

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



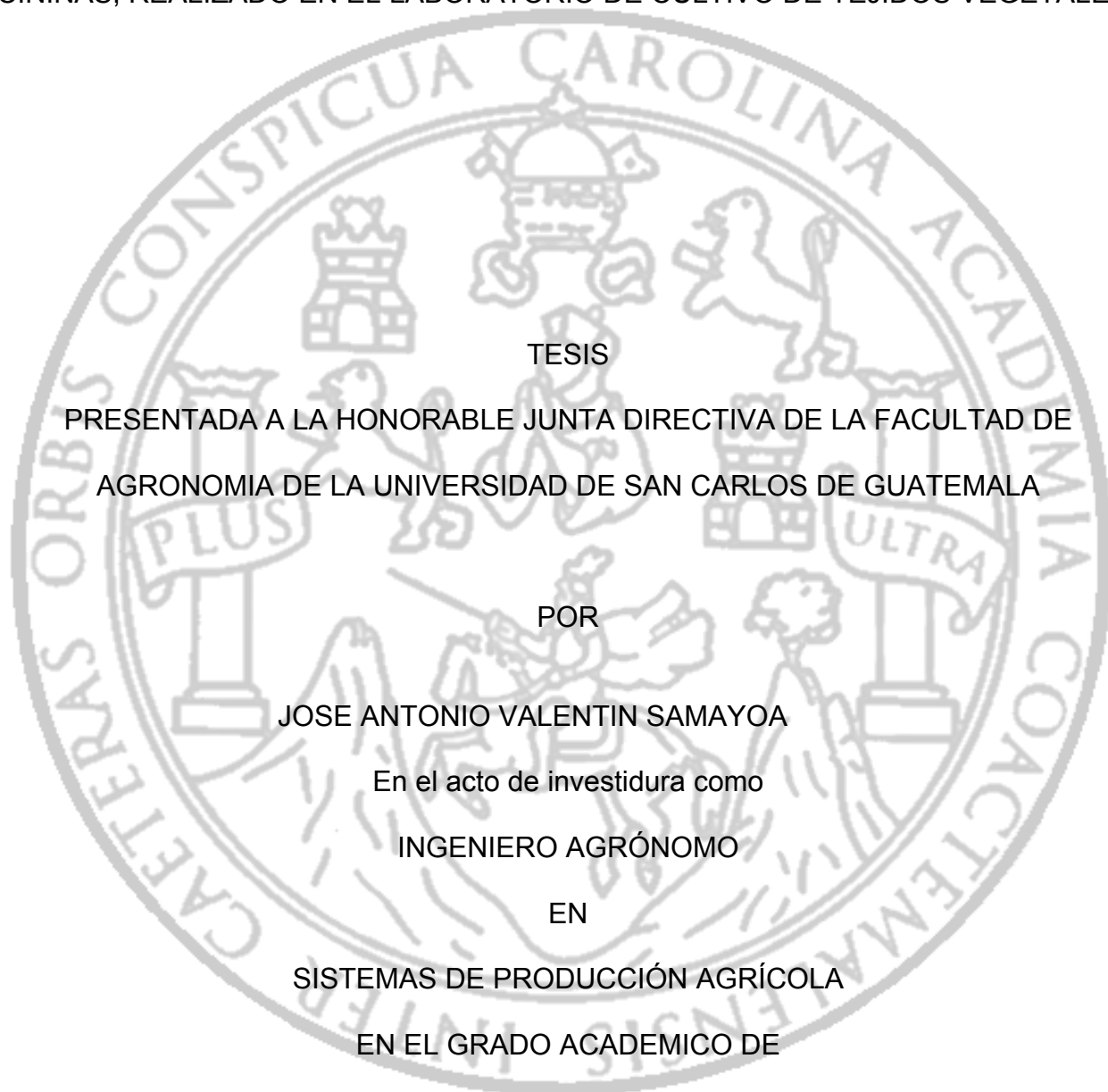
RESPUESTA DE DOS GENOTIPOS DE AGUACATE (*Persea americana* var. Mill) A LA MICROPROPAGACIÓN UTILIZANDO DIFERENTES COMBINACIONES DE AUXINAS Y CITOCININAS, REALIZADO EN EL LABORATORIO DE CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES.

JOSE ANTONIO VALENTIN SAMAYOA

GUATEMALA, NOVIEMBRE DEL 2005

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

RESPUESTA DE DOS GENOTIPOS DE AGUACATE (*Persea americana* var. Mill) A LA MICROPROPAGACIÓN UTILIZANDO DIFERENTES COMBINACIONES DE AUXINAS Y CITOCININAS, REALIZADO EN EL LABORATORIO DE CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES.



