tanto de auxinas y citocininas en un medio de crecimiento aventaja para el acallamiento rápido en la superficie del corte de un explante. La nueva adición de una cantidad de AG_3 (0.1 mg/lit) o la reposición de la auxina por AG_3 realmente inhibe el desarrollo de callos. (7)

3.1.4.6 Otros componentes del medio de cultivo:

Aguilar (1) y Villalobos (32), reconocen que existen otros componentes de los medios de cultivo, que son importantes como por ejemplo, el agua y el pH.

Los medios de cultivo de tejidos están constituidos en su mayor parte por agua; por lo tanto, es necesario utilizar agua de intercambio iónico o agua destilada, ya que el agua natural incluye algunas sustancias que pueden causar alguna influencia negativa para el crecimiento de la planta *in vitro*. (24)

3.1.4.7 Algunos antibióticos utilizados dentro del medio de cultivo:

El desarrollo de algunos microorganismos como hongos y bacterias es muy común dentro del medio de cultivo, los cuales pueden ser factores detrimentales y adversos dentro de la producción de plantas en cultivo *in vitro*, existen compuestos químicos que ayudan a controlarlos en la mayor parte, algunos de estos compuestos pueden ser termoabiles, es decir que pueden ser degradados por altas temperaturas, por lo que deben ser aplicados a una temperatura no mayor de 50°C y en un ambiente totalmente esterilizado, para evitar la contaminación del medio de cultivo. Estos pueden ser aplicados dentro del medio en forma directa o en solución, diluidos para obtener una mejor mezcla con el medio de cultivo. Para la obtención de una buena solución estos pueden ser filtrados y luego aplicados dentro del medio de cultivo.

Los antibióticos son algunas veces usados para remover o controlar contaminantes que pueden pasar en el cultivo una vez que estén establecidos y han sido empleados de vez en cuando para quitar de la superficie los contaminantes del explante. Ellos pueden también ser efectivos rociando a las plantas madres para ocasionar un nivel bajo de contaminación (7). A continuación se presentará algunos de los antibióticos utilizados para la eliminación directa de microorganismos del explante (cuadro 2):

CUADRO 2. Antibióticos utilizados dentro del medio de cultivo para control de hongos y bacterias.

Producto	Concentración µg/ml	Solución para la disolución	Solución Madre mg/lt	Rangos de Concentración µg/ml
Ampicilina	50	Agua	50	20 ~ 60
Tetraciclina	20	Etanol	5	10 ~ 50
Cloranfenicol	100	Etanol	100	25 ~ 170
Canamicina	20	Agua	20	10 ~ 50
Estreptomicina	20	Agua	20	10 ~ 50

Fuente. Yearbook Merck. 1995.

3.1.4.8 Modificación del potencial redox (pH):

Aguilar (1) opina que el pH debe oscilar entre 5.6 y 5.8 este tiene influencia en el acondicionamiento de que sales permanecen solubles en el medio y además influyen en la asimilación de los nutrientes del medio.

3.1.4.9 Forma de preparar el medio de cultivo:

La preparación del medio de cultivo generalmente se realiza elaborando soluciones madres o concentradas. Recientemente existen en el mercado medios de cultivo preparados. (11) (26)

Para reducir pasos en la preparación de un medio de cultivo se combinan varias sustancias en una solución concentrada, siendo importante la calidad de los reactivos químicos, (que deben ser de grado analítico) y la del agua, la cual debe ser ionizada y bi o tridestilada. En la elaboración de soluciones concentradas, se debe considerar que algunas sustancias son incompatibles con otras ciertas concentraciones, por lo que deben ser preparadas individualmente. Por ejemplo: el calcio no puede mezclarse con fosfato o sulfato, ni el magnesio con fosfato. Para fines prácticos la concentración de la solución puede ser 100 veces la concentración final del medio. (11) (26)

Las soluciones de sales inorgánicas pueden ser almacenadas por tiempo indefinido a la temperatura ambiente. Sin embargo, la que contiene hierro debe ser protegida por la luz. Las soluciones de algunas sustancias orgánicas, como son las citocininas, podrían conservarse a temperatura ambiente, aunque generalmente se refrigeran las auxinas necesariamente deben estar en el refrigerador, soluciones de AIA deben ser utilizadas antes de dos semanas. Soluciones de ácido ascórbico, giberelinas y otras necesitan ser preparadas cada vez que se utilizan. (11) (26)

El pH de los medios se ajusta generalmente entre 4.8 y 6.0 antes de la esterilización. Este ajuste depende de:

1. Efecto del pH sobre el tejido.
2. Efecto del pH sobre la consistencia del medio (a 4.8 de pH, los medios son blandos y a pH 6.0 son de consistencia dura).
3. El pH se ajusta con NaOH ó HCl 1N.

El agar se adiciona una vez que el pH se ha ajustado, y posteriormente se licúa con temperatura. La esterilización del medio se realiza comúnmente en autoclave a 121°C (15 lb/PU², 1,05kg/cm ó 10354 Kpa) durante 15-20 minutos. (26)

3.1.5 Ventajas y desventajas de la Micropropagación:

La mayoría de autores en general coinciden en que son 4 las ventajas principales que otorga el cultivo de tejidos para el desarrollo de la producción: (5) (6) (18)

- a. Una alta tasa de propagación.
- b. Comercialización rápida y eficiente de una variedad con características productivas homogéneas
- c. Propagación de plantas difícil propagación vegetativa.
- d. Propagación de clones provenientes de plantas sanas con genotipos de alta productividad
- e. Aplicación al mejoramiento genético en períodos de tiempo relativamente cortos.

- f. Normalmente, se eliminan diversas enfermedades en el proceso, por consiguiente, facilita la producción y la calidad de las plantas.

En cuanto a desventajas Vázquez, Mejía y Carrillo (28) indican lo siguiente:

- a. No todas las especies vegetales pueden propagarse con facilidad por este método
- b. Las plantas obtenidas por estas técnicas tienen una estrecha base genética, lo que las hace susceptibles a plagas y enfermedades.
- c. La inestabilidad genética que se obtiene donde se han utilizado altas concentraciones de hormonas.

3.1.6 Problemas que limitan el desarrollo del cultivo de tejidos en plantas con crecimiento secundario:

De acuerdo a Randolph y otros autores (18) dos son los factores que afectan el desarrollo de cultivo de tejidos como a nivel de investigación como comercial: los factores económicos y factores técnicos.

3.1.6.1 Factores económicos:

3.1.6.1.a El costo 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. (6) (18)

La forma más variable 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 estos lo constituyen 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 cultivos suplementados con citocininas, lo que conduce a una formación rápida de brotes y aun menor número de subcultivos para la liberación de las mismas. (6) (18)

3.1.6.1.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 permiten recuperar el alto costo de la 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 considerando como mínimo para el proceso productivo a gran escala de tal manera puedan propagarse miles de plantas en un período relativamente corto. (6)

Un ejemplo que ilustra esto es la producción de un híbrido de melocotón y almendro donde los esfuerzos iniciales se situaron en obtener durante el verano inicial el suficiente número de puntas que permitiera una producción semanal de 5,000 plantas durante las primeras tres semanas, llegando a producir hasta 300,000 plantas por año. (18)

3.1.6.2 Factores técnicos:

3.1.6.2.a Establecimiento del cultivo:

La selección apropiada del material para el establecimiento de el cultivo continua siendo uno de los mayores problemas e n algunas plantas, especialmente árboles como coníferas y algunas latifoliadas 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. (5) (6) (18)

La selección del explante esta definida por el objeto perseguido y la especial vegetal utilizada (20), 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 (20). También debe de tomarse en cuenta que la selección del explante esta ligado a su disponibilidad en el campo, a su fácil manipulación, a su homogeneidad, a una fácil desinfección y a un período de respuesta relativamente corto. (20) (24)

3.1.6.2.b Contaminación de los cultivos:

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, continua 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. (5) (6) (18) Dado que la desinfección o esterilización del tejido influye no sólo en la contaminación o no del mismo sino en su capacidad de regenerarse en el medio de cultivo la técnica de desinfección utilizada de estar orientada a lograr un mínimo de contaminación y oxidación prematura del explante por efectos de plasmolisis. (20)

Existe una amplia gama de compuestos químicos que se pueden utilizar (ver anexo) como desinfectante 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 tensioactivo 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)

3.1.6.2.c Fenolización del tejido:

Otro gran problema no menos importante es la decoloración del tejido o explante por la formación de fenoles y polifenoles en el mismo, la cual es apreciado directamente en la coloración del medio a las orillas del explante. Lo cual

puede ser eliminado utilizando antioxidante como el ácido cítrico (150 mg/lit) sumergiendo los explantes al momento de realizar el lavado o el carbón activado en dosis de 1000 mg/lit en el medio de cultivo. (5) (6) (18)

3.1.6.2.d Estabilidad genética del material vegetal:

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. Una variación genética y epigenética que se da en los explantes y propágulos, pueda dar como resultado un aspecto y comportamiento diferentes a los que se producen por métodos de propagación tradicional. (18)

En general la propagación con altas concentraciones hormonales puedan causar variación; también influye en este 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 el cultivar correcto y que no constituya una variante de la misma.
- 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 subcultivo más de tres veces.
- Observación de las plantas propagadas: Al fina 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 pretransplante. Seguidamente deben realizarse pruebas de descendencia que garanticen que las plantas producidas son apropiadas para el propósito a que se destinen para lo cual puede recurrirse a pruebas como el análisis fenotípico de la progenie o el uso de isoenzimas como marcadores genéticos. (8)

3.1.6.2.e Vitrificación de los explantes:

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 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. Bajo 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 del 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. (20)

3.1.7 Propagación del Aguacate:

En el cultivo del aguacate pueden aplicarse dos medios de propagación sexual: semillas, y asexual: por estacas o por injertos, generalmente. El primero es poco usado porque las estacas desarrollan un sistema radicular pequeño e insuficiente para sostener la parte aérea. (20)

3.1.7.1 Problemas en la propagación del aguacate:

La propagación y multiplicación del aguacate se lleva a cabo principalmente por la reproducción sexual de las semillas, de las cuales se obtienen los patrones o portainjertos que recibirán los injertos correspondientes de las variedades seleccionadas. La reproducción sexual se considera poliembriónica, ya que de ella emergen más de una planta. No se recomienda este tipo de propagación porque las plantas provenientes de semillas alcanzan un gran desarrollo vegetativo, tardan en comenzar a fructificar y dificultan las labores de cosecha. (5)

En las explotaciones comerciales no se utilizan las plantas originadas de semilla pues, como la fecundación de las mismas es cruzada, existe una gran cantidad de caracteres genéticos que no se pueden controlar presentándose entonces el inconveniente de árboles de gran tamaño, un mayor número de años para comenzar a producir comercialmente (a los 7 ó 12 años), y una gran heterogeneidad en la producción de frutos en lo referido a tamaño, peso, color y sabor. Los patrones obtenidos de semilla también presentan, por ser individuos heterocigotos, muchas diferencias en cuanto a tamaño de la raíz, resistencia a enfermedades, frío, salinidad y calcio. Es decir que en una misma plantación existe gran heterogeneidad de comportamiento de los patrones y sus respectivas raíces.

3.1.7.2 Propagación de árboles de aguacate injertados sobre plántulas provenientes de semilla y sobre patrones clonales:

La reproducción sexual, es la que se efectúa por medio de semilla, considerándose poliembriónica, ya que de ella emergen más de una planta. No se recomienda este tipo de propagación porque las plantas provenientes de semilla alcanzan un gran desarrollo vegetativo, tardan en comenzar a fructificar y dificultan las labores de cosecha, además de presentar una variabilidad genética muy marcada de acuerdo a las características de la planta madre. (5)

3.1.8 Cultivo *in vitro* de ápices y yemas axilares para la obtención rápida de plantas:

El desarrollo de ápices *in vitro* ha contribuido significativamente al conocimiento y aplicación práctica en tres aspectos: a) morfógenesis; b) multiplicación masiva de clones; c) obtención, conservación y establecimiento de plantas libres de patógenos (20). En 1952, se publicó por primera vez que mediante el cultivo aséptico de ápices se obtuvieron plantas sanas a partir de individuos enfermos de virus. Desde ese año, se abrió una importante alternativa para muchas especies, principalmente aquellas de multiplicación asexual. Aun cuando de otros tejidos se pueden obtener plantas sanas, los ápices tiene algunas ventajas a causa de su rápido crecimiento y su estabilidad genética. (24)

En los años 60, el desarrollo de procedimientos para multiplicar y mantener plantas en cultivos asépticos recibió un impulso dramático; ello se debió al descubrimiento de la capacidad que tienen las puntas de los brotes y los meristemos de la orquídea *Cymbidium sp.* Cortados apropiadamente y sembrados en cultivo aséptico, para producir protuberancias que semejan protocormos normales capaces de crecer y desarrollarse en plántulas (American Orchid Society Bullen, 1960-1968; Moul, 1974; Arditii, 1977). (31)

Desde entonces se han usado los cultivos de puntas y brotes y de meristemos de muchas otras plantas para obtener, mantener y multiplicar los materiales genéticos; de una punta de brote cultivado o de un explante, en algunos casos, se regenera una planta y en otros casos se puede estimular la formación de brotes múltiples. (31)

En realidad, en cada uno de estos casos se espera a menudo lograr la formación de ramas axilares que puedan separarse y enraizarse; teóricamente los brotes axilares y laterales pueden a su vez producir ramas axilares adicionales a perpetuidad, a medida que se subcultiva cada brote recién formado a cada explante de nudo. Por lo tanto el método es bueno para obtener una rápida multiplicación clonal, y se ha aplicado a una gran variedad de especies, desde las herbáceas hasta las leñosas. (20)

3.1.9 Conservación *in vitro* de *Persea americana*:

Las colecciones de germoplasma de arboles propagados clonalmente tal como el aguacate son mantenidos normalmente en campos *ex situ*. Aunque tales colecciones son útiles como herramientas accesibles para el estudio y evaluación de germoplasma, campos de genes son particularmente vulnerables a enfermedades, daños por severas condiciones de clima y descuidos. Esas enfermedades deberían ser eliminadas normalmente durante la reproducción de semillas ya que podrían poner en peligro el germoplasma de arboles propagados clonalmente y/o amenazar la colección entera. El cuidado adecuado y un mantenimiento de gran amplitud de plantas vivas en colecciones de germoplasma de arboles propagados clonalmente utiliza una fuerte carga financiera para algunas instituciones. (12)

Los métodos de cultivo de tejidos y de células esta siendo usado cada vez más para dirigir los problemas asociados con los medios de cultivo y el almacenaje a largo plazo de germoplasma de clones. La fitosanación y la regulación cuarentenaria de plantas ha tenido un impacto en el procedimiento *in vitro*. Por ejemplo, el uso de puntas meristemáticas en los cultivos y la Micropropagación ha tenido un impacto significativo en la salud de muchas plantas

propagadas vegetativamente, notablemente en *citrus* (Navarro et al 1975) y ha favorecido los componentes esenciales para el intercambio internacional de material de plantas saludables. (12)

La principal limitación de el uso del cultivo de células y tejidos para la conservación de germoplasma es la inherente estabilidad genética de ciertos tipos de regeneración a utilizar que implica una fase de callos, por ejemplo, la organogénesis y de mucho menos alcance, embriogénesis somática. De este modo, los callos están considerados inapropiadamente como un tejido para la conservación clonal de germoplasma, tal como la mayoría de plantaciones frutales. Aunque la variación del cultivo de tejido relacionado, por ejemplo, la variación somaclonal, puede ser una importante fuente de diversidad genética. Los procedimientos *in vitro* que impliquen a estructuras organizadas, incluyendo los meristemos, brotes apical/lateral y el cultivo embriogénico (masas de proembriones o PEM_s) son los materiales preferidos para estudios, implicando las condiciones del medio y el tiempo de almacenamiento de los recursos genéticos, respectivamente (Ashmore, 1977; Engelmann, 1991; Withers, 1992). (12)

El uso del cultivo de células y tejidos para la conservación de germoplasma ha dependido en gran parte en la capacidad de 1) En la regeneración total de plantas *in vitro* con lento crecimiento en el cultivo de brotes apical/lateral y 2) imponer lentas condiciones de crecimiento en el cultivo de brotes apical/lateral. Muy pocas especies frutales del trópico y subtropical propagadas vegetativamente han sido regenerados por medio de este método derivados de su fase adulta.

Hasta la fecha, el uso de técnicas para el cultivo de brotes apical/lateral para su conservación han sido largamente confinados a especies herbáceas y arbustivas, en donde las rutas de regeneración ya han sido bien definidas. Existen excepciones para algunas especies de frutales tal como la manzana *Malus domestica* (Landergeran & Janick, 1979), mulberry *Morus nigra* (Wilkins et al., 1988), *Prunus spp.* (Druart, 1985; Marino et al., 1985), para *Pyrus communis* (Wanas et al., 1986), uva *Vitis spp.* (Barlass & Skene, 1983), granada *Punica granatum* (Wilkins et al., 1988) y Kiwi *Actinidia chinensis* (Wilkins et al., 1988). Solamente una única especie tropical, café *Coffea arabica* (Kantha et al., 1981), ha sido almacenado como un cultivo de brotes axilares/laterales. (12)

Según Litz (1988), el cultivo de inducción de embriones ha sido reportado de tejidos en la fase adulta de algunas especies frutales y forestales importantes de la región del trópico y subtropical. El cultivo de embriones consiste en masas de proembriones (PEM_s), embriones somáticos globulares que no pueden desarrollarse en presencia de condiciones inductivas, usualmente una auxina fuerte. En la presencia de la auxina fuerte, las células embriogénicas y los conglomerados de células se encuentran continuamente en la superficie de PEM_s, y también tienen un potencial en el desarrollo de PEM_s secundarios. Las masas proembrionicas pueden desarrollarse como embriones somáticos si están expuestos a condiciones no inductivas; los embriones somáticos pueden desarrollarse para su maduración y germinación. (12)

3.1.10 Avances en la reproducción de aguacate *in vitro*:

El desarrollo de nuevos sistemas de cultivo *in vitro* para el aguacate esta aún iniciando. Existen métodos de regeneración de plantas por medio de puntas meristemáticas, aunque las etapas ontogénicas de el material parece ser crítico al momento de la propagación masiva. La embriogénesis somática ha demostrado también ser una buena herramienta aunque la conversión regular de embriones somáticos en plantas no ha sido logrado con efectividad. (16)

Según Dalsaso y Guevara (4), la respuesta obtenida a través de la regeneración y multiplicación *in vitro* de *Persea americana* cv. "Fuerte" por medio de yemas axilares y microestacas, obtuvieron una respuesta significativa en el crecimiento y la formación de tallo al utilizar una serie de combinaciones de reguladores y sales minerales. El mejor crecimiento y la formación de tallo se obtuvieron al utilizar 2,0 mg/lt de BAP y 0,5 mg/lt de AIB, tanto a partir de yemas como microestacas. (4)

3.1.10.1 Cultivo de embriones de aguacate:

El cultivo de embriones ha sido usado en programas de reproducción de aguacate para recuperar genotipos de valiosas características, que de otra manera estuvieran aún perdidas debido a la abscisión de la fruta. Skene & Barlass (1983) cultivaron embriones inmaduros con éxito de frutos abscisados. Parece ser que la edad sea un factor crítico para su desarrollo, tan solo embriones de más de 6 semanas mostraron una buena supervivencia *in vitro*. Los macroelementos del MS diluidos (Murashige & Skoog, 1962) y un suplemento de 2.2 μ M 6-benciladenina (BA) fueron componentes claves en el medio de cultivo. (16)