TESIS

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

POR

JOSE ANTONIO VALENTIN SAMAYOA

En el acto de investidura como

INGENIERO AGRÓNOMO

EN

SISTEMAS DE PRODUCCIÓN AGRÍCOLA

EN EL GRADO ACADÉMICO DE

LICENCIADO

GUATEMALA, NOVIEMBRE DEL 2005

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA

RECTOR

M. V. Luis Alfonso Leal Monterroso

JUNTA DIRECTIVA DE LA FACULTAD DE AGRONOMIA

Decano:		Dr. Ariel Abderraman Ortiz López
Vocal primero:		Ing. Agr. Alfredo Itzep Manuel
Vocal segundo	:	Ing. Agr. Walter Arnoldo Reyes Sanabria
Vocal tercero	:	Ing. Agr. Danilo Ernesto Dardón Avila
Vocal cuarto:		Elmer Antonio Álvarez Castillo
Vocal quinto:		Miriam Eugenia Espinoza Padilla
Secretario	:	Ing. Agr. Pedro Peláez Reyes

Guatemala, Noviembre del 2,005.

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

Distinguidos 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 GENOTIPOS DE AGUACATE (*Persea americana* var. MILL) A LA MICROPROPAGACIÓN UTILIZANDO DIFERENTES COMBINACIONES DE AUXINAS Y CITOCININAS, REALIZADO EN EL LABORATORIO DE CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES.

Presentada como requisito previo a optar al título de Ingeniero Agrónomo en Sistemas de Producción Agrícola, en el grada académico de Licenciado.

Esperando que la presente investigación llene los requisitos para su aprobación, sin otro particular me suscribo de ustedes, como su atento y seguro servidor.

Atentamente,

Jose Antonio Valentin Samayoa

ACTO QUE DEDICO

A:

DIOS	Por darme la vida, fuerza, fortaleza y sabiduría para alcanzar mis metas.
MIS PADRES	Fredy Valentin Irizarry y Zoila Amparo Samayoa Rivera de Valentin como una muestra de agradecimiento a su apoyo, consejos, esfuerzos y sacrificios a lo largo de mi vida y para mi formación profesional.
MIS ABUELOS	Elena Rivera P. vda. de Samayoa. († Q.E.P.D.) Carlina Irizarry de Valentin. († Q.E.P.D.) Humberto Samayoa. († Q.E.P.D.) Severiano Valentin. († Q.E.P.D.)
MIS HERMANOS	Karylena, Freddie y Johanna. Por todo su apoyo a lo largo de mi vida.
MI ESPOSA	Mariza José Cuyún Castellanos de Valentin, por toda su comprensión, amor y apoyo.
MI HIJO	José Antonio Valentin Cuyún, por llenar de amor nuestras vidas.
MIS TIOS	En especial a Emilio Samayoa y Jorge Samayoa por su apoyo incondicional.
MIS PRIMOS Y PRIMAS	Deseándoles éxitos en su vida.
MIS CENTROS DE ESTUDIO	Universidad de San Carlos de Guatemala, Colegio La Salle, Antigua Guatemala.
MIS AMIGOS	Juan Paulo Porras, José Aspuac, Juan C. Argueta, Rene Orellana, Max Ortiz, Armando Cutz, Eduardo Taracena, Jorge Chapas, Hugo Bonelli, Mario Rodríguez, Hermer Aguirre, entre otros por el apoyo brindado a lo largo de la carrera y como muestra de mi amistad.

TESIS QUE DEDICO

A:

Mi País, Guatemala

Universidad de San Carlos de Guatemala

Facultad de agronomía

Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales

Colegio La Salle, Antigua Guatemala

AGRADECIMIENTOS

A:

ASESORES DE TESIS:

Ing. Agr. Domingo Amador, Ing. Agr.
Marco Antonio Nájera Caal († Q.E.P.D.)
por su valiosa asesoría para la realización
de dicha tesis.

MAK MILAN CRUZ SIC:

Por su apoyo, amistad y orientación durante
la realización del trabajo de tesis.

DANILO LIMA:

Por su apoyo incondicional a nivel de
campo para la realización de la presente tesis.

A TODAS AQUELLAS PERSONAS QUE NO NOMBRE PERO QUE DE UNA U OTRA FORMA
CONTRIBUYERON AL DESARROLLO DE MI VIDA PROFESIONAL Y PARA ENRIQUECER
DICHO TRABAJO DE TESIS.