El desarrollo de brotes fue contrariamente afectado por la presencia de cotiledones, que fueron por tanto removidos. Desde que el enraizamiento de brotes fueron pobres, estos se injertaron en un inverdadero-semillero para asegurar la evaluación de los híbridos por sus rasgos agronómicos. El pobre enraizamiento contrasta con los resultados reportados por Pliego-Alfaro (1988) quien obtuvo un 100% de enraizamiento en brotes de semillas maduras germinadas *in vitro* en un medio sólido sin reguladores del crecimiento. (16)

Aunque Schroeder (1956; 1961; 1971) y otros investigadores, como es el caso de Blumenfeld & Gazit (1971), reporta que los callos pudieron ser iniciados del pericarpio del fruto de aguacate y otras partes de la planta. (15)

Subsecuentemente, numerosos estudios reportaron que cortes de brotes apical/lateral de plantas de viveros pudieron proliferar (Gonzalez-Rosas & Salazar García, 1984; Harty, 1985; Vega-Solorzano, 1989) brotes individuales y luego pudieron ser enraizados (Cooper, 1987; Biasi, 1994; Barringer et al., 1996). Resultados similares han sido descritos con otras especies de *Persea*, incluyendo *P. schiedeana* (Gonzales-Rosas et al., 1985), *P. indica* (Nel et al., 1987), *P. palustris* (Kane et al., 1989), *P. borbonia* (Witjaksono, 1997), *P. cinerascens* (Witjaksono, 1997), y *P. pachypoda* (Witjaksono, 1997). (34)

La recuperación de cultivos proliferados de cultivos de brotes apical/lateral en etapas adultas de aguacate han sido mucho más dificultoso lograr. Pliego-Alfaro & Murashige (1987), Pliego-Alfaro et al. (1987) y Schall (1987) parcialmente rejuvenecieron material de aguacate por medio de microinjertos de brotes en patrones de plantas de

vivero y obtuvieron vástagos con un 30% de enraizamiento en los brotes individualmente. Este complejo proceso no ha sido reportado por otros investigadores. (15)

3.1.10.2 Iniciación de callos de explantes de aguacate:

Schroeder (1957), fue capaz de inducir callos proliferados de secciones de mesocarpio de casi frutos maduros de aguacate. Otros explantes han sido usados para iniciar callos después de cultivarlos en un medio de Nitsch & Nitsch (Schroeder, 1977). El medio MS suplementado con $1.3 \mu\text{M}$ BA (ácido Benciladenina) y $5.7 \mu\text{M}$ IAA (ácido Indolacético) (Blickle et al., 1986), o en el medio de Anderson (1975) con $4.5 \mu\text{M}$ de 2,4-D (ácido Diclórofenoxiacético) (Young, 1983). Con temperaturas cercanas a 25°C con baja irradiación, $20\text{-}35 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, parece aumentar la callosidad (Schoeder, 1971; Young, 1983), durante elevados niveles de irradiación. Son inhibidos comparando el comportamiento *in vitro* de callos de tejidos de cotiledones y el mesocarpio, Blumenfeld & Gazit (1971) demostraron que los callos derivados de cotiledones sintetizaron su propia citocinina y pudieron haber crecido en un medio desprovisto de esta hormona. La formación de brotes adventicios no han sido reportados desde callos de aguacate; sin embargo, raíces se han originado algunas veces desde callos formados (Schroeder et al., 1962; Schroeder, 1973). (16)

3.1.10.3 Embriogénesis somática en aguacate:

La embriogénesis somática han sido observados de callos de aguacate de embriones zigóticos. 2 factores parecen ser críticos: embriones zigóticos de 0.5 mm de longitud como explantes y la presencia de $0.1 \text{ mg picloram}\cdot\text{l}^{-1}$ en un medio de iniciación (Mooney & van Staden, 1987); Pliego-Alfaro & Murashige, 1988). Callos embriogénicos pueden ser mantenidos en el mismo medio (Pliego-Alfaro & Murashige, 1988) o en la presencia de $\text{N}_6\text{-}[-2\text{-isopentenyl}]$ adenina y ácido benzotiazol-2-oxiacético (Mooney & van Staden, 1987). El desarrollo de embriones somáticos y la regeneración de plantas, aunque en bajas frecuencias pueden ser observados en un medio libre de hormonas. (16)

La inducción de embriones somáticos de las variedades "Fuerte" y "Duke 7" con embriones zigóticos jóvenes fue descrito por Pliego-Alfaro (1981) y Pliego-Alfaro & Murashige (1988), y luego fue confirmado por Mooney y van Staden (1987) con la variedad "Hass". Los procedimientos para el cultivo embriogénico induciendo como explantes a embriones zigóticos fue más avanzado por Witjaksono & Litz (1999 a, b) (36, 37) usando un gran rango de genotipos de aguacate, representado por las razas mexicanas, guatemaltecas y las Antillas, y supuestamente híbridos de 2 o más razas. Ellos distinguieron 2 respuestas *in vitro* distintas que fueron fuertemente el cultivo-dependencia: el cultivo embriogénico de cultivares que diferenciaron embriones somáticos directamente sobre/en un medio de inducción y el cultivo embriogénico de cultivares que quedaron como PEM_s sobre/en un medio de inducción. Ellos caracterizaron más las condiciones de iniciación y el mantenimiento del cultivo en suspensión embriogénico, que es importante para la producción a escala de PEM_s . Embriones somáticos de aguacate at maturity germinate con un bajo rango de conversión (Mooney and van Staden, 1987; Pliego-Alfaro & Murashige, 1988; Witjaksono & Litz, 1998 b). Sin

embargo, la eficiencia de recuperación de plantas puede ser grandemente aumentado si la regeneración de brotes son micropropagados por medio del cultivo de brotes apical/lateral y enraizados individualmente (Witjaksono & Litz, 1998 b)(37) Witjaksono (1997) (34) también reporto que las nucellas de semillas jóvenes de aguacate pueden ser usados como un explante para el cultivo de inducción embriogenico. Las nucellas es de origen maternal; los embriones adventicios dentro de las semillas poliembriónicas de *Citrus*, mango y muchas otras especies son derivados de las nucellas. La recuperación de aguacate por medio de embriones somáticos nucelares tiene mucha trascendencia para la propagación de patrones clonales seleccionados. Para la ingeniería genética de patrones y cultivares y la crioconservación de germoplasma de clones de aguacate, siguiendo la época de floración, "Hass", "lamb Hass" y "Thomas", embriones somáticos nucelares han sido rescatados y el cultivo embriogenico de "Lula" ha sido establecido (Witjaksono & Litz, resultados no publicados). (36) (37)

3.1.10.4 Formación de callos a través de protoplastos de aguacate:

Los protoplastos fueron obtenidos de tallos jóvenes; los callos de aguacate se obtuvieron plasmolisando las células en una solución con manitol 0.7 M y 0.4% de glicol polietileno (PEG) 6000. Seguido de la plasmolisis, se encubaron en una solución que contiene 1% Onozuka cellulase RS y 0.1% pectolyase Y23 el cual fue necesario para producir $2-3 \times 10^6$ protoplastos g^{-1} de callos (Blickle et al, 1986). (16)

Los protoplastos pueden ser aislados, cultivados y regenerados a partir de suspensiones embriogenicas, (Witjaksono, R.E. Litz & J.W. Grosser, 1998) (35). Los protoplastos fueron derivados de embriones zigóticos y nucelas de aguacate (*Persea americana* Miller) por medio de una enzima digestiva. El aislamiento se realizo en una solución de 1% de Celulasa Onozuka RS, 1% de Macerasa R10, 0.2% Pectolyase Y-23, manitol 0.7M, $CaCl_2$ 24.5 mM, NaH_2PO_4 0.92 mM y 6.25 2-[-N-morfolina] ácido etanosulfónico (1.5 ml) mezclado con MS8P (2.5 ml) 0.7 M. El medio MS8P consistió en las sales de Murashige & Skoog sin NH_4NO_3 , 1 mg l-1 thiadine HCl, 100 mg l^{-1} mio-inositol, 3.1 mg l^{-1} de glutamina y 8 Porgamine addenda. El medio osmolarizado fue ajustado con sucrosa 0.15 M y manitol 0.055 M. La producción de protoplastos fue de 3.5×10^6 protoplastos g^{-1} . El crecimiento y el desarrollo de los protoplastos fue significativamente afectado por la osmolarización, fuente de nitrógeno, planting densidad y la dilución del medio de cultivo. De acuerdo con las optimas condiciones el desarrollo de proembriones se da directamente de protoplastos embriogenicos y subsecuentemente en embriones somáticos. Las condiciones optimas para el desarrollo de embriones somáticos incluyeron el cultivo de protoplastos a una densidad de $0.8-1.6 \times 10^5$ ml^{-1} en el MS8P 0.4 M por 2-3 semanas, seguido del subcultivo en MS8P 0.15M en una densidad diluida de 20-40 x por un mes en oscuridad para conseguir embriones somáticos. Embriones somáticos maduros fueron recuperados en una medio semisólido, sin embargo, se observo además una baja frecuencia de recuperación ($\leq 1\%$) de protoplastos derivados de embriones somáticos. (35)

3.2 MARCO REFERENCIAL:

3.2.1 Origen del aguacate:

El aguacate es la *Persea americana* Miller de la familia de las lauráceas. Es nativo de la México, Guatemala y zonas adyacentes de Norte y Sur América. (23)

3.2.2 Distribución actual:

Después que los europeos vinieron a América, el aguacate gradualmente se diseminó a la mayor parte del mundo tropical y subtropical. Su crecimiento ahora de consumo está en todas las partes del mundo y en numerosas islas oceánicas en donde el clima es el adecuado. Con una producción mundial total estimada en 1,700 ton métricas donde el nuevo mundo contribuye con más del 75% de la producción mundial. Solo México reporta por casi el 25% de el total producido. California, Brasil y la República Dominicana junto con México, proporciona la mitad de la producción mundial. En regiones tropicales húmedas, solamente las razas Antillanas están bien adaptadas para la temporada comercial. En menos área tropical líneas Antillanas pueden ser afectadas, perjudicadas por temperaturas cerca de 0°C; o la suspensión de la floración por el clima del mediterráneo, cual al parecer los árboles se observan sanos y bien establecidos. Para estas regiones las razas guatemaltecas son preferidas por su tolerancia y adaptabilidad a las bajas temperaturas, pero son los cultivares con genoplasmata de México que prolongan la temporada de producción, además la mayor resistencia a grandes periodos de heladas. (16)

3.2.3 Importancia del aguacate en el mercado mundial:

México produce más de 500,000 toneladas de aguacate al año. La producción es por término medio 10 ton/ha. Alcanzando un volumen de consumo anual de 625,000 ton/año (3). Sólo se exporta el 1% de la producción de aguacates; el 99% de la producción se consume en el país (3). La variedad más común e importante es el Hass, al que le siguen otras variedades como Fuerte, Booth 7, Booth 8, Azteca, Zutano, Bacon y Colin V33.

Los Estados Unidos de América son el tercer productor mundial de aguacates, después de México y el Brasil. La producción total de EUA en 1989/90 fue de 1,590 ton. California tiene el 86% de las plantaciones de aguacate de los EE.UU. y el sur de Florida posee el resto. (3)

La industria californiana está basada en variedades de la raza guatemalteca y mexicana. La variedad que más se cultiva es el Hass, que representa el 66% de las plantaciones. La fruta de Hass ya se puede obtener durante todo el año, menos en octubre y noviembre. Aunque California sólo exporta aproximadamente el 4% de su producción, ésta cantidad representa el 95.5% del total de las exportaciones de aguacates de los EE.UU. El Japón es su mercado exterior más importante. (3)

Los mercados europeos tienen exigencias de calidad muy estrictas, para asegurar una duración adecuada de almacenamiento y para reducir al mínimo las pérdidas, ya que ese fruto es todavía relativamente costoso. Por consiguiente, una comercialización con éxito de aguacates en Europa depende en gran parte que se apliquen escrupulosamente buenas y prácticas estrictas de manipulación y envasado. El Reino Unido, Francia y Alemania son los principales mercados europeos para las frutas exóticas.(3)

Las exportaciones desde Guatemala se ven limitadas, en primer término por las restricciones para su importación en el mercado de Estados Unidos, en segundo término, por la ausencia de una adecuada red de transporte que movilice el producto eficientemente y a costos competitivos hacia otros mercados. (3)

Los embarques de aguacate guatemalteco hacia Estados Unidos están prohibidos debidos a las plagas de las semillas y moscas de la fruta que atacan el aguacate. De acuerdo con las autoridades agrícolas de los Estados Unidos, las plagas en la semilla del aguacate son: *Helipus lauri* bohemann y *Stenomoma catenifer* walsingham. Además, aunque rara veces, la mosca (*Anastrepha ludens*) (3)

Para poder acceder mercados internacionales es necesario reunir fuertes volúmenes y una buena calidad, los excedentes pueden industrializarse y comercializarse como guacamol en el mercado nacional e internacional. Recientemente se abrió el mercado de los Estados Unidos para el aguacate en fresco de México, para la temporada 97-98, tendiendo a encarecer el producto en el propio México y lo que destinan para el mercado centroamericano. (17)

Según un informe reciente del programa PROFRUTA-MAGA-IICA (17), las estimaciones sobre el área sembrada, variedades y producción fue basado por un inventario técnico que cubrió las principales áreas de producción de aguacate. En el siguiente cuadro puede observarse que las principales áreas de producción, se encuentra en el municipio de Sacatepequez, Chimaltenango y Quetzaltenango. Con relación a las variedades cultivadas sobresale el área cultivada con la variedad Hass, siguiéndole en orden de importancia Booth-8 y Fuerte. (cuadro 3)

CUADRO 3. Distribución del cultivo de aguacate por variedades en los principales departamentos de Guatemala (Ha.). (17)

DEPARTAMENTO	HASS	FUERTE	AZTECA	PANCHOY	COLLIN RED	OBREGON	BOOHT-8	OTRAS	TOTAL
SACATEPEQUEZ	21.40	16.25	8.66	6.46	5.73	0.18	0.00	5.20	61.88
CHIMALTENANGO	8.52	5.96	4.06	5.97	4.33	0.00	0.00	0.00	28.84
SOLOLA	2.76	3.36	4.58	2.44	0.50	0.00	0.00	0.69	13.84
QUETZALTENANGO	17.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	37.00	0.00	54.00
HUEHUETENANGO	3.43	0.00	0.00	2.45	1.12	0.00	0.00	0.00	7.00
SANTA ROSA	11.85	0.00	0.00	4.03	0.36	0.00	0.00	0.00	16.24
ALTA VERAPAZ	0.22	0.00	0.05	0.04	0.14	0.00	0.00	0.00	0.45
BAJA VERAPAZ	15.18	1.05	3.84	5.60	3.11	0.00	1.79	0.18	30.75
GUATEMALA	1.70	0.00	0.00	0.35	0.00	0.00	0.00	0.00	2.05
TOTAL	82.06	26.62	19.19	27.34	15.29	0.18	38.79	5.38	214.85

Fuente: PROFRUTA-MAGA-IICA. 1997.

La producción de Aguacate registrada para Guatemala para los años 1994-98 (ver figura), fue en su totalidad de la variedad Hass (95%). Se pudo observar que desde 1994 la extensión total de siembra fue de 290 Ha. con una producción promedio de 435 Ton. Métricas, pero para 1998 se observó un incremento en la extensión cultivada en el cultivo de aguacate de 450 Ha. (55 %), con una producción promedio de 1,350 Ton. Métricas (210% de incremento en la producción) notándose la importancia que este cultivo presentó a los productores debida a la demanda mundial que tiene este cultivo, pero por razones de calidad y debido a la fuerte oferta que presenta México hacia otros países de exigentes demandas, Guatemala no ha podido exportar ya que no cumple con las exigencias marcadas por dichos países.

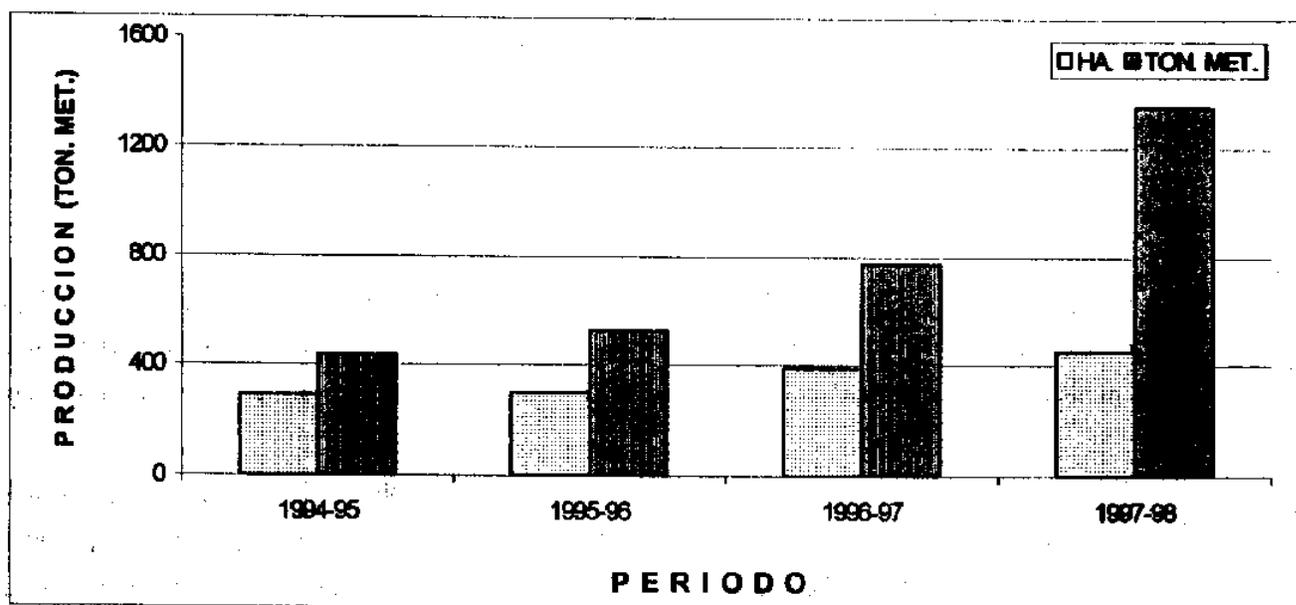


FIGURA 2. Producción de aguacate en Guatemala utilizando variedades mejoradas (95% Hass), durante el periodo 1994-98. PROFUTA-MAGA-IICA.

Según el Departamento de Cuarentena Vegetal del Ministerio de Agricultura, Guatemala, durante el periodo de 1984 - 1990, exportó aguacate a países Centroamericanos como: El Salvador, Honduras, Nicaragua y Costa Rica (3). Pero Actualmente existe una demanda insatisfecha de aguacate variedad Hass en Guatemala y Centro América, la cual está siendo suplida por México. (17)

En la temporada 95-96 se comercializaron en Guatemala semanalmente hasta 6 contenedores, de 400 qq cada uno, una cifra estimada pudo comercializarse en El Salvador y otra igual en Costa Rica. Los países de Honduras, Nicaragua y Panamá consumen de 3 a 5 contenedores por semana. Además de estos mercados existe el mercado de Canadá, Europa y posiblemente muy próximo Estados Unidos. (17)

3.2.4 Clasificación botánica del aguacate (25):

Reino:	Vegetal
Sub-reino:	Embryobionta
División:	Magnoliophyta
Clase:	Magnoliopsida
Sub-clase:	Magnolidae
Orden:	Magnoliales
Familia:	Lauraceae
Género:	<i>Persea</i>
Especie:	americana
N. científico:	<i>Persea americana</i>
N. común:	Aguacate, Avocado, Acovado pear, Avocat, etc.