INDICE GENERAL

INDICEGENERAL	viii
INDICE DE CUADROS	xi
INDICEDEFIGURAS	xiii
RESUMEN	xiv
1. INTRODUCCIÓN	1
2. DEFINICIÓN DEL PROBLEMA	3
3. MARCO TEORICO	4
3.1 MARCO CONCEPTUAL	4
3.1.1 El Cultivo del Aguacate	4
Origen del Aguacate Cultivado	4
3.1.2 Especies y variedades	4
a. <i>Persea americana</i> Mill. var. <i>drymifolia</i>	5
b. <i>Persea americana</i> Mill. var. <i>americana</i>	5
c. <i>Persea nubigena</i> L. Wms. var. <i>nubigena</i>	6
d. <i>Persea nubigena</i> L. Wms. var. <i>guatemalensis</i>	6
3.1.3 Las Razas	6
3.1.3.A Mexicana	7
3.1.3.B Guatemalensis	7
3.1.3.C Indias Occidentales	7
3.1.4 Clasificación Taxonómica del Aguacate	8
3.1.5 Sinopsis Taxonómica del género	8
3.1.6 Descripción botánica	8
3.1.7 Descripción y requerimientos agro-climáticos de los cultivares Hass (raza guatemalteca) Y Booth-8 (raza americana)	10
3.1.7.1 Cultivar HASS	10
3.1.7.2 Cultivar BOOTH-8	12
3.1.8 Cultivo de tejidos vegetales	12
3.1.8.1 Explante	13
3.1.8.2 Tamaño del explante	13
3.1.8.3 Asepsia	14
3.1.9 Medios de cultivo	15
3.1.9.1 Componentes del medio de cultivo	15
A Agua	15
B Sales inorgánicas	15
C Macronutrientes	15
D Micronutrientes	17
E Vitaminas	18
F Reguladores del crecimiento	19
a. Auxinas	20
i Uso de las auxinas en el cultivo de tejidos vegetales	20
ii Tipos de auxinas	20
iii Modo de acción de las auxinas	21
iv Respuestas fisiológicas	22
v Efectos de las auxinas en cultivos de tejidos vegetales	22
vi Ruta de biosíntesis del ácido indol-acético	23
vii Estabilidad de las auxinas en los medios de cultivo	23
b. Citocininas	23

i	Biosíntesis e las citocininas	24
ii	Lugares de síntesis y transporte	24
iii	Mecanismos de acción	25
iv	Actividad biológica	25
v	Efectos fisiológicos de las citocininas	25
vi	Efectos de las citocininas en cultivo de tejidos	26
vii	El efecto de la temperatura	26
c.	Acido giberélico	27
i	Lugares de síntesis	28
ii	Transporte	28
iii	Mecanismos de acción	28
iv	Actividad fisiológica	29
v	Efectos del ácido giberélico en cultivo de tejidos vegetales	29
d.	Acido abscísico	30
e.	Interacción de reguladores del crecimiento	30
G	Aminoácidos	31
H	Medios de soporte	31
a.	Agar	31
I	Carbón activado	31
3.1.9.2	Cualidades físicas del medio	32
3.1.9.3	pH	32
3.1.9.4	Cantidad de medio	32
3.1.10	Esterilización del medio de cultivo	33
3.1.10.1	Tiempo mínimo de autoclaveado	33
3.1.10.2	Desinfectantes comunes usados	34
3.1.11	Factores físicos del ambiente en los cultivos	34
3.1.11.1	Necesidades de luz	35
A	Intensidad lumínica	35
B	Período de iluminación	35
C	Calidad de luz	36
D	Fotoperíodo	36
3.1.11.2	Influencia de la temperatura	37
3.1.12	Historia de la micropropagación	37
3.1.13	Fases de la micropropagación	38
3.1.13.1	Asepsia del cultivo	38
3.1.13.2	Multiplicación	38
3.1.13.3	Enraizamiento de brotes y trasplante	39
3.2	MARCO REFERENCIAL	39
3.2.1	Localización del experimento	39
4.	OBJETIVOS	40
4.1	Objetivo general	40
4.2	Objetivos específicos	40
5.	HIPÓTESIS	41
6.	MATERIALES Y METODOS	42
6.1	Equipo y cristalería	42
6.2	Material vegetal	42
6.3	Desinfección del tejido vegetal en el vivero	43
6.4	Medio nutritivo	43
6.4.1	Preparación de las soluciones madres del medio MS	43