3.2.5 Descripción botánica:

Según la variedad, el árbol del aguacate abarca desde plantas de poca altura y follaje frondoso hasta plantas altas y esbeltas (23). El aguacate es un árbol cuyo crecimiento y desarrollo es variado, llegando en su hábitat natural a una altura de 10 a 12 metros. El hábitat corresponde a las características ecológicas de las especies subtropicales-tropicales. (21)

Su tallo leñoso posee, igualmente, un gran crecimiento vegetativo, en árboles de 25 a 30 años se han encontrado diámetros de 0.8 a 1.0 metro (21) (29). La madera es ligera y bastante frágil, por lo que el árbol se daña fácilmente en las tormentas. Aunque se clasifican como de hoja perenne, los árboles de algunas variedades pierden hojas o casi todas sus hojas en la época de floración. Las hojas nuevas aparecen casi inmediatamente en los brotes terminales de la inflorescencias. Los árboles de otras variedades tienden a despojarse gradualmente de sus hojas viejas, durante un largo período en primavera, y nunca se encuentran completamente deshojados. (23)

Los estudios sistemáticos han clasificado más de 500 variedades, de las cuales la mayoría han sido descartadas para la "creación" de variedades comerciales, es decir, aquellas que poseen un comportamiento adaptado a la producción en escala comercial. De este gran número de variedades la mayoría presentaba problemas en su productividad (tiempo de producción, ciclo total, cantidad, etc.), calidad (en lo referente principalmente al contenido de proteínas, grasas, etc.) y en su manejo comercial (resistencia al transporte y otras características). (23)

3.2.5.1 Aspecto general del aguacate:

Es una especie perenne de tallo aéreo (o epigeo) con característica leñosas y follaje siempre verde, su raíz es bastante superficial. (2)

Sus hojas son simples y enteras. De forma elíptica-alargada y nervadura pinada (de pluma). La inserción en el tallo es peciolada. Cuando es joven presenta un color rojizo o bronceado (contenido de pigmentos en la vacuolas) y una epidermis pubescente; al llegar a la madurez estas hojas se tornan lisas, coriáceas y de un verde intenso y oscuro. (21)

La hoja adulta tiene una dimensión aproximada de 15 cm de largo por 6 cm de ancho . Los extremos de las hojas son agudos, pero pueden ser romos en una cuantas variedades y con base cuneiformes. 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 en cuestión. (21) (29)

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 daña los tejidos, recomendándose la protección de los plantines con paja o papel en los primeros años de implantación del huerto. (21) (29)

Las raíces son superficiales dependiendo de la variedad, suelo y otras condiciones de producción. La profundidad alcanzada puede ser de 1 a 1.5 m, 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. (21) (29)

Las flores son hermafroditas (poseen los dos sexos), actinomorfas (simétricas), de color verde amarillento o verde pálido y con un diámetro aproximado de 10 a 12 mm cuando se encuentran totalmente abiertas, se producen. La inflorescencia es una panícula que pueden ser axilar o terminal (30); las inflorescencias terminales son muy ramificadas, terminando el eje central de la misma en un brote o retoño (a veces se utiliza para injertar) (30). La flor es perfecta, con 12 estambres, nueve de los cuales son funcionales, teniendo cada uno cuatro cámaras de polen. El pistilo simple tiene un carpelo con un óvulo. El cáliz y la corola se distinguen sólo por su posición y, en realidad, son lóbulos del periantio. Todas las partes de la flor se encuentran más o menos cubiertas con un vello fino. Esta velloso permite la polinización de un tipo a otro, utilizando como vector los insectos que llevan en sus patas el polen de otros árboles dándose así la polinización cruzada. (30)

El fruto es una baya que posee un pericarpio (delgado, grueso o quebradizo), un mesocarpio carnoso y una sola semilla grande (21). El espesor y la textura de la cáscara difieren según la variedad. Los frutos de las variedades cultivadas difieren en su tamaño, forma color y otros caracteres. Por lo general, varían de piriformes a redondeados u ovalados. En peso, los frutos oscilan desde unos cuantos gramos a un kilogramo o más. El color varía desde verde amarillento claro, pasando por el verde oscuro, el castaño y del pardo al negro púrpura. (21)

3.2.5.2 Desarrollo vegetativo del aguacate:

La planta presenta un largo período de crecimiento que se puede extender hasta los ocho o diez meses durante el año. Este ritmo de carácter endógeno, puede sufrir interrupciones por condiciones climáticas adversas. La dominancia

apical no es muy acentuada lo que permite que las yemas axilares se desarrollen al mismo tiempo que las terminales (2, 22). Todo este proceso está comprendido en cinco fases (ver figura no. 3). La fase A, corresponde al período vegetativo de una rama que ha terminado su crecimiento. La yema terminal es delgada, y de forma alargada. Y en las axilas de las hojas, las cuales son de formación reciente, se observa la presencia de yemas axilares. La fase B, las yemas inician su desarrollo, se hinchan, y las escamas que las cubren comienzan a separarse. Posteriormente, las yemas toman un color amarillento. La fase C, el tamaño de la base de las yemas es el mismo que en el estado precedente, pero se aprecia una mayor separación de escamas. En el extremo del brote aparecen cuatro o cinco hojas, y las yemas axilares adyacentes pueden evolucionar. La fase D, la yema terminal se transforma en un brote juvenil de color rojo oscuro o pálido, sin embargo, las hojas no alcanzan todavía su total desarrollo. La fase E, las hojas se aprecian separadas y desarrolladas, pero aún conservan la coloración de la fase anterior y las actividades fotosintéticas, regulación estomática, etc. del limbo no son completamente funcionales, todavía. Al finalizar la maduración, las hojas, adquieren un color verde claro y se repiten nuevamente las fases del desarrollo vegetativo. (22)

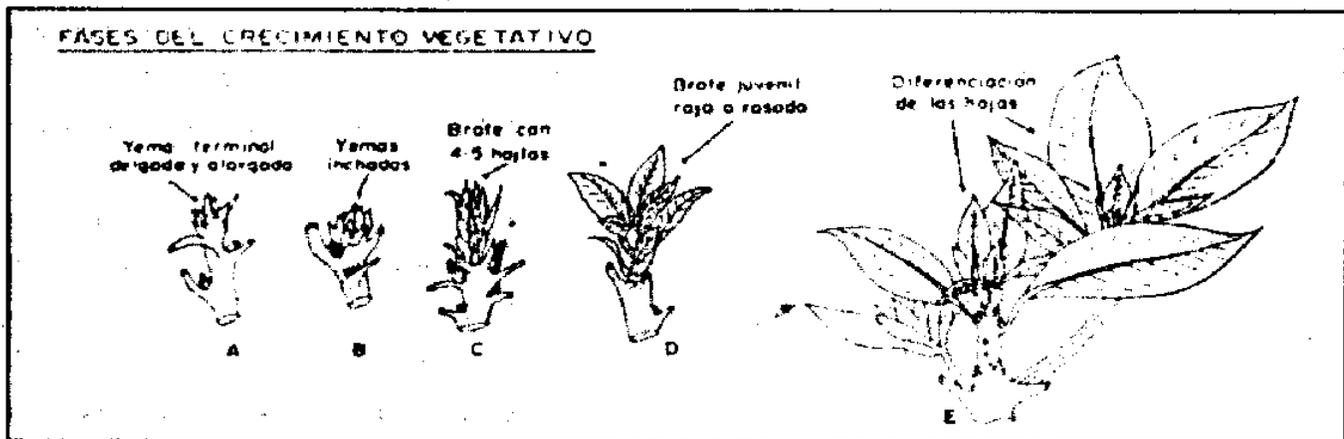


FIGURA 3. Fases del crecimiento vegetativo del aguacate. El cultivo del aguacatero. FONAIAP. 1986.

3.2.6 Problemas de las enfermedades y plagas en el cultivo de aguacate:

La enfermedad criptogámica más difundida es la podredumbre de la raíz o tristeza, producida por el hongo *Phytophthora cinnamomi* Rands que llega a originar pérdidas totales en las explotaciones comerciales de aguacate. Otras enfermedades de origen criptogámico son la marchitez, causada por *Verticillium alboatrum*; la podredumbre radicular, originada por *Armillaria mellea*; la sarna o roña, causada por *Sphaceloma perseae*; antracnosis, por *Colletotrichum* o *Gloesporium*; pudrición texana, por *Phymatotrichum omnivorum*; clavo o viruela también producido por los mismos agentes de la antracnosis; cáncer de tronco y ramas, producido por *Nectaria galligena*; el tizne o negrilla, por *Capnodium* sp.; oidio, originado por el hongo *Oidium* sp.; pudrición del pedúnculo del fruto debido a *Pestalotia*; podredumbre de frutos, causada por *Diplodia*, *Dothiorella* y otros; manchas de hojas, debidas al hongo de género *Cladosporium*. (13)

Las causas ambientales de mayor importancia en las enfermedades son el viento y las altas temperaturas; estas últimas producen seria irritaciones en la epidermis de los frutos y en los troncos; el aguacate, principalmente de razas guatemaltecas, es muy sensible a estos golpes de sol, de allí que se cubran las ramas más expuestas con una lechada de cal. El viento generalmente ocasiona una defoliación, dejando los frutos a la acción directa del sol, que es más intensa si la variedad tiende a producir sus frutos en la periferia. (13)

Los hongos que atacan el sistema radicular (*Phytophthora* y *Almullaria*) originan las enfermedades más peligrosas en el aguacate, por lo que se deben tomar profundas medidas preventivas y de lucha terapéutica con fungicidas, así como buscar variedades resistentes, es decir patrones adaptables a injertos de variedades de buena producción. (13)

Algunas de las principales plagas que atacan severamente al fruto de aguacate son los trips, entre los que se citan el piojito del algodón (*Heliothrips haemorrhoidalis* Bouchel; taladradores del fruto, como el *Stenomma catenifer* Walsingham; el barrenador de las ramas, *Copturomymus* sp.); gusanos, como el tejedor del aguacatero (*Jocara subcurvatis* Schaus), y algunas chinches, como la chinche negra *Mecistorhinus tripterus* Fabricius. (13)

3.2.7 Composición química del aguacate:

El componente más voluminoso de todos los frutos es el agua; por lo tanto, su importancia es muy marcada ya que permite la disolución de los otros compuestos y las reacciones orgánicas internas del fruto. (21)

El aguacate posee valiosísimas propiedades alimenticias por su alto contenido de aceite (12 a 30%) y proteínas (de 3 a 4%), además de su contenido de hidratos de carbono, vitamínico y mineral (21). El aguacate contiene ciertas vitaminas liposolubles, poco frecuentes en otros frutos. Es bastante rico en vitaminas A y B, medianamente rico en vitaminas D y E, y pobre en vitaminas C (21). Esas características le confieren grandes posibilidades en el aumento de su consumo en la dieta humana (Cuadro 4, se compara el aguacate con otros frutos). Actualmente se está desarrollando su industrialización en la producción de alimentos, extracción de aceites, productos farmacológicos y producción de cosméticos. El sabor del aguacate es característico, semejante de alguna manera al de la almendra, nuez y avellana. (21)

CUADRO 4. Contenido alimenticio del aguacate comparado con otros frutos. (21)

FRUTOS	AGUA	PROTEINAS	GRASAS	HIDRATOS DE CARBONO	CENIZAS	VALOR CALORIFICO 100 gr.
Aguacate	70.56	2.10	20.60	5.95	1.32	267
Aceituna	75.00	0.70	20.00	8.90	0.42	200
Manzana	83.60	0.10	0.30	11.91	0.27	52
Melocotón	88.00	1.00	---	10.00	0.50	52
Naranja	86.50	1.12	---	9.00	0.46	44
Plátano	72.46	1.16	0.55	20.20	0.66	80

Fuente. Cultivo del Aguacate, Francisco J. Alvarez de la Peña.

3.2.8 Grupos ecológicos:

La mayoría de las variedades comerciales en los países productores como Estados Unidos, principalmente California, Israel, México y en las Islas Canarias, etc. se agrupan prácticamente en tres razas básicas o grupos ecológicos: la mexicana, la guatemalteca y la antillana (cuadro 5).(21)

3.2.8.1 Raza mexicana:

La 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 a anís, esto lo diferencia en primera instancia de los demás. (21)

La época de floración es la más temprana y coincide con los meses de enero y febrero en Canarias y sur de España, y con octubre-diciembre en México. La época que va desde la floración a la recolección tiene un promedio de 7 meses, variando de 6 a 8. (21)

Los árboles son altos, de corteza delgada, con numerosas ramas delgadas y con gran cantidad de lenticelas. Tienen una tendencia de producir ramificaciones *chuponas* desde la corona o la raíz. 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. (21)

El peso del fruto generalmente es menos de 250 gr 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 negro. El contenido oleoso de la pulpa blanqueada-verdosa es alto o mediano, generalmente superior al 12%, llegando hasta un 27%. El hueso contiene cotiledones lisos y apretados. El fruto tiene una vida de postcosecha mediana, aproximadamente unos 10 días después de separado el árbol. (21)

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 , incluso pueden tolerar hasta -10°C si la duración de la helada es corta. Presentan cierta incompatibilidad para injertarse en patrones antillanos. (21)

La raza mexicana es susceptible a los suelos calcáreos (de pH alto) y 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 (*Collectotrichum* o *Gloeosporium*). (21)

3.2.8.2 Raza guatemalteca:

Originaria de Guatemala, de regiones con alturas de 500 a 1,000 msnm. El árbol es de gran tamaño y con hojas anchas y largas, de 15 a 18 cm; la planta no produce *chuponas* sino ocasionalmente y los brotes son de color rojo violáceo. 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. La vida de postcosecha del frutos es muy larga, hasta 5 meses después de arrancarlo del árbol. (21)

Igual que en la raza antillana sus hojas son inodoras. La época de floración comienza generalmente en marzo y termina en abril, en el hemisferio norte. La recolección puede abarcar un periodo amplio desde enero a septiembre, llegando su lapso entre floración y recolección a ser el más largo respecto a las demás razas, de 10 a 15 meses. El peso de los frutos es de 125 g a 2.5 kg. y su tamaño es más variado que el de 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 . (21)

3.2.8.3 Raza antillana:

En 1653 Bernabé Cobo la clasificó como raza "Yucateca", luego apareció su denominación de antillana, aunque no hay pruebas concretas del origen de este aguacate en las Antillas. (21)

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 cm de longitud y son de un color verde claro amarillento, sin olor anís. Los nuevos brotes tienen al principio una coloración rojiza, pasando luego al verde y al amarillo sin vellosidades. (21)

La época de floración es posterior a la mexicana (de febrero a marzo), resultando ser intermedia. La recolección se sitúa entre mayo y septiembre; en México madura entre julio y septiembre. El periodo entre la floración y la recolección es variable de 5 a 8 meses (su promedio es de 6 meses). El peso de la fruta oscila entre 250 g y 2.5 kg., constituyendo la raza de mayor tamaño de baya. (21)

El contenido de aceite es bajo, un 10%, aunque por su mayor peso y tamaño se compensan relativamente las deficiencias. Es la raza que posee mayor característica tropical, pues es la más sensible al frío, las plantas jóvenes toleran de -1 a -2°C ; en cambio, las adultas llegan a tolerar hasta -4°C . Estas características de resistencia a las bajas temperaturas varían según el estado de las plantas y la intensidad de la helada. (21)

Esta raza es resistente al calcio y a la salinidad, pudiendo vegetar en suelos con cierto contenido de cloruros (250 a 350 ppm). Es susceptible a las quemaduras del sol y a la *Cercospora*, aunque es resistente a la *antracnosis*, y se diferencia de la raza mexicana por que no produce chupones. (21)

En México, se han encontrado, en forma silvestre, tipos intermedios entre el guatemalteco y el mexicano. Popenoe y Williams, informan que encontraron formas silvestres con la cáscara dura de la raza guatemalteca pero con aroma de anís en las hojas. Schroeder, informa por otra parte, que halló aguacates silvestres, en apariencia del tipo mexicano, que carecen de olor a anís en las hojas. (21)

Las principales variedades comerciales de exportación han sido la Fuerte, Hass y Nabal (de origen guatemalteco y guatemalteco-mexicano). Prefiriéndose los frutos de tamaño mediano (200 ó 300 g) y con un aceptable porcentaje de aceite en la pulpa. (21)

CUADRO 5. Comparación de las tres razas existentes de aguacate. (10)

CARÁCTER	MEXICANA	GUATEMALTECA	ANTILLANA
ARBOL			
Adaptación climática	Semitrópico	Subtrópico	Trópico
Tolerancia al frío	Mayoría	Intermedio	Menor
Tolerancia a salinidad	Menor	Intermedio	Mayoría
Pubescencia	Más	Menos	Menos
Hoja anisada	Presente	Ausente	Ausente
Revés de la hoja	Más cerosa	Menos	Menos
Tamaño de la hoja	8 a 10 cm.	20 cm	15 a 18 cm.
Color de la hoja	Verde medio	Medio rojizo	Amarillo pálido
FRUTO			
Tiempo de floración a maduración	7 meses	14 meses	7 meses
Pedúnculo	Corto	Promedio largo	Corto
Tamaño	Pequeño	Variable	Variable
Forma	Largo	Promedio redondo	Largo
Peso	Menor de 250 g.	Entre 250 g. Y 2.5 Kg.	Entre 100 g. Y 2.5Kg.
Perianto persistente	Grande	Menos	Menos
Color	Mas oscuro	Usualmente verde	Verde o rojizo
Espesor de la piel	Muy delgado	Delgado	Delgado
Superficie de la piel	Floración grasosa	Aspero	Brillante
Tamaño de la semilla	Larga	Pequeña	Larga
Cavidad de la Semilla	Suelto	Cerrado	Con frecuencia suelto
Superficie de la semilla	Liso	Liso	Grueso
Integumento de la semilla	Ligero	Ligero	Tupido
Contenido de aceite	Muy alto (27%)	Alto (20%)	Bajo (10%)
Sabor de la pulpa	Sabor anisado	Con frecuencia rico	Ligeramente dulce
Fibra en la pulpa	Común	Menos común	Menos común
Vida del fruto postcosecha	8 a 10 días	4 a 5 días	hasta 5 meses
Almacenaje en frío	Más tolerante	Más tolerante	Menos tolerante.

Fuente. Advances in Fruit Bedding. Subtropical Fruits. B. O. Bergh 1975.

3.2.9 Variedades:

Entre las variedades que parecen promisorias para el clima templado centroamericano estas: Hass, Fuerte (usado como polinizador), Booth-8, Nabal, Cristina, Collin Red, Azteca y Choquete. Para climas húmedos y cálidos las variedades: Hall, Simmons, Booth-7 y Booth-8. La variedad Fuerte es la que mayor comercialización ha tenido en California, Israel y otros países con climas templados y secos. También en estos mismos climas se ha iniciado la producción comercial de la variedad guatemalteca Hass, que es la que mayor aceptación ha tenido por su magnífica calidad. (3)

Para los climas húmedos y cálidos como Florida, se está fomentado el cultivo de variedades con buenas perspectivas en el mercado, tales como: Pollock, Peterson, Simmons, Waldin, Linda, Taylor, Booth-8. (3)

En Guatemala la variedad que más se ha fomentado es Hass con sus frutos pequeños y de piel rugosa. Es la que mejor calidad desarrolla, y sus características son las más adecuadas para el manejo, transporte y almacenamiento. Para mercados cuya demanda se orienta al consumo de frutos grandes, son las variedades Booth-8 y Panchoy las que satisfacen esta preferencia ya que producen aguacate de tamaño grande y cascara rugosa. (3)

Entre los híbridos se encuentran: (21)

- Híbridos de mexicana-guatemalteca: Fuerte, Ettinger, Rincón, Robusto, Lula.
- Híbridos de antillana-guatemalteca: Gema, Choquette.

Otras variedades que también se han difundido, pertenecientes a grupos puros o a hibridaciones entre ellos, y a su vez entre las mismas variedades comerciales son: Benik, Duke, Hall, Hickson, Mexicola, Collinson, Reed, Simmonds, Taylor, Tonnage, Jalma, Jim, Santana, Covocado, Ein-vered, Shomrat, Horshim, Netaim, Nordshtein, Tova, Duke 7, Duke 8, Pinkerton, Wurtz, Susan.

Estas corresponden a las variedades más difundidas y según su origen genético. En México se clasificaron las variedades en grupos, destacando principalmente, además de origen genotípico, la preponderancia de algunos caracteres de la raza en las hibridaciones.

Actualmente en Guatemala se esta promocionando la variedad Hass a que está perfectamente adaptada al medio y reúne todas las características exigidas por el mercado mundial de aguacates y es una variedad ampliamente conocida; además para las regiones cálidas se está iniciando la promoción de la raza antillana variedad Booth aunque está restringida al mercado nacional y centroamericano, pero con grandes posibilidades porque se cosecha en una época distinta a la del Hass con muy buenos precios. (17)

La situación actual para la variedad Hass en Guatemala para 1997 es, de las 438 has. totales, 272 has. se encuentran distribuidas en 5 fincas, esto equivale al 62% del área sembrada, el otro 38% está distribuido en aproximadamente 45 fincas. Siendo Suchitepéquez, Sacatepequez, Quetzaltenango, San Marcos y Chimaltenango los principales departamentos con mayor área sembrada. (17)

3.2.10 Descripción y requerimientos agroclimáticos de los cultivares Hass (raza guatemalteca) y Booth-8 (raza americana):

3.2.10.1 Cultivar Hass:

Cultivar comercial obtenida de una rigurosa selección a partir de la raza guatemalteca. El árbol es sensible al frío, susceptible fundamentalmente en el lapso de floración, es aconsejable entonces su establecimiento en zonas libres de heladas. Es además, muy sensible a la humedad ambiental debiéndose evitar regiones con vientos calurosos desecantes, pues se deshidratan tanto las flores como los brotes jóvenes (perdiendo el área foliar necesaria para la alimentación fotosintética de los frutos). (10)

Este cultivar se caracteriza por la gran producción de flores, tendiendo, a veces, a un cuajado de muchos frutos, lo que inevitablemente serán de poco peso. En general es un árbol muy productivo. Una vez terminada la madurez del fruto (etapa entre la madurez comercial y la fisiológica) puede permanecer algún tiempo en el árbol sin que desmejore su calidad, esta característica permite una mejor recolección. (14)

El fruto es oval-piriforme, de epidermis gruesa (lo que le da más resistencia al transporte) y rugosa, su color es verde, oscureciéndose en la madurez y tomando un tono casi violáceo. Culinariamente tiene una buena presencia y es fácil de pelar. El peso varía entre 200 y 300 grs.; su mesocarpio o pulpa es de excelente calidad, sin fibras y con un contenido de aceite del 20% (oscila comercialmente entre 18 y 22%). La semilla es pequeña y esférica, adherida al mesocarpio. Entre las requerimientos agroclimáticas para esta variedades tenemos: (10)

1. Suelos: De textura media y profundos, arcillo arenosos, de migajón franca, bien drenados, no se recomiendan suelos pesados, aunque si se pueden mejorar con adiciones de materia orgánica. pH de 5.5 - 6.5. (12)
2. Altura: de 1200 a 1700 msnm, susceptible a heladas.
3. Topografía: pendientes de 10 a 30%.
4. Temperatura: de 17 a 26°C, rango de media anual.
5. Vientos: sensible a vientos fuertes.
6. Humedad: sensible al exceso de humedad, en época seca requiere riego.
7. Época de producción: de octubre a febrero.

3.2.10.2 Cultivar Booth-8:

Es un cultivar típico de zonas cálidas y húmedas. Grupo "B". Híbrido (Guatemalteco x Antillana). Nacido de semilla de raza guatemalteca, probablemente polinizada por una raza antillana. Originada en Florida (USA). Árbol vigoroso de porte abierto. Los frutos aparecen en grupos, forma oblongo-ovaladas, tamaño pequeño a medio, de 250 a 800 gramos, poco áspera; semilla tamaño medio y adherida a la cavidad y de la pulpa amarillenta. Entre los requerimientos agroclimáticas para este cultivar tenemos: (14) (22)

1. Suelos: igual que para la variedad Hass. (17)
2. Altura de 0 a 1000 msnm.
3. Topografía : hasta pendientes no mayores de 30%
4. Temperatura: climas calurosos de costa y boca costa.
5. Vientos: sensible a vientos fuertes.
6. Humedad: sensible al exceso de humedad, en época seca requiere riego.
7. Época de producción: entre mayo y septiembre.

IV. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL:

Estudiar el comportamiento del aguacate *Persea americana* Miller var. *guatemalensis* cv. Hass y var. *americana* cv. Booth-8 al cultivo de tejidos *in vitro*.

4.2 OBJETIVO ESPECIFICO:

4.2.1 Describir la respuesta de dos razas de aguacate a la Micropropagación *in vitro* utilizando diferentes concentraciones de citocinina (6-Bencilaminopurina) y auxina (Ácido Indolbutírico).

V. MATERIALES Y METODOS

5.1 Area experimental:

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. El laboratorio se encontraba implementado con las instalaciones, el equipo y las condiciones de luz, temperatura y aislamiento adecuados para llevar a cabo esta investigación.

5.2 Medio nutritivo, equipo y material experimental:

5.2.1 Medio nutritivo artificial:

En todos los experimentos que se realizaron en este trabajo, se utilizó el medio nutritivo basal descrito por Murashige y Skoog (1962), que en este documento se denominó MS (ver apéndice 1). En este estudio se utilizaron diferentes reactivos distribuidos en su mayoría por la casa Merck Centroamericana S. A. El medio basal se complementó con 30 gr/lit de sacarosa y 7 gr/lit de agar bacteriológico como agente gelificante. El pH del medio de cultivo se ajustó a 5.4 a 5.5 debido a que la actividad de la fenolización en el explante disminuye cuando este se encuentra por debajo de 6.5, ya que la tendencia de disolución de los componentes del medio para oxidarse o reducirse depende del potencial de oxidación-reducción de la solución. Antes de agregar el agar y antes de inocular los tejidos vegetales, el medio se esterilizó en autoclave durante 20 min., a 1.1 kg/cm² de presión y a una temperatura de 121 grados centígrados.

5.2.2 Equipo y cristalería:

El equipo básico utilizado en la realización de los experimentos son: potenciómetro, refrigerador, horno microondas, balanza analítica, autoclave, campana de flujo laminar, sistema de ultrafiltración, tubo de ensayo, cristalería y reactivos diversos.

5.2.3 Selección del material experimental:

El material utilizado para la Micropropagación in vitro fue extraído de plantas provenientes de viveros. Los explantes utilizados para el experimento fueron yemas laterales; el material del cultivar Hass fue adquirido de un vivero de Chimaltenango y para la cultivar Booth-8 este se extrajo de un vivero de Amatitlán. Se identificaron las

ramas en crecimiento vegetativo activo, seleccionándose las puntas meristemáticas de material de tejido joven, el cual puede ser más regenerativo que el material de tejido adulto. Por lo tanto la edad y la fase de desarrollo de la planta u órgano a utilizar fue fundamental para la obtención de una buena respuesta por parte del material al medio de cultivo.

5.2.4 Colecta del material experimental:

La extracción de los explantes se realizó entre las 7:00 y 9:00 horas para trabajarlas en horas de la tarde en el laboratorio y con ello evitar en parte la fenolización, que se manifestó en mayor porcentaje cuando el material fue colectado en horas después de las mencionadas. Durante el transcurso de las pruebas preliminares se pudo constatar que el proceso de fenolización se produce después de 24 horas del corte de las yemas. Las puntas de las ramas que contienen el meristemo se cortaron con una longitud aproximada de 5 cm, se colocaron en bolsas con papel absorbente humedecido con agua destilada y se transportaron en condiciones de baja temperatura en una hielera. Para la realización del trabajo, se utilizaron yemas laterales de plantas de aguacate de procedencia de vivero. El material recolectado de campo, produjo más niveles de contaminación más altos que las plantas de vivero en condiciones controladas. La longitud de las yemas variaron entre 4 y 5 mm. de longitud.

5.3 Procedimientos generales:

5.3.1 Elaboración del medio MS:

Las soluciones concentradas fueron elaboradas en base a las concentraciones descritas para el medio basal MS (cuadro 19A). De estas soluciones se extrajo los volúmenes deseados para la elaboración del medio de acuerdo al objetivo de la fase. Para la fase I o Medio de Iniciación, se tomo en cuenta las diferentes concentraciones de los reguladores del crecimiento Ácido Indol-butírico (AIB), 6-Bencilaminopurina (BAP) y el Ácido Giberélico (AG_3). Para el regulador AG_3 , como es una sustancia que se desnaturaliza con facilidad en un 90% a temperaturas altas, por lo que no pudo ser aplicado al medio antes de esterilizarlo en la autoclave, este tuvo que ser filtrado, por medio de una bomba de vacío, y luego se agregó al medio dentro de la campana de flujo laminar, previamente desinfectado con alcohol al 70%, cuando la temperatura del medio no fuese mayor de 60°C. Posteriormente se transfirió a los tubos de ensayo en una cantidad aproximada de 10 ml del medio y se taparon con papel aluminio, luego fueron llevados al cuarto de crecimiento para que el medio se gelificara hasta ser utilizados.

5.3.2 Procedimiento de desinfección del tejido:

El material recolectado proveniente de plantas de vivero, fueron mantenidas dentro de un ambiente controlado de plagas y enfermedades, se le aplicaron fumigaciones constantes cada 15 días con fungicidas y bactericidas de amplio

espectro, además para contribuir con la nutrición de la planta se le realizaron varias fertilizaciones con urea y otros fertilizantes compuestos, y por último, los riegos fueron realizados conforme a la necesidad que presentará la planta.

Luego de realizar la colecta del material este fue llevado hacia las instalaciones del laboratorio. Las porciones del vegetal con la yema fueron colocadas en un recipiente y luego bajo agua corriendo durante 20 minutos para eliminar impurezas provenientes del campo. Luego se limpio el material con un cepillo dental y de un pincel utilizando un detergente anti-bacterial y de una solución comercial biocida durante 15 minutos; además se utilizó una pequeña solución de fungicidas como es el Agrimicín (10 gr/lit), el bactericida Bavistin (8 gr/lit) y la adición de 10 gotas de Tween 20, un agente tensoactivo que disminuye la tensión superficial del agua; debido a la pubescencia que presentan las yemas, luego se lavaron para eliminar el exceso de jabón con agua del chorro repitiendo 5 veces el lavado.

Para encontrar un adecuada concentración y tiempo de exposición de las solución desinfectantes se realizaron pruebas donde el material fue lavado en distintas soluciones desinfectantes de las cuales se seleccionaron aquellas en las que se presentó el menor número de explantes contaminados y oxidados. (cuadro 6)

CUADRO 6. Tratamientos de los distintas soluciones desinfectantes utilizadas para el control de contaminación y/o oxidación de material vegetal.

No.	TRATAMIENTO	Tiempo de exposición
1	Alcohol al 70%	25 seg.
2	Alcohol al 70%	30 seg.
3	Alcohol al 70%	1 min.
4	Alcohol al 70%	2 min.
5	Hipoclorito de sodio al 0.52%	5 min.
6	Hipoclorito de sodio al 0.52%	10 min.
7	Hipoclorito de sodio al 0.52%	15 min.
8	Hipoclorito de sodio al 0.78%	5 min.
9	Hipoclorito de sodio al 0.78%	10 min.
10	Hipoclorito de sodio al 0.78%	15 min.
11	Hipoclorito de sodio al 1.04%	5 min.
12	Hipoclorito de sodio al 1.04%	10 min.
13	Hipoclorito de sodio al 1.04%	15 min.
14	0.5 gr. Benomyl + 0.5 ml de Bavistin	10 min.
15	0.5 gr. Benomyl + 0.5 ml de Bavistin	15 min.
16	0.5 gr. Benomyl + 0.5 ml de Bavistin	20 min.
17	1.0 gr. Benomyl + 1.0 ml de Bavistin	10 min.
18	1.0 gr. Benomyl + 1.0 ml de Bavistin	15 min.
19	1.0 gr. Benomyl + 1.0 ml de Bavistin	20 min.

Los tratamientos del 5-19 fueron realizados bajo agitación mecánica, 100 – 150 rpm, para que todo el material estuviera en una exposición uniforme bajo la solución.

5.3.3 Siembra del tejido en el medio de cultivo:

La siembra del tejido en el medio de cultivo se realizó en la cámara de flujo laminar, la cual fue desinfectada una hora antes de cada sesión de trabajo, para esto se utilizó alcohol etílico al 70%. Para la manipulación del tejido en la campana de flujo laminar se utilizó frascos, agua destilada estéril y cajas de petri previamente autoclaveadas. Además se utilizó instrumental conformado por asa, pinzas y bisturí las cuales eran flameadas en el mechero cada vez que se utilizaron en la manipulación de los explantes.

Antes de introducir el explante dentro del medio de cultivo, estos fueron sumergidos en una solución para el tratamiento de la oxidación, el cual contenía 100 mg/lit ácido ascórbico y 150 mg/lit ácido cítrico. Además al medio de cultivo se le adicionó 10 mg/lit L-cisteína.HCl, 0.35% PVP (polivinilpirrolidona).

5.3.4 Incubación de los cultivos:

Las siembras en los medios de cultivo se mantuvieron en el área de incubación. El cuarto de crecimiento está equipado con una fuente de luz proporcionada por lámparas fluorescentes de luz blanca de 1000 a 3000 lux de intensidad aproximadamente. La temperatura media del cuarto es de 25 grados centígrados y un fotoperíodo programado de 16 horas de luz.

5.3.5 Subcultivos:

La transferencia del explante de medio cultivo a otro, puede evitar en un alto porcentaje el proceso de oxidación debido a la poca difusión que tiene la producción de fenoles en el explante, por lo que esta se encuentra en contacto directo con el explante iniciando el proceso de oxidación. Con el fin de obtener un desarrollo satisfactorio de los explantes se realizaron inicialmente en la Fase I, 2 subcultivos con un intervalo de 8 días entre la siembra y el subcultivo; y en la Fase II, 3 subcultivos con un intervalo de 3 semanas entre la siembra y el subcultivo.

5.4 Fases de la investigación:

El estudio se dividió en dos fases las cuales se iniciaron con la realización de pruebas preliminares para el control de microorganismos endógenos y exógenos, el control de oscurecimiento oxidativo y la estimulación del crecimiento oxidativo. La segunda fase consistió en un ensayo para determinar las respuestas más adecuadas utilizando diferentes tratamientos para la inducción, multiplicación y crecimiento de brotes adventicios.

5.4.1 Fase I: Pruebas preliminares para el control del oscurecimiento oxidativo y estimulación del crecimiento de Brotes:

Uno de los principales problemas en algunas especies leñosas, como el aguacate, que se cultivan *in vitro*, es reducir el oscurecimiento oxidativo y activar el crecimiento de brotes antes de que la necrosis se extienda. El oscurecimiento oxidativo es provocado por la proliferación de fenoles en el corte del tejido y se extiende sobre el medio de cultivo. El exudado café que se difunde en el medio de cultivo es detrimental para el desarrollo de los explantes, que eventualmente se vuelven necróticos y mueren. (10)

5.4.1.1 Condiciones del medio de cultivo MS líquido (1 litro):

- Medio líquido MS (contenía el 50% de los macroelementos reducidos).
- Se incrementó la cantidad de Hierro y Myo-Inositol (doble).
- No contenía ningún agente gelificante (sin agar), utilizando puentes de papel filtro.
- 0.35% Polivinilpirrolidona (PVP)/lt + 150 mg/lt de L-cisteína (esto solo en el primer subcultivo).
- 10 ml de tetraciclina (filtrado).
- 0.5 gr. de Benomyl (filtrado).
- pH = 5.48.

5.4.1.2 Tratamientos:

Para conocer la respuesta de las yemas laterales sobre el medio de cultivo sobre el oscurecimiento oxidativo y a la estimulación del crecimiento de los brotes se realizó la Fase I o de iniciación en el cual se utilizó 6-Bencilaminopurina (BAP) en tres niveles de concentración (0.0, 1.0 y 2.0 mg/lt) adicionados con tres concentraciones de ácido giberélico (AG₃) (0.0, 0.5 y 1.0 mg/lt) en el medio de cultivo MS, las distintas combinaciones son descritas en el cuadro 7.

Como una modificación a la preparación del medio de cultivo MS, se redujo al 50% los macroelementos del medio como una medida de evitar la oxidación del material, además, no se utilizó un agente gelificante (agar bacteriológico) sino que se utilizaron puentes de papel absorbente. Se realizó una modificación al pH del medio, el cual fue de 5.48 como preparación del explante a las condiciones del medio.

Este medio MS líquido tiene como finalidad que los fenoles segregados por el explante se difundan sobre el puente de papel absorbente hacia las partes laterales del tubo y que por medio del papel exista un ascenso de los macronutrientes como de los micronutrientes que estimularan al crecimiento del brote evitando el contacto directo de los fenoles con el explante y evitar el oscurecimiento oxidativo. Luego los explantes fueron sometidos bajo condiciones de oscuridad en la primera semana de siembra, a una temperatura de $\pm 20^{\circ}\text{C}$ (encubadora).

En el siguiente subcultivo se realizo también en el medio líquido sobre los puentes de papel, con la diferencia que estos estaban bajo las condiciones normales de temperatura, fotoperíodo y humedad del cuarto de crecimiento. Los aspectos que se evaluaron en esta fase es el de minimizar los niveles de oxidación del explante y eliminar en lo posible los grados de contaminación que en su mayoría solamente se encontraron colonias de hongos y bacterias, provenientes del material vegetal.

CUADRO 7. Tratamientos utilizados para el estudio del oscurecimiento oxidativo y la estimulación del crecimiento brotes con dos diferentes reguladores del crecimiento.

No.	Tratamientos (BAP/AG ₃)mg/lt
1	0.0/0.0 (Testigo)
2	0.0/0.5
3	0.0/1.0
4	1.0/0.0
5	1.0/0.5
6	1.0/1.0
7	2.0/0.0
8	2.0/0.5
9	2.0/1.0

Esto se realizo para cada uno de los cultivares Aguacate, Hass y Booth-8, para evaluar el comportamiento que tiene el material hacia el medio de cultivo.

5.4.1.3 Unidad experimental:

Constituida por un tupo de ensayo de 150 x 25 y un explante. Se realizaron 12 repeticiones por cada uno de los tratamientos (9), obteniendo 108 unidades experimentales, con esto se logro obtener cual de los tratamientos puede presentar un nivel oxidativo en el explante relativamente bajo, para que en la Fase II se puedan obtener la mayor cantidad posible de material.

5.4.1.4 Variable de respuesta:

a) Número y porcentaje de explantes no oxidados

Debido a la naturaleza del material utilizado, el aguacate es un planta con mucha fenolización, por lo que se trato de controlar la oxidación del material dentro del medio de cultivo

5.4.2 Fase II: Inducción y crecimiento de brotes adventicios:

Después de la fase de pretratamiento del tejido, los explantes que se conservaron verdes provenientes de la fase anterior, los cuales fueron subcultivados en el medio MS líquido con los macronutrientes reducidos al 50% y conteniendo diferentes concentraciones de citocinina (BAP) y auxina (AIB).

En la Fase II se pretendió determinar cual de los distintos tratamientos conformados por diferentes combinaciones de auxina y citocinina estimulo la proliferación y crecimiento de brotes adventicios. (cuadro 10 de tratamientos).

5.4.2.1 Condiciones del medio de cultivo MS sólido (1 litro):

- El medio MS utilizado contenía el 50% de los macroelementos reducidos.
- Se incremento la cantidad de Hierro y Myo-Inositol (doble).
- 8 gr. de Agar bacteriológico.
- 0.35% Polivinilpirrolidona (PVP)/lt + 150 mg/lt de L-cisteina (esto solo en el primer subcultivo).
- 250 mg/lt de carbón activado.
- pH se incremento a 5.8.

5.4.2.2 Tratamientos:

Para el cultivo los explantes fueron cultivados en el medio nutritivo MS con diferentes combinaciones de auxinas y citocininas, las cuales promueven el crecimiento y desarrollo de los tejidos vegetales. La auxina a utilizar fue el Acido Indol-butírico (IBA) en las siguientes dosis: 0.0, 0.5, 1.0, 3.0 y 5.0 mg/lt. La citocinina a utilizar será la 6-bencilaminopurina (BAP) en las siguientes dosis: 0.0, 0.5, 3.0, 5.0 y 7.0 mg/lt. Las combinaciones a utilizadas fueron las que se presentan en el cuadro 8:

CUADRO 8. Diferentes concentraciones de los reguladores del crecimiento (auxina y citocinina).

IBA (en mg/lt)	BAP (6-bencilaminopurina) (en mg/lt)				
	0.0	0.5	3.0	5.0	7.0
0.0	0.0/0.0				
0.5		0.5/0.5	0.5/3.0	0.5/5.0	0.5/7.0
1.0		1.0/0.5	1.0/3.0	1.0/5.0	1.0/7.0
3.0		3.0/0.5	3.0/3.0	3.0/5.0	3.0/7.0
5.0		5.0/0.5	5.0/3.0	5.0/5.0	5.0/7.0

Los tratamientos que constituyeron las diferentes combinaciones de auxina y citocinina a utilizar en el medio nutritivo básico se detallan a continuación en el cuadro 9:

CUADRO 9. Presentación de los diferentes tratamientos a evaluar.

No.	Tratamiento	Citocínina (BAP) (mg/lt)	Auxina (IBA) (mg/lt)
1	Testigo	0.0	0.0
2	T2	0.5	0.5
3	T3	0.5	1.0
4	T4	0.5	3.0
5	T5	0.5	5.0
6	T6	3.0	0.5
7	T7	3.0	1.0
8	T8	3.0	3.0
9	T9	3.0	5.0
10	T10	5.0	0.5
11	T11	5.0	1.0
12	T12	5.0	3.0
13	T13	5.0	5.0
14	T14	7.0	0.5
15	T15	7.0	1.0
16	T16	7.0	3.0
17	T17	7.0	5.0

5.4.2.3 Unidad experimental:

La unidad experimental estaba constituida por un tubo de ensayo de 150 x 25 mm, conteniendo 10 ml de medio de cultivo con su respectiva combinación de las diferentes concentraciones de reguladores del crecimiento Ácido Indolbutírico (IBA) y 6-bencilaminopurina (BAP) y una yema lateral vegetativa de aguacate. La unidad experimental consistió de una yema lateral cultivada en un tubo de ensayo de 150 ml conteniendo 10 ml de medio de cultivo, con 6 repeticiones. El número de repeticiones dependió de la disponibilidad de material en el campo y de la cantidad de explantes que no mostró ningún tipo de contaminación y oxidación.

5.4.2.4 Variables de respuesta:**a) Número de explantes con formación de callo:**

Se registro el número de explantes que formen callo. Este dato fue registrado al momento del primer subcultivo y de los siguientes subcultivos.

b) Número de brotes adventicios inducidos por explante:

Para determinar la respuesta de los explantes a los diferentes tratamientos de reguladores del crecimiento, se registro el número de brotes adventicios inducidos por explante. Al concluir el último subcultivo realizado en la Fase II se procedió a contar el número de brotes adventicios totales formados por explante.

c) Longitud de brotes adventicios:

Para establecer los cambios en el crecimiento de los brotes adventicios se registro la longitud de los brotes adventicios. Los datos de longitud de brotes en mm se tomaron al final del último subcultivo de la Fase II. La longitud se tomo desde la base de cada brote al corte del mismo.

5.5 Análisis de la información:

Debido al objetivo de la investigación, el evaluar la respuesta de dos cultivares de Aguacate Hass y Booth-8, el análisis de los resultados obtenidos de cada uno de los tratamientos se realizó de forma descriptiva detallando en una forma precisa cada uno de los eventos realizados para poder cumplir con los objetivos de esta investigación. Ya que no se pretendió medir las diferencias entre las distintas variedades y tratamientos evaluados, sino que solo conocer la respuesta de cada una de las variedades al medio de cultivo para poder determinar cual es el comportamiento mas adecuado para el desarrollo de la propagación *in vitro* del Aguacate *Persea americana* Mill.

5.6 Presentación de los resultados:

Con los resultados obtenidos se elaboraron tablas y figuras y para una mejor ilustración de los resultados se generaron diagramas mediante el uso de software destinados para ello. Finalmente con los resultados más relevantes del estudio se elaborarán tablas resúmenes.

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Material vegetal utilizado como explante:

En la Micropropagación de especies frutales es muy común en todos los casos el uso de material en estado juvenil más no con el material de tejido joven y maduro que son tejidos progresivamente más difícil de emplear debido a que el material del brote maduro es más leñoso y lignificado, los cuales son condiciones difícil de resolver cuando se trabaja con especies leñosas, como lo es el aguacate, pudiéndose manifestar principalmente en: oxidación del medio o del tejido, la vitrificación, muerte y hasta el desarrollo de callos. Por todo esto se evaluó la respuesta del aguacate al cultivo *in vitro* utilizando yemas laterales de aproximadamente 4-5 mm de longitud con 1 ó 2 primordios foliares; provenientes de plantas de vivero, que luego fueron establecidas en un ambiente controlado principalmente para el control de patógenos para evitar en lo más mínimo que los explantes al ser llevados al laboratorio y luego ser inoculados en un medio de cultivo nutritivo tengan como limitantes la contaminación, ya sea por hongos o bacterias, que es lo más común, y la oxidación; y evitar que esto sea un factor negativo que no permita el desarrollo del mismo.

Como señala Villalobos (1982) (32) solo en el caso que se pretenda obtener plantas libres de virus, los meristemos (sin ningún primordio foliar) tienen una alta probabilidad de diferenciar plantas libres de estos patógenos; sin embargo, es más difícil regenerar de ellos plantas completas. No se logró obtener respuesta alguna al utilizar meristemos debido al tamaño del explante, resultando con facilidad la oxidación del material.

6.2 Respuesta del explante a las técnicas de desinfección:

Uno de los requisitos básicos para el éxito de la técnica de cultivo de tejidos *in vitro* es mantener los cultivos libres de microorganismos contaminadores. Los explantes pueden llevar contaminadores en su superficie (microorganismos exógenos) o en su interior (microorganismos endógenos) o en ambas partes. Los que lleva sobre su superficie se pueden eliminar mediante la desinfección, pero es permitido aclarar que la concentración de la solución desinfectante y el tiempo de exposición típicamente depende del material a ser tratado; los que se encuentran dentro del tejido son los más difícil de eliminar. El procedimiento de desinfección influyó no solo sobre la contaminación del explante sino también en la capacidad de regeneración del mismo por daños causados al tejido. Tanto la concentración y la duración de exposición para la desinfección son importantes. Se evaluó distintos productos así como el tiempo de exposición que tuvieron los explantes sumergidos en el agente desinfectante.

Es importante que los productos desinfectantes hagan un buen contacto con toda la superficie del tejido de la planta. Si estos son concentraciones muy altas y/o en largos períodos, el tejido de la planta podrá sufrir daños.

irreversibles. Una baja concentración para un largo periodo de exposición puede ser en algunas ocasiones efectivo. La inmersión de los explantes en una solución de Alcohol al 70% durante 25 seg. en constante agitación obtuvo un 80% de explantes no contaminados (cuadro 10, figura 4) y el poco periodo de exposición evita que este provoque daños en el; además este tratamiento presento muy bajos niveles de oxidación. Esto se refiere a la oxidación provocada por la demasiada exposición a los agentes desinfectantes antes de realizar las siembras en los medios de cultivo.

El uso apropiado de varias preparaciones esterilizantes pueden por lo visto ser empleados en los tejidos de plantas para obtener un buen efecto. La solución de hipoclorito de sodio (NaOCl) es una de las preparaciones más útiles como germicida y agente antioxidante, una alta concentración por un corto periodo de exposición se pudo observar cuando explantes son sumergidos en una solución de hipoclorito de sodio al 1.04% durante 5 minutos, también presento un bajo nivel de contaminación y además que provocó menor daño en el explante, principalmente este daño se refiere a la plasmólisis de las células limitando la capacidad de regeneración.

CUADRO 10. Diferentes soluciones desinfectantes utilizados para controlar las contaminaciones de los explantes dentro del medio de cultivo.

No.	Tratamiento	Tiempo de exposición	Vivos	Porcentaje	Contaminados	Porcentaje
1	Alcohol al 70%	25 seg.	4	80	1	20
2	Alcohol al 70%	30 seg.	3	60	2	40
3	Alcohol al 70%	1 min.	3	60	2	40
4	Alcohol al 70%	2 min.	4	80*	1	20
5	Hipoclorito de sodio al 0.52%	5 min.	3	60	2	40
6	Hipoclorito de sodio al 0.52%	10 min.	3	60	2	40
7	Hipoclorito de sodio al 0.52%	15 min.	3	60	2	40
8	Hipoclorito de sodio al 0.78%	5 min.	2	40	3	60
9	Hipoclorito de sodio al 0.78%	10 min.	3	60	2	40
10	Hipoclorito de sodio al 0.78%	15 min.	3	60	2	40
11	Hipoclorito de sodio al 1.04%	5 min.	4	80	1	20
12	Hipoclorito de sodio al 1.04%	10 min.	3	60*	2	40
13	Hipoclorito de sodio al 1.04%	15 min.	3	60*	2	40
14	0.5 gr Benomyl + 0.5 ml de Bavistin	10 min.	2	40	3	60
15	0.5 gr Benomyl + 0.5 ml de Bavistin	15 min.	3	60	2	40
16	0.5 gr Benomyl + 0.5 ml de Bavistin	20 min.	4	80	1	20
17	1.0 gr Benomyl + 1.0 ml de Bavistin	10 min.	3	60*	4	40
18	1.0 gr Benomyl + 1.0 ml de Bavistin	15 min.	4	80*	1	20
19	1.0 gr Benomyl + 1.0 ml de Bavistin	20 min.	4	80*	1	20

* Existió un buen control de contaminantes, pero provoco daño al explante (oxidación)

Para el caso de los microorganismos endógenos fue útil la inclusión de fungistáticos y bacteriostáticos en el medio de cultivo; la tetraciclina es un producto de amplio espectro que se utiliza. Además fue necesario que los tejidos fuesen inmersos en fungicidas como parte de agentes esterilizantes para disminuir los niveles de contaminación, eliminando así a algunos patógenos tanto exógenos como endógenos. La utilización de algunos fungicidas como el Benomyl (0.5 gr/lit) y el Bavistin (0.5 ml/lit) durante 20 minutos en agitación es necesario como una medida de control de contaminante sistémicos.

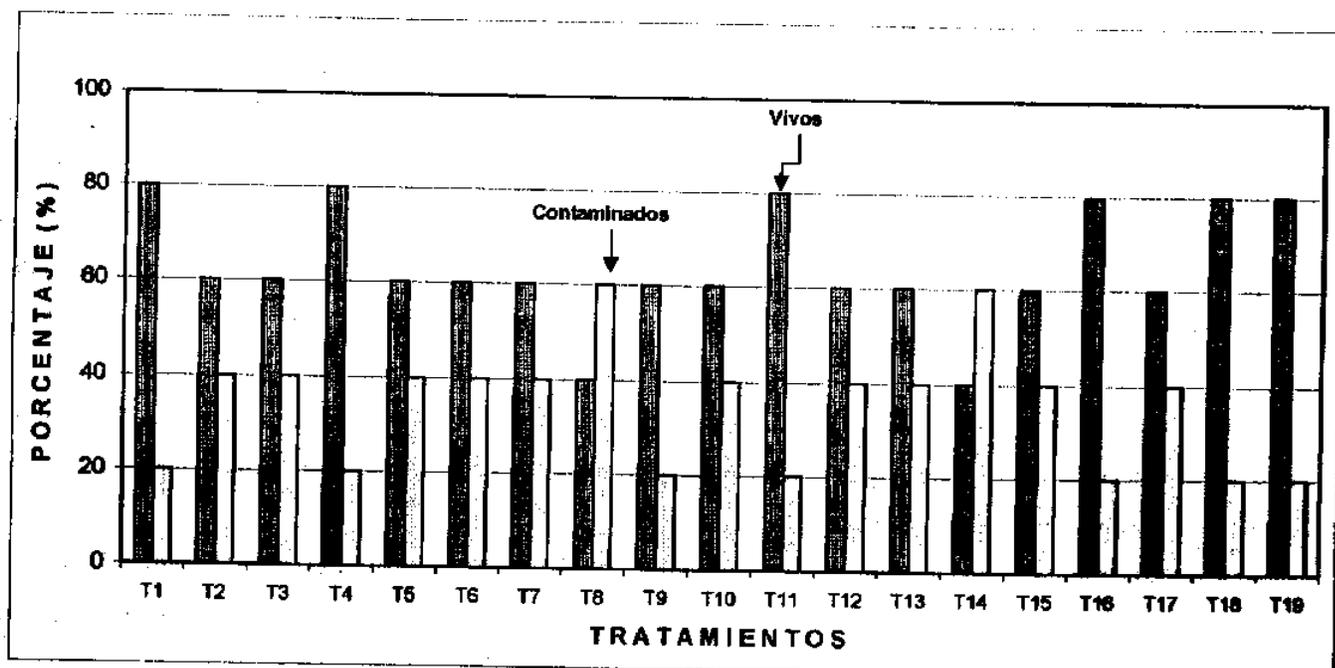


FIGURA 4. Respuesta del explante de aguacate a los distintos tratamientos de desinfección.

Referencia: T1 (Alcohol al 70%/25 seg); T2 (Alcohol al 70%/30 seg); T3 (Alcohol al 70%/1 min); T4 (Alcohol al 70%/2 min); T5 (Hipoclorito de sodio al 0.52%/5 min); T6 (Hipoclorito de sodio al 0.52%/10 min); T7 (Hipoclorito de sodio al 0.52%/15 min); T8 (Hipoclorito de sodio al 0.78%/5 min); T9 (Hipoclorito de sodio al 0.78%/10 min); T10 (Hipoclorito de sodio al 0.78%/15 min); T11 (Hipoclorito de sodio al 1.04%/5 min); T12 (Hipoclorito de sodio al 1.04%/10 min); T13 (Hipoclorito de sodio al 1.04%/15 min); T14 (0.5 gr. Benomyl + 0.5 ml de Bavistin/10 min); T15 (0.5 gr. Benomyl + 0.5 ml de Bavistin/15 min); T16 (0.5 gr. Benomyl + 0.5 ml de Bavistin/20 min); T17 (1.0 gr. Benomyl + 1.0 ml de Bavistin/10 min); T18 (1.0 gr. Benomyl + 1.0 ml de Bavistin/15 min); T19 (1.0 gr. Benomyl + 1.0 ml de Bavistin/20 min).

Es razonable aclarar que no todas las plantas están convenientemente preparadas para iniciar con el proceso del cultivo de tejidos. Las explantes utilizados de cada uno de los cultivares, Hass y Booth-8, fueron extraídos de plantas previamente tratados. Explantes provenientes de plantas del campo vienen completamente infestados de microorganismos y en donde fue difícil realizar una desinfección correcta, y al tratar de realizar una rigurosa desinfección aumento la probabilidad que el material sufriera daños y disminuyo la probabilidad de supervivencia del explante dentro del medio de cultivo. Por estas razones es recomendable, donde sea posible, tratar a las plantas madres que proporcione los explantes con algunos fungicidas y bactericidas de amplio espectro, de modo que

minimice el nivel de contaminación en el laboratorio, al lograr esto por lo tanto se podrá escoger aquellos explantes en que la contaminación probablemente estará en bajos niveles.

6.3 Fase I: Respuesta del explante al medio líquido de Iniciación para el control del oscurecimiento oxidativo y estimulación para el crecimiento de brotes:

6.3.1 Oscurecimiento oxidativo del explante:

Alfaro (1986) y Young (1984), establecieron la necesidad de utilizar 6-Bencilaminopurina (BAP) y Ácido Giberelico (AG_3) para disminuir el oscurecimiento oxidativo y estimular brotación en explantes de aguacate. Con base a lo anterior esta fase de la investigación se enfocó hacia la solución de la limitante descrita anteriormente.

El uso de técnicas de cultivo de tejidos para la propagación de *Persea americana* Miller ha sido sin excepción fallado debido al oscurecimiento oxidativo (fenolización) como respuesta del explante hacia el medio. El exudado café de los explantes que se difunde en el medio es perjudicial para promover el desarrollo de explantes *in vitro*, que finalmente favorece a la necrosis y luego a la muerte del explante.

Meira & Halevy (14), quienes estudiaron la respuesta de *Strelitzia reginae*¹ a la micropropagación *in vitro*, observaron que la capacidad de esta especie presenta una respuesta baja a la propagación debido al proceso oxidativo, catalogado como el factor limitante.

Como una estrategia para disminuir el proceso de oxidación Zepeda y Sagawa (1981), recomendaron la utilización de un medio líquido debido a que los fenoles se difunden en dicho medio lejos del explante. Adicional a la utilización de un medio líquido se recomienda la incorporación de sustancias antioxidantes como el Polivinipirrolidona (PVP), algunos ácidos como el Cítrico (150mg/l) y Ascórbico (100 mg/l) y la utilización de puentes de papel filtro.

Para el caso del aguacate aún utilizando las estrategias anteriormente señaladas, los niveles de oxidación observados fueron altos.

El cuadro 11, muestra el efecto de diferentes combinaciones de BAP (0.0, 1.0 y 2.0 mg/l) y AG_3 (0.0, 0.5 y 1.0 mg/l) para el cultivar Hass, donde se puede observar que en un medio que no contenga ninguno de estos reguladores los explantes presentaron una fuerte oxidación del 83% (testigo, cuadro 11) del total de explantes solo el 31% se mantuvieron vivos mientras que el 70% se oxidaron y por ende se murieron.

En el T9 (2.0 mg/l BAP + 1.0 mg/l AG_3) y T7 (2.0 mg/l BAP + 0.0 mg/l AG_3), fueron los que presentaron una ligera disminución en el nivel de oxidación (ver figura 5), los cuales comparados con los restantes tratamientos fue relativamente bajo, el T9 presentó 6 explantes vivos (50%) y 6 explantes oxidados (50%), pero

¹ *Strelitzia reginae*, es una especie de planta ornamental importante de origen africano, que presenta niveles de oxidación muy altos.

fue el tratamiento T7 con un 58.3% de explantes vivos (7) y un 42% de explantes con oxidación (5), siendo esta la mejor respuesta para el cultivar Hass. Los demás tratamientos presentaron un nivel de oxidación mayor del 67%.

CUADRO 11. Respuesta del explante de aguacate cultivar Hass a un medio líquido de iniciación.

Tratamiento	Combinación de los Reguladores del crecimiento	Verdes	Porcentaje	Oxidados	Porcentaje
Testigo	0.0 mg/lit BAP + 0.0 mg/lit AG ₃	2	17	10	83
T2	0.0 mg/lit BAP + 0.5 mg/lit AG ₃	4	33	8	67
T3	0.0 mg/lit BAP + 1.0 mg/lit AG ₃	2	17	10	83
T4	1.0 mg/lit BAP + 0.0 mg/lit AG ₃	4	33	8	67
T5	1.0 mg/lit BAP + 0.5 mg/lit AG ₃	1	8	11	92
T6	1.0 mg/lit BAP + 1.0 mg/lit AG ₃	3	25	9	75
T7	2.0 mg/lit BAP + 0.0 mg/lit AG ₃	7	58.3	5	42
T8	2.0 mg/lit BAP + 0.5 mg/lit AG ₃	4	33	8	67
T9	2.0 mg/lit BAP + 1.0 mg/lit AG ₃	5	50	5	50
TOTAL		33	30%	78	70%

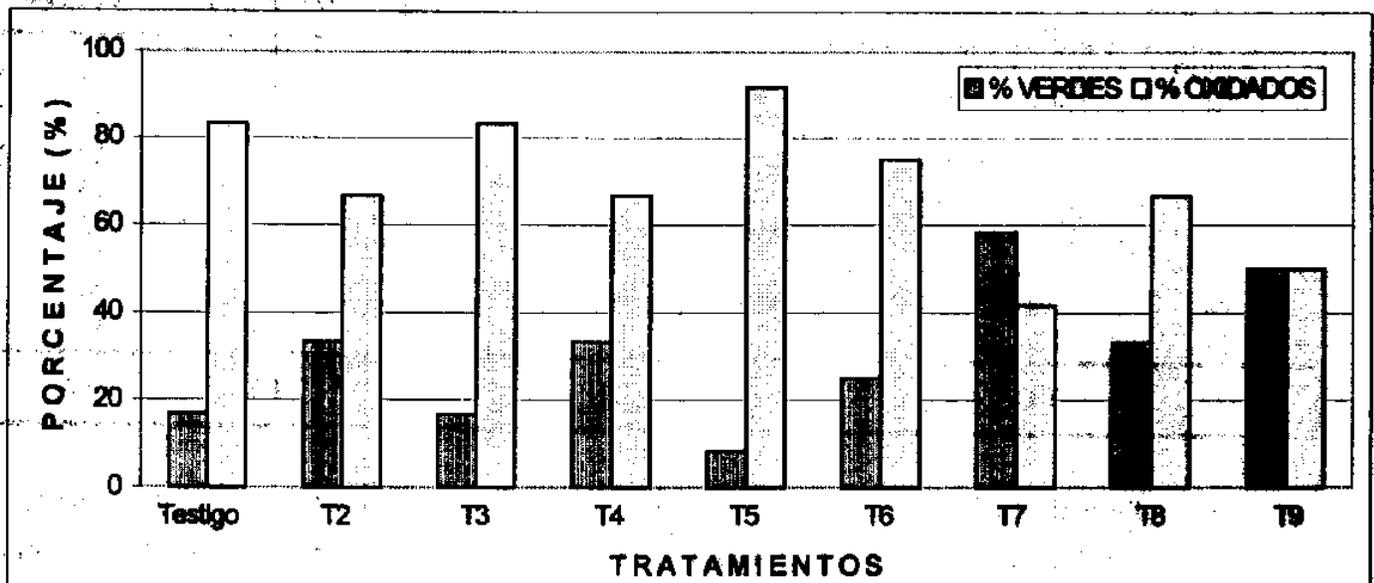


FIGURA 5. Comportamiento del explante de aguacate cultivar Hass al Medio Líquido de iniciación.

Referencia: T1 testigo (0.0 mg/lit BAP + 0.0 mg/lit AG₃); T2 (0.0 mg/lit BAP + 0.5 mg/lit AG₃); T3 (0.0 mg/lit BAP + 1.0 mg/lit AG₃); T4 (1.0 mg/lit BAP + 0.0 mg/lit AG₃); T5 (1.0 mg/lit BAP + 0.5 mg/lit AG₃); T6 (1.0 mg/lit BAP + 1.0 mg/lit AG₃); T7 (2.0 mg/lit BAP + 0.0 mg/lit AG₃); T8 (2.0 mg/lit BAP + 0.5 mg/lit AG₃); T9 (2.0 mg/lit BAP + 1.0 mg/lit AG₃).

Se puede observar que la presencia de dosis altas de BAP contrarresta parcialmente el efecto oxidativo en el explante. Por lo que el T7 (2.0 mg/lit BAP + 0.0 mg/lit AG₃) fue el utilizado para la preparación de explantes los cuales fueron trasladados a la siguiente fase.

La oxidación se manifiesta inicialmente en el corte del explante y cuando estos son introducidos dentro del medio de cultivo se difunde dejándolo con una coloración café oscuro. Frecuentemente la oxidación continua con el explante inhibiendo el crecimiento y provocando la muerte al tejido. Para reducir el porcentaje de oxidación se realizaron subcultivos en intervalos de 8 días obteniéndose una respuesta positiva; lo anterior se debió probablemente a la reducción del tiempo de contacto del explante con el medio de cultivo que ya contenía componentes producidos en el corte del explante los cuales son inhibitorios, pero después de dos transferencias se manifestó la oxidación y posterior muerte del explante.

Una respuesta similar se pudo observar para el cultivar Booth-8, en donde se evaluó el efecto de diferentes combinaciones de BAP (0.0, 1.0 y 2.0 mg/lit) y AG₃ (0.0, 0.5 y 1.0 mg/lit) donde el 24% del total de explantes se mantuvieron vivos y el 76% presentaron oxidación. (cuadro 12)

CUADRO 12. Respuesta del explante de aguacate cultivar Booth 8 a un Medio Líquido de iniciación.

Tratamiento	Combinación de los reguladores del crecimiento	Verdes	Porcentaje	Oxidados	Porcentaje
Testigo	0.0 mg/lit BAP + 0.0 mg/lit AG ₃	0	0	12	100
T2	0.0 mg/lit BAP + 0.5 mg/lit AG ₃	1	8	11	92
T3	0.0 mg/lit BAP + 1.0 mg/lit AG ₃	2	17	10	83
T4	1.0 mg/lit BAP + 0.0 mg/lit AG ₃	2	17	10	83
			67		
T7	2.0 mg/lit BAP + 0.0 mg/lit AG ₃	3	25	9	75
T8	2.0 mg/lit BAP + 0.5 mg/lit AG ₃	1	8	11	92
T9	2.0 mg/lit BAP + 1.0 mg/lit AG ₃	2	17	10	83
TOTAL		26	24%	82	76%

En el cultivar Booth-8 los tratamientos con mayor porcentaje de explantes vivos y menor porcentaje de explantes oxidados correspondieron a los tratamientos T5 (1.0 mg/lit BAP + 0.5 mg/lit AG₃) y T6 (1.0 mg/lit BAP + 1.0 mg/lit AG₃) que como se puede observar incluyeron concentraciones medias de BAP (1 mg/lit). De acuerdo con los resultados anteriores (cuadro 12) puede inferirse que el efecto se debió a la interacción de BAP y AG₃ ya que el tratamiento T4 con la misma concentración de BAP de los tratamientos anteriores manifestó un 83% de explantes oxidados, lo cual también se puede apreciar en la figura 6. Los restantes tratamientos presentaron niveles de oxidación de hasta el 100%, especialmente para el testigo (0.0 mg/lit de BAP + 0.0 mg/lit de AG₃).

La única respuesta obtenida luego de 2 subcultivos fueron para los tratamientos T5 y T6; se manifestó únicamente en que los explantes se mantuvieron verdes sin ningún daño. Generalmente la oxidación iniciaba en la parte apical de la yema y sobre el corte del explante; en este último se observó un oscurecimiento en el medio de cultivo y que con el tiempo este oscurecimiento se difundió en todo el explante, necrosándolo hasta provocarla la muerte. El T5 sirvió para la preparación de los explantes del cultivar Booth-8 utilizados en la Fase II.

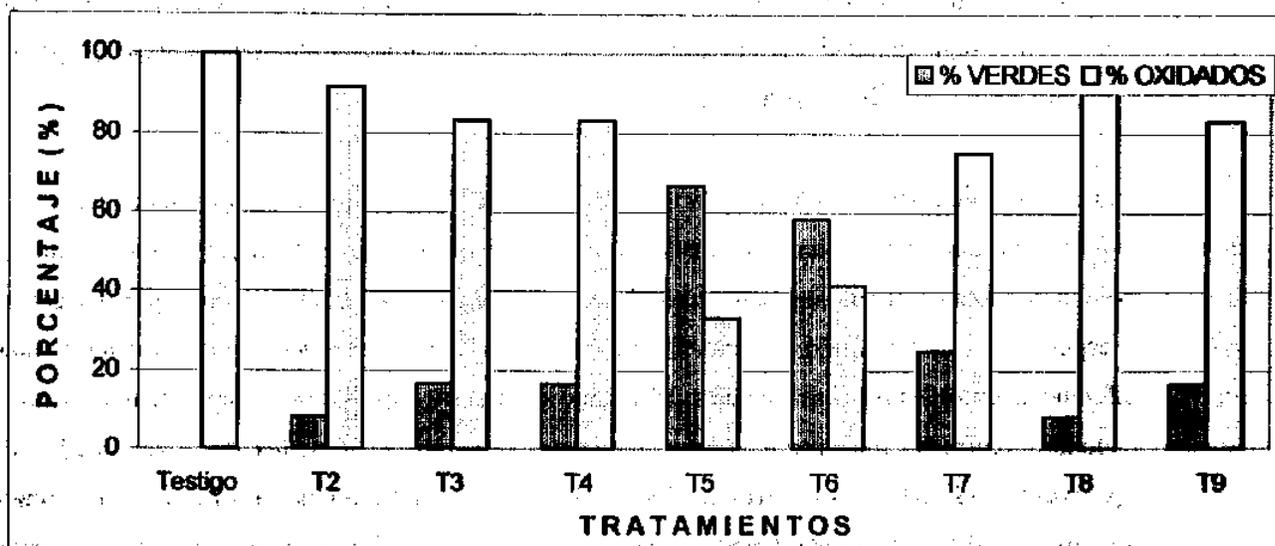


FIGURA 6. Comportamiento del explante de aguacate var. Booth 8 al Medio Líquido de iniciación.

Referencia: T1 testigo (0.0 mg/l BAP + 0.0 mg/l AG_3); T2 (0.0 mg/l BAP + 0.5 mg/l AG_3); T3 (0.0 mg/l BAP + 1.0 mg/l AG_3); T4 (1.0 mg/l BAP + 0.0 mg/l AG_3); T5 (1.0 mg/l BAP + 0.5 mg/l AG_3); T6 (1.0 mg/l BAP + 1.0 mg/l AG_3); T7 (2.0 mg/l BAP + 0.0 mg/l AG_3); T8 (2.0 mg/l BAP + 0.5 mg/l AG_3); T9 (2.0 mg/l BAP + 1.0 mg/l AG_3).

Los tratamientos con ausencia de BAP (testigo, T2 y T3) o en concentraciones altas de BAP (T7, T8 y T9) independientemente de la concentración de AG_3 presentaron los niveles más altos de explantes oxidados y por ende los valores más bajos de explantes vivos; tomando como una causa de la muerte los explantes el proceso de oxidación. Resultados de algunos investigadores (Schroeder and Spector, 1957; Murashige, 1964; Mehra and Mehra, 1972; Altman and Goren, 1974; Beasley, 1977; Gautman et al., 1983) revelan que la utilización altas concentraciones de AG_3 inducen a la formación de células indiferenciadas o callos y/o pueden producir efectos inhibitorios cuando se utiliza medios de cultivo con solamente AG_3 o en concentraciones mayores de 2.0 mg/l.

6.3.2 Posibles factores que estimularon la oxidación del explante:

La oxidación que causó la muerte de los explantes en los cultivares Hass y Booth-8 durante la primera etapa de este experimento pudo deberse a varios factores, que en conjunto no permitieron el desarrollo y el crecimiento de los explantes. El daño provocado resultó de la producción de un exudado de compuestos de fenólicos, que se

inicio principalmente en el corte del explante, esto fue muy grave durante la fase inicial del cultivo, pero en algunos casos deja de ser problema cuando el explante fue estimulado por los reguladores del crecimiento e inicio su desarrollo.

Los dos cultivares no difieren en la cantidad de las sustancias fenólicas producidas, la liberación de las sustancias fue similar en su grado de toxicidad o de susceptibilidad del explante hacia estas sustancias. Esto se pudo observar cuando en el segundo subcultivo de la Fase I la mayor parte de los tratamientos presentaron un alto nivel de oxidación tanto para el cultivar Hass y Booth-8.

La magnitud del oscurecimiento oxidativo y la inhibición del crecimiento que sucede en los cultivos *in vitro* depende en mucho de las especies utilizadas. El aguacate por ejemplo produce gran cantidad de sustancias luego de realizar el corte en el explante el cual contiene naturalmente altos niveles de taninos y otros hidroxifenoles; al igual que otras especies como *Castanea*, *Hamamelis*, *Juglans*, *Quercus*, *Paeonia*, *Rhododendron* y muchas coníferas. Las diferencias entre las mismas especies del mismo genero y cultivos dentro de la misma especie, por ejemplo, más exudados fenólicos fue producido por explantes de *Aconitum napellus* que por aquellos de *A. noveboracense* (Cervelli, 1987). En los cultivares Hass y Booth-8, estas diferencias no fueron muy marcadas debido que presentaron similitudes en los niveles de oxidación, donde el medio oscurecido favoreció la necrosis de los explantes.

La fuente de los explantes, es decir las plantas madres donde fueron recolectados los explantes pudo haber favorecido en parte al oscurecimiento oxidativo. Los tejidos jóvenes son a menudo menos propenso a la oxidación que otros más viejos. La concentración de los compuestos fenólicos exudados por el explante varía por la edad del material vegetal, ya que la mayoría de los estudios *in vitro* indican una mayor dificultad en el cultivo del material vegetal provenientes de árboles adultos (Bonga, 1982; Pliego-Alfaro y Murashige, 1987).

Otro factor puede ser la época del año en que se recolectan los explantes, la influencia del estado fisiológico de la planta madre fue determinante para el desarrollo *in vitro*. Los explantes colectados y utilizados en la época lluviosa no respondieron al estímulo de los reguladores del crecimiento, ya que existió un comportamiento diferenciales al momento de ser cultivado. La época lluviosa considerado como una etapa en donde se presenta una disminución en la estimulación del crecimiento de los explantes *in vitro*, presentando un algo grado de oxidación. Las yemas utilizados no responden al estímulo de los reguladores del crecimiento posiblemente por la inhibición de la yema en dicho período.

Se puede hacer mención a los productos utilizados para la desinfección del material vegetal pueden ser un factor que promueva la oxidación de los explantes, esto varía de acuerdo al tiempo de exposición y la concentración de los distintos agentes desinfectantes como se mencionó anteriormente.

Otro factor más es la composición del medio de cultivo que se está utilizando, posiblemente la concentración de sales; principalmente los elementos mayores Nitrógeno (N) y Potasio (K) puede ser un factor determinante. Para Anderson (1975), la concentración de estos elementos fue un factor limitante para su estudio, este ha sugerido que el tejido oxidado de explantes de *Rhododendron* fue incrementado por los altos niveles de K en un medio MS, y observó que esta oxidación no se presentó cuando utilizó un medio con la mitad de la concentración normal de N (KNO_3). Una reducción en la concentración de nitrógeno puede ser efectivo para la prevención del oscurecimiento en otras plantas.

Otros factores es la utilización del carbón activado. Según Hohtola (1988), el carbón activado puede ser tóxico para algunos tejidos (por ejemplo en explantes de *Pinus silvestris*). La adición exacta de este elemento algunas veces puede prevenir la oxidación; pero se debe tener el cuidado de que este también puede absorber los reguladores del crecimiento y otros componentes dentro del medio.

6.4 Fase II: Respuesta del explante en un medio de inducción para la estimulación y crecimiento de brote adventicios:

En esta fase se pudo observar el comportamiento de los explantes provenientes de la Fase I, hacia las distintas combinaciones de BAP (0.5, 3.0, 5.0 y 7.0 mg/lit) y AIB (0.5, 1.0, 3.0, 5.0 mg/lit) y un testigo absoluto (en ausencia de reguladores del crecimiento) en un Medio MS sólido. Se realizaron 3 subcultivos con un intervalo de 3 semanas.

6.4.1 Tipos de Respuesta Obtenidas para los cultivares Hass y Booth-8:

6.4.1.1 Niveles de oxidación:

Para el cultivar Hass, la primera respuesta obtenida durante los primeros subcultivos, fue que los explantes presentaron un oscurecimiento oxidativo del 75% del total de explantes mientras que el 25% de los explantes restantes se mantuvieron vivos sin oxidarse. Los tratamientos T6 (3.0 mg/lit BAP + 0.5 mg/lit AIB), T7 (3.0 mg/lit BAP + 1.0 mg/lit AIB) y el T8 (3.0 mg/lit BAP + 3.0 mg/lit AIB) presentaron un porcentaje de sobrevivencia arriba del 50%, es decir, 50, 67 y 50% respectivamente. El resto de los tratamientos mostraron un alto grado de oxidación, pero fueron los tratamientos T11 (5.0 mg/lit BAP + 1.0 mg/lit AIB), T15 (7.0 mg/lit BAP + 1.0 mg/lit

AIB) T16 (7.0 mg/lt BAP y 3.0 mg/lt AIB) y el T17 (7.0 mg/lt BAP + 5.0 mg/lt AIB) en donde el 100% de los explantes se oxidaron y por ende murieron. (cuadro 13)

CUADRO 13. Respuesta del cultivar Hass a los diferentes combinaciones de BAP y AIB en un medio sólido de Inducción.

Tratamientos	Combinación de los reguladores del crecimiento	Verdes	Porcentaje	Oxidados	Porcentaje
Testigo	0.0 mg/lt BAP + 0.0 mg/lt AIB	1	17	5	83
T2	0.5 mg/lt BAP+ 0.5 mg/lt AIB	2	33	4	67
T3	0.5 mg/lt BAP+ 1.0 mg/lt AIB	2	33	4	67
T4	0.5 mg/lt BAP+ 3.0 mg/lt AIB	1	17	5	83
T5	0.5 mg/lt BAP+ 5.0 mg/lt AIB	1	17	5	83
T6	3.0 mg/lt BAP+ 0.5 mg/lt AIB	3	50	3	50
T7	3.0 mg/lt BAP+ 1.0 mg/lt AIB	4	67	2	33
T8	3.0 mg/lt BAP+ 3.0 mg/lt AIB	3	50	3	50
T9	3.0 mg/lt BAP+ 5.0 mg/lt AIB	2	33	4	67
T10	5.0 mg/lt BAP+ 0.5 mg/lt AIB	2	33	4	67
T11	5.0 mg/lt BAP +1.0 mg/lt AIB	0	0	6	100
T12	5.0 mg/lt BAP +3.0 mg/lt AIB	2	33	4	67
T13	5.0 mg/lt BAP +5.0 mg/lt AIB	1	17	5	83
T14	7.0 mg/ltBAP + 0.5 mg/lt AIB	1	17	5	83
T15	7.0 mg/lt BAP + 1.0 mg/lt AIB	0	0	6	100
T16	7.0 mg/lt BAP + 3.0 mg/lt AIB	0	0	6	100
T17	7.0 mg/lt BAP + 5.0 mg/lt AIB	0	0	6	100
TOTAL		25	25%	77	78%

La figura 8, muestra el efecto de las diferentes combinaciones de estos dos reguladores del crecimiento (BAP/AIB) sobre la sobrevivencia de los brotes para el cultivar Booth-8. Como se puede observar la mayor respuesta la presento el T7 (3.0 mg/lt BAP + 1.0 mg/lt AIB) donde el 67% de los explantes se mantuvieron vivos (4 explantes) y el 33% restantes se oxidaron (2 explantes); pudiendose observar que la relación del regulador BAP con respecto a la auxina IBA es mayor (3.0:1.0), pero no existe una diferencia significativa con los restantes tratamientos que se mantuvieron arriba del 50% de sobrevivencia, ya que la relación entre la concentración de reguladores siguió siendo igual.

Un factor importante se pudo observar que cuando la concentración de BAP es mayor de 5 mg/lt dentro del medio de cultivo, su comportamiento es la de oxidar de todos los explantes.

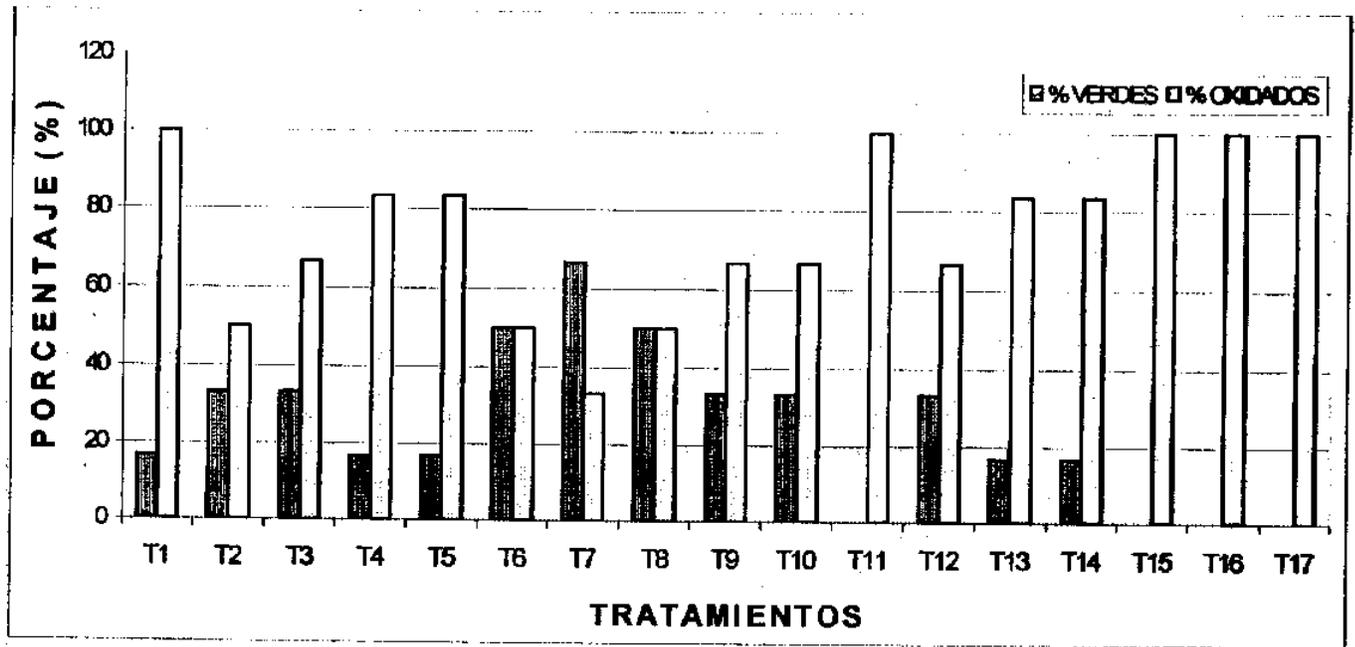


FIGURA 7. Comportamiento del explante de aguacate cv. Hass a un medio sólido de inducción para estimular el crecimiento de brotes.

Referencia: T1 (0.0 mg/lit BAP + 0.0 mg/lit AIB); T2 (0.5 mg/lit BAP + 0.5 mg/lit AIB); T3 (0.5 mg/lit BAP + 1.0 mg/lit AIB); T4 (0.5 mg/lit BAP + 3.0 mg/lit AIB); T5 (0.5 mg/lit BAP + 5.0 mg/lit AIB); T6 (3.0 mg/lit BAP + 0.5 mg/lit AIB); T7 (3.0 mg/lit BAP + 1.0 mg/lit AIB); T8 (3.0 mg/lit BAP + 3.0 mg/lit AIB); T9 (3.0 mg/lit BAP + 5.0 mg/lit AIB); T10 (5.0 mg/lit BAP + 0.5 mg/lit AIB); T11 (5.0 mg/lit BAP + 1.0 mg/lit AIB); T12 (5.0 mg/lit BAP + 3.0 mg/lit AIB); T13 (5.0 mg/lit BAP + 5.0 mg/lit AIB); T14 (7.0 mg/lit BAP + 0.5 mg/lit AIB); T15 (7.0 mg/lit BAP + 1.0 mg/lit AIB); T16 (7.0 mg/lit BAP + 3.0 mg/lit AIB); T17 (7.0 mg/lit BAP + 5.0 mg/lit AIB).

Para el cultivar Booth-8, también durante los primeros subcultivos se manifestó un alto grado de oxidación, en donde el 72% del total de explantes se oxidaron y fue únicamente el 28% de los explantes que se mantuvieron vivos.

Los explantes vivos presentaron una coloración verde. Los tratamientos T6 (3.0 mg/lit BAP + 0.5 mg/lit AIB), T7 (3.0 mg/lit BAP + 1.0 mg/lit AIB), T9 (3.0 mg/lit BAP + 5.0 mg/lit AIB), T10 (5.0 mg/lit BAP + 5.0 mg/lit AIB) y el T11 (5.0 mg/lit BAP + 1.0 mg/lit AIB) fueron los que presentaron un porcentaje de sobrevivencia mayor del 50%. Pero fueron los tratamientos T2 (0.5 mg/lit BAP + 0.5 mg/lit AIB), T4 (0.5 mg/lit BAP + 3.0 mg/lit AIB), T5 (0.5 mg/lit BAP + 5.0 mg/lit AIB) donde la oxidación se manifestó al 100% (cuadro 14)

CUADRO 14. Respuesta del cultivar Booth-8 a las diferentes combinaciones de BAP y AIB en un medio sólido de inducción.

Tratamiento	Combinación de los reguladores del crecimiento	Verdes	Porcentaje	Oxidados	Porcentaje
Testigo	0.0 mg/lit BAP + 0.0 mg/lit AIB	1	17	5	83
T2	0.5 mg/lit BAP + 0.5 mg/lit AIB	0	0	6	100
T3	0.5 mg/lit BAP + 1.0 mg/lit AIB	1	17	5	83
T4	0.5 mg/lit BAP + 3.0 mg/lit AIB	0	0	6	100
T5	0.5 mg/lit BAP + 5.0 mg/lit AIB	0	0	6	100
T6	3.0 mg/lit BAP + 0.5 mg/lit AIB	3	50	3	50
T7	3.0 mg/lit BAP + 1.0 mg/lit AIB	3	50	3	50
T8	3.0 mg/lit BAP + 3.0 mg/lit AIB	1	17	5	83
T9	3.0 mg/lit BAP + 5.0 mg/lit AIB	3	50	3	50
T10	5.0 mg/lit BAP + 0.5 mg/lit AIB	4	67	2	33
T11	5.0 mg/lit BAP + 1.0 mg/lit AIB	3	50	3	50
T12	5.0 mg/lit BAP + 3.0 mg/lit AIB	1	17	6	100
T13	5.0 mg/lit BAP + 5.0 mg/lit AIB	1	17	5	83
T14	7.0 mg/lit BAP + 0.5 mg/lit AIB	2	33	4	67
T15	7.0 mg/lit BAP + 1.0 mg/lit AIB	2	33	4	67
T16	7.0 mg/lit BAP + 3.0 mg/lit AIB	1	17	5	83
T17	7.0 mg/lit BAP + 5.0 mg/lit AIB	1	17	5	83
TOTAL		28	28%	74	72%

La figura 9, también muestra el efecto de las diferentes combinaciones de los reguladores BAP y AIB para el cultivar Booth-8, la mejor respuesta en cuanto al porcentaje de sobrevivencia fue del tratamiento T10 (5.0 mg/lit BAP + 0.5 mg/lit AIB); donde el 67% de los explantes se mantuvieron vivos (4 explantes) y el 33% restantes se oxidaron (2 explantes). Al igual que el cultivar Hass, la relación del regulador BAP con respecto a la auxina AIB fue mayor (5.0:0.5).

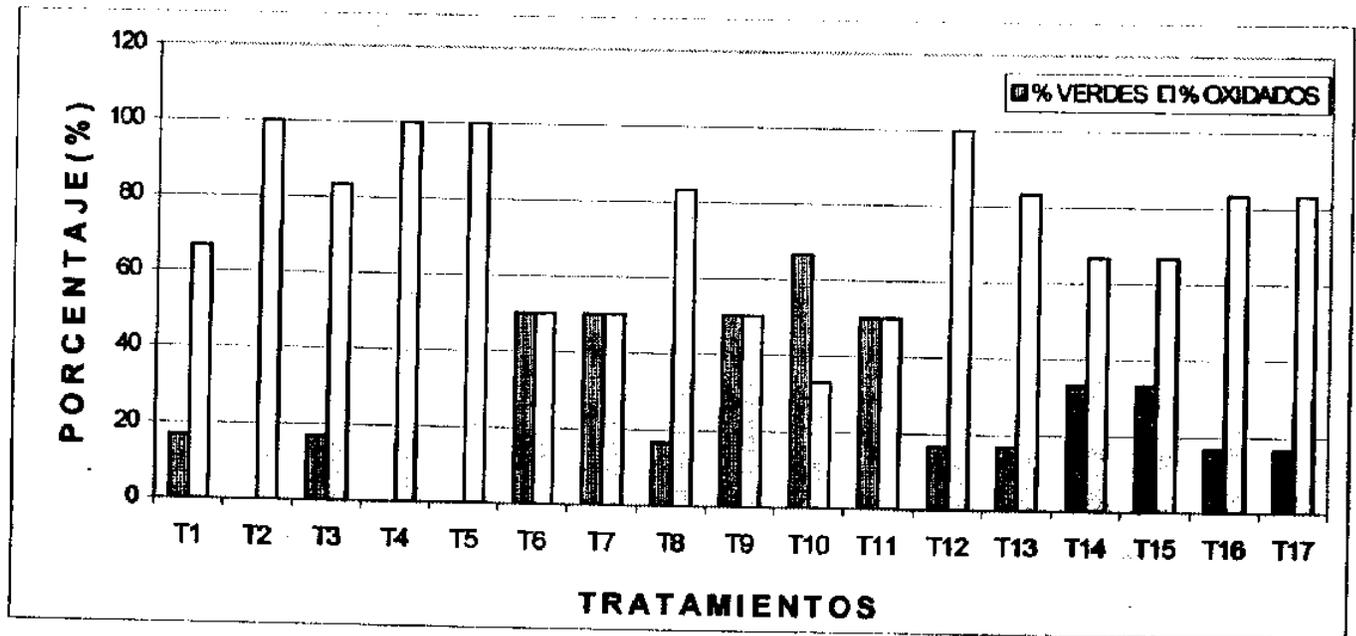


FIGURA 8. Comportamiento del cultivar Booth-8 a un medio sólido de inducción para estimular el crecimiento de brotes.

Referencia: T1 (0.0 mg/lit BAP + 0.0 mg/lit IBA); T2 (0.5 mg/lit BAP + 0.5 mg/lit AIB); T3 (0.5 mg/lit BAP + 1.0 mg/lit AIB); T4 (0.5 mg/lit BAP + 3.0 mg/lit AIB); T5 (0.5 mg/lit BAP + 5.0 mg/lit AIB); T6 (3.0 mg/lit BAP + 0.5 mg/lit AIB); T7 (3.0 mg/lit BAP + 1.0 mg/lit AIB); T8 (3.0 mg/lit BAP + 3.0 mg/lit AIB); T9 (3.0 mg/lit BAP + 5.0 mg/lit AIB); T10 (5.0 mg/lit BAP + 0.5 mg/lit AIB); T11 (5.0 mg/lit BAP + 1.0 mg/lit AIB); T12 (5.0 mg/lit BAP + 3.0 mg/lit AIB); T13 (5.0 mg/lit BAP + 5.0 mg/lit AIB); T14 (7.0 mg/lit BAP + 0.5 mg/lit AIB); T15 (7.0 mg/lit BAP + 1.0 mg/lit AIB); T16 (7.0 mg/lit BAP + 3.0 mg/lit AIB); T17 (7.0 mg/lit BAP + 5.0 mg/lit AIB).

6.4.1.2 Explantes con Ausencia de respuesta:

Un total de 25 explantes (25%) del cultivar Hass que se mantuvieron verdes durante la Fase II presentaron más de algún tipo de respuesta. El 60% de estos (15 explantes) (cuadro 16) continuaron sin presentar respuesta alguna; solo se manifestaron los explantes con una coloración verde brillante, sin ninguna oxidación. Siendo los tratamientos T6 (3.0 mg/lit BAP + 0.5 mg/lit AIB), T7 (3.0 mg/lit BAP + 1.0 mg/lit AIB), T8 (3.0 mg/lit BAP + 3.0 mg/lit AIB), T9 (3.0 mg/lit BAP + 5.0 mg/lit AIB) y el T13 (5.0 mg/lit BAP + 5.0 mg/lit AIB) que los explantes manifestaron respuesta a los las diferentes combinaciones de los reguladores. (figura 8)

Para el cultivar Booth-8, un total de 28 explantes (28%) continuaron subcultivándose; el 36% de estos explantes (10) (cuadro 17) mantuvieron ausencia de respuesta. Los tratamientos de mayor respuesta se observaron en los tratamientos, T6 (3.0 mg/lit BAP + 0.5 mg/lit AIB), T7 (3.0 mg/lit BAP + 1.0 mg/lit AIB), T9 (3.0 mg/lit BAP + 5.0 mg/lit AIB), T10 (5.0 mg/lit BAP + 0.5 mg/lit AIB) y el T11 (5.0 mg/lit BAP + 1.0 mg/lit AIB).

Para el resto de los tratamientos, no se obtuvo ningún desarrollo y crecimiento del explante, todos mantuvieron una coloración verde brillante después del tercer subcultivo (9 semanas). Las combinaciones de los reguladores (BAP/AIB) de estos tratamientos no pudieron estimular al explante.

6.4.1.3 Explantes que presentaron formación de callo:

En la figura 8, se puede observar que el 28% de los explantes del cultivar Hass (7 explantes) presentaron la formación de callo, desarrollándose entre el segundo y tercer subcultivo. El tratamiento T7 (3.0 mg/lt BAP + 1.0 mg/lt AIB) presentó el 75% de los explantes (3 explantes) con callos. (cuadro 15, figura 8).

Para la variedad Booth 8, el 46% de los explantes (13 explantes) que manifestaron algún tipo de respuesta, formaron callo, pero es el tratamiento T9 (3.0 mg/lt BAP + 5.0 mg/lt AIB), que presentó el 100% de los explantes (4 explantes) con callos. Manifestándose desde los primeros subcultivos. (cuadro 16, figura 9)

La coloración de estos callos para las dos variedades fue muy similar, era de un color café claro de tamaño muy variado. Esta respuesta se puede tomar como un resultado indeseable, ya que esto demuestra que en el medio de cultivo no hubo un balance hormonal que estimulara al explante a la formación directa de brotes. La formación de callos tiene como desventaja la variación e inestabilidad genética. La proliferación de este conjunto de células indiferenciadas se observaron generalmente en la base del corte del explante, manteniendo la punta del brote sin ninguna respuesta.

Otra característica que se pudo observar es que luego de varios subcultivos, los explantes que formaron callos se tornaban en una coloración oscura para luego necrosarse. Por lo que era necesario realizar nuevas transferencias eliminando las partes muertas, lo que provocaba que en cada una de ellas el material fuese reduciéndose de tamaño; por lo que fueron eliminados.

6.4.1.4 Explantes que presentaron brotes adventicios inducidos:

Un total de 3 tratamientos (8% de los explantes) pudieron formar brotes adventicios para el cultivar Hass. En el cuadro 17, se pueden observar que los tratamientos T6 (3.0 mg/lt BAP + 0.5 mg/lt AIB), T7 (3.0 mg/lt BAP + 1.0 mg/lt AIB) y el tratamiento T8 (3.0 mg/lt BAP + 3.0 mg/lt AIB) formaron respectivamente un solo explante con brotación; el tamaño del brote osciló entre 5, 6 y 2 mm de longitud. La concentración del regulador BAP es la misma para los tres tratamientos (3.0 mg/lt) únicamente varía la concentración del regulador AIB. La interacción de estos dos reguladores provocó el efecto de proliferación de pequeños brotes, observándose que la relación de BAP fue mayor que el AIB.

Pero debido al bajo porcentaje de proliferación aún no se ha encontrado un balance hormonal que establezca la formación de brotes para este cultivar.

Para el cultivar Booth-8, la figura 10 nos muestra el tipo de respuesta obtenido, el cual nos indica que solo el 18% de los explantes (5 explantes) manifestaron proliferación de brotes. Los tratamientos resultantes son los que dieron resultado para el cultivar Hass; T6 (3.0 mg/lt BAP + 0.5 mg/lt AIB), T7 (3.0 mg/lt BAP + 1.0 mg/lt AIB) y el tratamiento T8 (3.0 mg/lt BAP + 3.0 mg/lt AIB), además de un tratamiento aislado, el tratamiento T12 (5.0 mg/lt BAP + 3.0 mg/lt AIB) que produjo la formación de un brote con una elongación aproximada de 5 mm. También se puede notar que la concentración de BAP es mayor y solamente el T8 la relación es igual.

La característica de los brotes adventicios formados es que presentaba una pequeña elongación de la punta meristemática del brote, ya que no existió respuesta de los primordios foliares. Luego los brotes presentaron formación de una especie de hojas que no pudieron desarrollarse. En el último subcultivo no se observó crecimiento de estos brotes.

El efecto de la citocinina como el BAP al igual que la auxina como el AIB en cultivo de tejidos puede variar de acuerdo a los componentes usados dentro del medio de cultivo, el tipo de cultivo, la variedad de las plantas y si el explante es recolectado de plantas de tejido joven o adulto.

CUADRO 15. Tipo de Respuesta obtenidas para el explante de aguacate cv. Hass

Tratamiento		Tipo de Respuesta obtenida				
BAP en mg/lt	AIB en mg/lt	No. de explantes vivos	Ninguna	Cállos	No. de brotes	Elongación (mm)
0.0	0.0	1	1 ++			
0.5	0.5	2	2 ++			
0.5	1.0	2	2 ++			
0.5	3.0	1	1 ++			
0.5	5.0	1	1 ++			
3.0	0.5	2	1 +	1		
5.0	0.5	2	2 ++			
5.0	3.0	2	2 ++			
5.0	5.0	1	-	1		
7.0	0.5	1	1 ++			
TOTAL		25	15 (60%)	7 (28%)	3 (12%)	

REFERENCIA: (+) mas de algún explante presenta respuesta; (++) todos los explantes presentaron ausencia de respuesta.

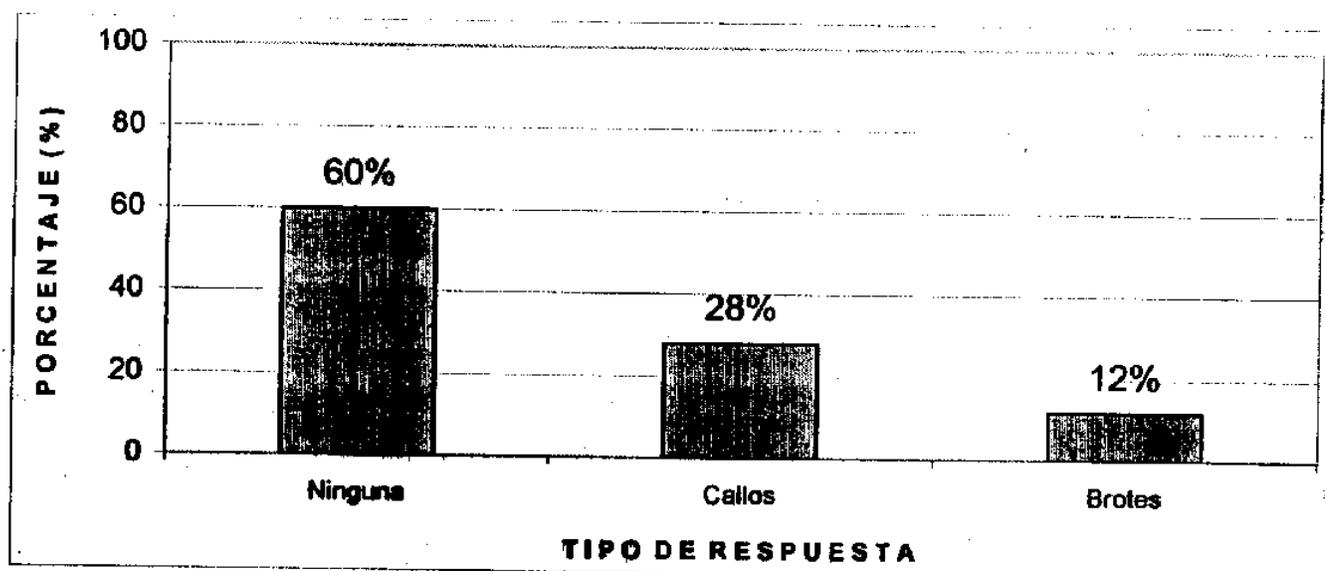


FIGURA 9. Tipos de respuesta obtenida para el cultivar Hass durante la fase II.

Cuadro 17. Tipos de respuesta obtenida para el explante de aguacate cv. Booth-8.

Tratamiento		Tipo de Respuesta obtenida				
BAP en mg/lt	AIB en mg/lt	No. de Explantes vivos	Ninguna	Callos	No. de brotes	Elongación (mm)
0.0	0.0	1	1 ++			
0.5	1.0	1	1 ++			
0.0	0.5					
0.0	1.0					
0.0	3.0					
3.0	5.0	4	-	4		
5.0	0.5	4	2 +	2		
5.0	1.0	3	1 +	2		
0.0	3.0					
5.0	5.0	1	-	1		0.2
7.0	0.5	2	1 +	1		0.2
7.0	1.0	2	2 ++			0.2
7.0	3.0	1	1 ++			0.1
7.0	5.0	1	1 ++			0.1
TOTAL		28	11 (39%)	12 (43%)	5 (18%)	

REFERENCIA: (+) mas de algún explante presenta respuesta; (++) todos los explantes presentaron ausencia de respuesta.

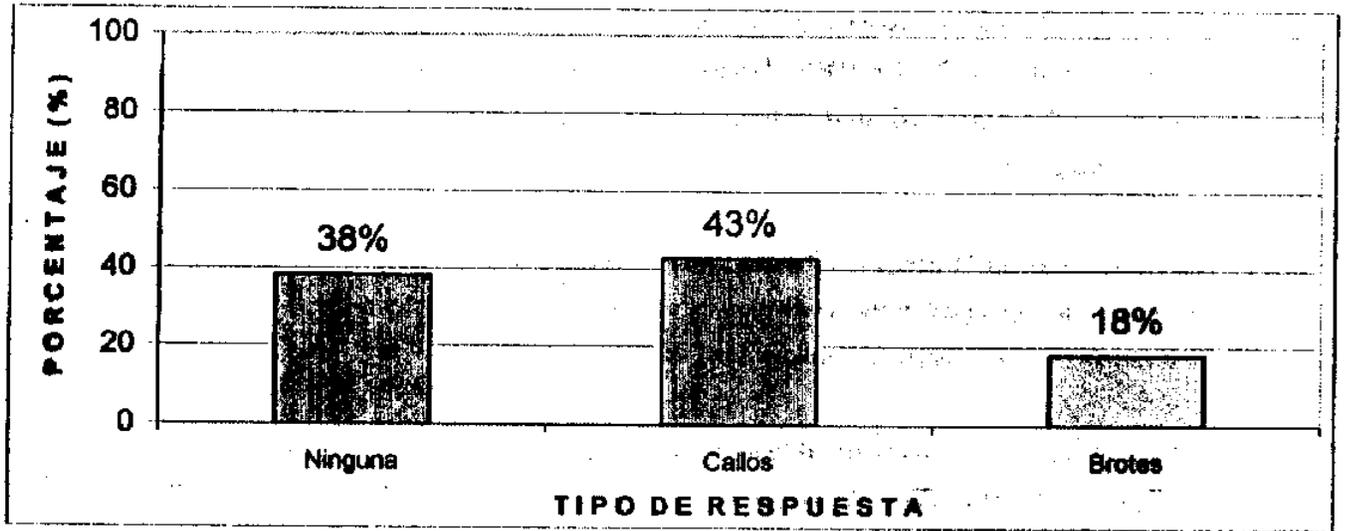


Figura 10. Tipos de respuesta obtenida para el cultivar Booth-8 durante la Fase II.

VII. CONCLUSIONES

- 7.1 El proceso de desinfección más efectivo fue al utilizar alcohol al 70% durante 25 segundos, luego la utilización de hipoclorito de sodio (NaOCl) al 1.04% durante 5 minutos, y por ultimo la utilización de algunos fungicidas como el Benomyl (0.5 gr/lit) y Bavistin (0.5 ml/lit) durante 20 minutos en agitación; no existe diferencia alguna entre los cultivares evaluados.
- 7.2 Los explantes provenientes de especies leñosas, como el aguacate, son muy susceptibles a la oxidación fenólica, lo que incide en forma negativa en desarrollo y crecimiento de brotes tanto en el cultivar Hass y Booth-8. El oscurecimiento oxidativo se manifestó durante la I Fase en un 70% para el cv. Hass y 76% en el cv. Booth-8
- 7.3 No se obtuvo una buena respuesta al estímulo de los reguladores del crecimiento BAP y AIB ya que existió un bajo porcentaje de proliferación de brotes en cada uno de los cultivares Hass y Booth-8, 12% y 18% respectivamente. Siendo la oxidación de los explantes la respuesta en un alto porcentaje (76% para el cv. Hass y 73% para el cv. Booth-8).

VIII. RECOMENDACIONES

- 8.1 Es necesario la evaluación de otros antioxidantes para reducir el oscurecimiento oxidativo el cual promueve la oxidación de los explantes, ya que este factor fue el que incidió en el mayor porcentaje de mortandad de los mismos.
- 8.2 La utilización de un medio líquido de inducción con los macronutrientes reducidos al 50% en el medio de cultivo y especialmente los que contienen nitrógeno (NH_4NO_3 y KNO_3), y aumentos en las concentraciones de hierro (FeSO_4 y Na_2EDTA) deberían de evaluarse con el objetivo de reducir el porcentaje de oxidación de los explantes.
- 8.3 La obtención de los explantes debe realizarse durante la época seca; y de plantas que crezcan bajo condiciones controladas de precipitación y temperatura, esto disminuirá los niveles de contaminación manifestada en la fase de laboratorio.
- 8.4 Realizar estudios que permitan evaluar diferentes tipos de explantes.
- 8.5 Evaluar otra técnica de Micropropagación *in vitro* tales como: embriogénesis somática, cultivo de protoplastos y otros, que permitan desarrollar una metodología de propagación más efectiva.

XI. BIBLIOGRAFÍA

1. AGUILAR, M.E. 1988. Cultivo de tejidos en café, cacao y plátano. Turrialba, Costa Rica, Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza. 60 p.
2. BIDWELL R, G.S. 1979. Fisiología vegetal. Trad. Guadalupe Cano. México, AGT. 722 p.
3. COLOM BORGHINI, A.L.; ESTRADA PALOMO, R. A. 1991. El cultivo de aguacate para la exportación. Guatemala, CEDIME; Gremial de exportadores de productos no tradicionales, Departamento de información comercial. s.p.
4. DALASO, L.; GUEVARA, E. 1989. Multiplicación clonal *in vitro* del aguacate *Persea americana* cv. "Fuerte". Centro de Investigaciones Agronómicas, Universidad de Costa Rica, Agronomía Costarricense (C.R.) no. 13(1):61-71.
5. DODDS, H.; ROBERTS, L. 1986. Experiments in plant tissue culture. 2 ed. EE.UU., Cambridge University. Press. 232 p.
6. EVANS, D. et al. 1983. Handbook of plant and cell culture. EEUU, Macmillan Publishing. v. 3-5.
7. GEORGE, E.F. 1993. Plant propagation by tissue culture. 2 ed. E.E.U.U., Edington Exegetics. s.p. v.1 p. 640-651.
8. HARTMANN, H.T.; KESTER, D.F. 1982. Propagación de plantas; principios y prácticas. Trad. por Antonio Marín Ambrosio, México, D.F., Continental. 406-424 p.
9. HURTADO, S.M.; MERINO, M.E. 1987. Cultivo de tejidos vegetales. México, Trillas. 227 p.
10. JANICK, J.; MOORE, J.N. 1975. Advances in fruit breeding. Subtropical fruits. Indiana, E.E.U.U., Purdue University Press.
11. LOSAYA ZALDAÑA, H. 1990. Fundamento teórico-práctico del cultivo de tejidos vegetales. Trad. por Cadmo H. Rosell; Victor M. Villalobos. Roma, Italia, FAO. 112 p.
12. LITZ, R.E. 1999. *In vitro* conservation of *Persea*. Florida, E.E.U.U., Agricultural Experiment Station. Journal Series no. R-06366. p. 16.
13. MARTINEZ BARRERA, R. 1990. La comercialización del aguacate ante el tratado del libre comercio problemática fitosanitario actual y soluciones. Michoacán, México, Comité regional de Sanidad Vegetal. 4 p.
14. MEIRA, Z.; A. H. HALEVY. 1983. Control of oxidative browning and *in vitro* propagation of *Sterilitzia reginae*. Hort Science (Israel) 18(4):434-436.
15. PLIEGO-ALFARO, F. 1988. Development of *in vitro* rooting bioassay using juvenile-phase stem cuttings of *Persea americana* Mill. Malaga, España, Journal of Horticultural Science. (España) 63(2):295-301.

16. PLIEGO-ALFARO, F; BERG, B.O. 1992. Avocado. ed. Hammerschlar FA, Litz RE. Center for agriculture and biosciences. Biotechnology Perennial Fruit Crops. Wallingford, E.E.U.U. p. 323-334
17. GUATEMALA, MINISTERIO DE AGRICULTURA, PROYECTO DE LA FRUTA. 1997. Aguacates variedad Hass y Booth-8: La alternativa rentable de la nueva producción de aguacate. Guatemala. 5 p.
18. RANDOLPH, H. et al. 1985. Tissue culture in forestry and agriculture. EEUU, PLENUM. p. 379.
19. 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.
20. ROCA, W.M.; MROGINSKI, L.A. Cultivo de tejidos en la agricultura. Fundamentos y aplicaciones. Cali, Colombia, Centro Internacional de Agricultura Tropical. 970 p.
21. RODRIGUEZ SUPPO, F. 1982. El aguacate. México, D.F., Editoriales S.A. 167 p.
22. ROVIRA A., L.; ALVAREZ R.C.; PINTO L., F. 1986. El cultivo del aguacatero. Caracas, Venezuela, Fondo Nacional de Investigaciones Agropecuarias, Universidad Central de Venezuela, Fondo de Publicaciones de FUSAGRI. 86 p.
23. RUEHLE., G.D. 1963. La industria del aguacate. Florida, E.E.U.U. Estaciones de Experimentación Agrícola; Universidad de Florida; Centro Regional de Ayuda Técnica. 48 p.
24. THORPE, T.A. 1988. Plant tissue culture, methods and applications in agriculture. New York, E.E.U.U., Academic Press. 177 p.
25. UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA, FACULTAD DE AGRONOMIA. s.f. Clasificación de variedades de aguacate *Persea americana* Miller de acuerdo a su floración. Guatemala. s.p.
26. AMADOR, D. 1996. Manual de laboratorio: Curso intensivo de técnicas de cultivo de tejidos vegetales. Guatemala, Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Agronomía. 33 p.
27. USUI, K. et al. 1996. Principios básicos del cultivo de tejidos vegetales. Guatemala, ICTA; JOCV. 166 p.
28. VAZQUES, F.; CARRILLO, E.; MEJIA, L. 1991. Biotecnología. Guatemala, ICTA. 22 p.
29. VELARDE GIL-ALBERT, F. 1989. Morfología y fisiología del árbol frutal: Tratado de arboricultura frutal. 2 ed. Madrid, España, Universidad Politécnica de Madrid. Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos. v.1, 104 p.
30. VELASQUEZ, M. 1971. Floración del aguacate y recomendaciones para su cultivo. Guatemala, Ministerio de Agricultura, Ganadería y Alimentación Dirección de Investigación Agrícola. p. 1-4-23.

31. VIDALIE, H. 1986. Cultivo in vitro. Trad. por Eugenia de Aragón Espejo. México, D.F., Editorial Científica. 508 p.
32. VILLALOBOS, V.M. 1986. Fundamento teóricos y prácticos del cultivo de tejidos vegetales. Chapingo, México, Colegio de Postgraduados, Centro de Genética, Laboratorio de Biotecnología. 192 p.
33. W. WHILEY, A.; SCHAFFER, B. 1994. Avocado. (E.E.U.U.) p. 3-35.
34. WITJAKSONO. 1997. Development of protocols for avocado tissue culture: somatic embryogenesis, protoplasts Culture, shoot proliferation and protoplast fusion. Ph. D. E.E.U.U., University of Florida.
35. _____ 1999. Maturation and germination of avocado *Persea americana* somatic embryos. *Plant Cell Tissue Org. Cult.* (E.E.U.U.) (in press).
36. _____; LITZ, R.E.; GROSSER, J.W. 1998. Isolation, culture and regeneration of avocado *Persea americana* protoplasts. *Plant Cell Reports*, (E.E.U.U.) 18: 235-242.
37. _____; LITZ, R.E. 1999. Induction and growth characteristics of embryogenic avocado *Persea americana* cultures. *Plant Cell Tissue Org. Cult.* (E.E.U.U.) (in press).



vº. Bº.

Miriam de la Roca

X. APÉNDICE

The following table shows the results of the experiments conducted on the effect of the concentration of the solution on the rate of reaction. The data indicates that as the concentration of the solution increases, the rate of reaction also increases. This is due to the fact that a higher concentration of reactants leads to a greater number of collisions between particles, resulting in a faster reaction rate.

Concentration of Solution (M)	Rate of Reaction (mol/L·s)
0.1	0.02
0.2	0.04
0.3	0.06
0.4	0.08
0.5	0.10

The data shows a direct proportionality between the concentration of the solution and the rate of reaction. This relationship can be expressed as:

$$\text{Rate of Reaction} \propto [\text{Concentration}]$$

where $[\text{Concentration}]$ represents the molar concentration of the solution.

Apendice 1

CUADRO 17A. Requerimientos Del Medio De Cultivo Basal De Murashige & 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	
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.25	
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.025	
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.025	
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8.6	
H ₃ BO ₃	6.2	
MnSO ₄ ·H ₂ O	22.3	
Na ₂ EDTA	37.26	
FeSO ₄ ·7H ₂ O	27.6	
Ácido nicotínico	0.5	
Piridoxina-HCl	0.5	
Tiamina-HCl	0.1	
Glicina	2.0	
Mio-Inositol	100	
Sacarosa	30,000	
Agar	7,000	
pH	5.7 - 5.8	

CUADRO 18A. Procedimiento de Preparación de Soluciones Concentradas de los Reguladores del Crecimiento.

1. Pesar 100 mg del regulador del crecimiento deseado.
2. Vaciar los 100 mg del regulador en un balón de vidrio para aforar a 100 ml.
3. Agregar poco a poco el solvente DMSO (100 ml). La concentración del regulador será 1:1 (1 mg regulador / 1 ml solvente).
4. Agitar la preparación mientras se agrega el solvente DMSO.
5. Almacenar la solución a una temperatura de 0 - 5°C.
6. Siempre que se vayan a utilizar los reguladores se tienen que retirar del refrigerador, para que se deshielen para obtener mejores resultados.

CUADRO 19A. Procedimiento para la preparación de soluciones concentradas de concentración conocida para el medio basal MS

SOLUCIONES CONCENTRADAS	COMPONENTES	CANTIDAD REQUERIDA (mg/lt)	CANTIDAD REQUERIDA (mg/lt)	CANTIDAD REQUERIDA (para 1 litro)	CANTIDAD REQUERIDA (diferentes volúmenes)
Macro "A" (1X)	NH ₄ NO ₃ KNO ₃	1650 1900	1650 1900	1.65 1.90	agregar directamente
Macro "B" (10X)	CaCl ₂ ·2H ₂ O KH ₂ PO ₄	440 170	4400 1700	4.4 1.70	1.1 0.425 (250 ml)
Macro "C" (10X)	MgSO ₄ ·7H ₂ O	370	3700	3.7	0.925 (250 ml)
Micro "A" (1000X)	KI Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.83 0.25	830 250	0.83 0.25	0.2075 0.0625 (250 ml)
Micro "B" (5000X)	CuSO ₄ ·5H ₂ O CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.025 0.025	125 125	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	8.6 6.2 22.3	860 620 2230	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	37.26 27.6	3726 2760	3.73 2.76	0.9315 0.69 (250 ml)
Solución Vitaminas (1000X)	Ácido nicotínico Piridoxina-HCl Tiamina-HCl Glicina	0.5 0.5 0.1 2.0	500 500 100 2000	0.5 0.5 0.1 2.0	0.05 0.05 0.02 0.20 (100 ml)
Inositol (100X)	Mio-Inositol	100	10000	10.0	2.5 (250 ml)



Ref. Sem.020-2000

FACULTAD DE AGRONOMIA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES
AGRONOMICAS

LA TESIS TITULADA: "RESPUESTA DE DOS CULTIVARES DE AGUACATE Persea americana
Mill. var. guatemalensis cv. Hass y var. americana cv.
Booth-8 AL CULTIVO DE TEJIDOS IN VITRO".

DESARROLLADA POR EL ESTUDIANTE: JOSE RICARDO CALDERON ESTRADA

CARNET No: 9210159

HA SIDO EVALUADA POR LOS PROFESIONALES: Ing. Agr. Francisco J. Vásquez Vásquez
Ing. Agr. José Humberto Calderón Díaz
Ing. Agr. Fernando Rodríguez Bracamonte
Ing. Agr. Carlos E. Roca Canet

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. M.Sc. Domingo Amador Pérez
A S E S O R

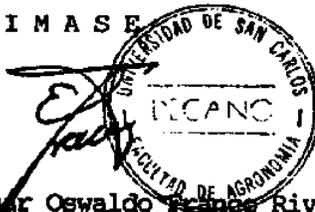
Ing. Agr. Edgar A. Martínez tambito
A S E S O R

Edgar A. Martínez T.
Ingeniero Agrónomo
Colegiado 415

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



IMPRIMASE



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

cc:Control Académico
IIA.
Archivo
AH/ptr.

APARTADO POSTAL 1545 5 01091 GUATEMALA, C.A.

TEL/FAX (502) 476-9794

e-mail: lusac.edu.gt 5 <http://www.usac.edu.gt/facultades/agronomia.htm>