6.4.1.A	Solución madre de macronutrientes o Macro A	43
6.4.1.B	Solución madre de macronutrientes o Macro B	44
6.4.1.C	Solución madre de micronutrientes	44
6.4.1.D	Solución madre de hierro a 100X	45
6.4.1.E	Solución madre de vitaminas a 1,000X	46
6.4.1.F	Solución madre de myo-inositol a 10X	36
6.4.1.G	Preparación de los reguladores del crecimiento	47
6.4.2	Elaboración de los medios de cultivo	47
6.5	FASES O ETAPAS DE LA INVESTIGACIÓN	48
6.5.1	FASE I. Pruebas preliminares para controlar el oscurecimiento oxidativo	49
A	Descripción de los tratamientos para control de la oxidación	49
B	Variable de respuesta	50
C	Análisis de los resultados	50
6.5.2	FASE II. Inducción de brotes	50
A	Descripción de los tratamientos para la inducción de brotes	50
B	Selección del material vegetal	51
C	Traslado del material vegetal al laboratorio	52
D	Desinfección del material vegetal para la siembra <i>in vitro</i>	52
E	Siembra de los explantes dentro del medio de cultivo (Inoculación)	53
F	Incubación de los tejidos	53
G	Descripción de las unidades experimentales	53
H	Variables de respuesta	53
I	Análisis de los resultados	54
6.5.3	FASE III. Inducción de raíces	54
7.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	57
7.1	FASE I. Pruebas preliminares para controlar el oscurecimiento oxidativo	57
7.2	FASE II. Inducción de brotes	59
7.2.1	Porcentaje de sobrevivencia de explantes a la oxidación y contaminación por microorganismos en la fase II	59
7.2.1.A	Variedad Hass	59
a.	Porcentaje de explantes vivos y oxidación de explantes en el medio de cultivo	59
b.	Porcentaje de brotes obtenidos	62
b.1	Brotación obtenida a los 15 días	62
b.2	Brotación obtenida a los 30 días	62
b.3	Brotación obtenida a los 60 días	63
c.	Número de hojas por brote	65
7.2.1.B	Variedad Booth-8	66
a.	Porcentaje de explantes vivos y oxidación de explantes en el medio de cultivo	66
b.	Porcentaje de brotes obtenidos	69
b.1	Brotación obtenida a los 15 días	69
b.2	Brotación obtenida a los 30 días	69
b.3	Brotación obtenida a los 60 días	70
c.	Número de hojas por brote	72
7.3	FASE III. Inducción de raíces	74
8.	CONCLUSIONES	77
9.	RECOMENDACIONES	78
10.	BIBLIOGRAFÍA	79

INDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Interacción de Reguladores del Crecimiento	30
Cuadro 2. Tiempo mínimo requerido para esterilización de diferentes volúmenes de medio	33
Cuadro 3. Desinfectantes comúnmente usados en cultivo de tejidos de plantas	34
Cuadro 4. Componentes para elaboración de macro "A" a 10 X	43
Cuadro 5. Componentes para elaboración de macro "B" a 10 X	44
Cuadro 6. Componentes para elaboración de micro "A" a 1,000 X, micro "B" a 5,000 X y micro "C" a 1,000 X	45
Cuadro 7. Componentes para la laboración de solución de hierro a 100 X	45
Cuadro 8. Componentes para elaboración de solución de vitaminas a 1,000 X	46
Cuadro 9. Componentes para elaboración de solución de Myo-Inositol a 10 X	47
Cuadro 10. Tratamientos utilizando dos anti-oxidantes para estudiar el oscurecimiento oxidativo en los explantes de aguacate	49
Cuadro 11. Tratamientos utilizando distintas concentraciones de citocininas (BAP) y ácido Giberélico (AG3) para la inducción de brotes	51
Cuadro 12. Resultados obtenidos en el control del oscurecimiento oxidativo en explantes de Aguacate variedad HASS a los 30 días de inoculados los tejidos usando como anti-Oxidantes ácido cítrico y carbón activado a distintas concentraciones	58
Cuadro 13. Resultados obtenidos en el control del oscurecimiento oxidativo en explantes de Aguacate variedad BOOTH-8 a los 30 días de inoculados los tejidos usando como anti-oxidantes ácido cítrico y carbón activado a distintas concentraciones	59
Cuadro 14. Resultados de porcentajes de sobrevivencia a la oxidación de explantes de aguacate <i>Persea americana</i> Mill var. HASS utilizando carbón activado al 1 % a los 15 días de Inoculación en los medios	61
Cuadro 15. Respuesta del aguacate <i>Persea americana</i> Mill var. HASS a la inducción de brotes a Los 30 días de la inoculación	63
Cuadro 16. Respuesta del aguacate <i>Persea americana</i> Mill var. HASS a la inducción de brotes a los 60 días de la inoculación	64
Cuadro 17. Resultados de porcentajes de sobrevivencia a la oxidación de explantes de aguacate <i>Persea americana</i> Mill var. BOOTH-8 utilizando carbón activado al 1 % a los 15 días de inoculación en los medio.....	68

Cuadro 18. Respuesta del aguacate <i>Persea americana</i> Mill var. BOOTH-8 a la inducción de brotes a los 30 días de la inoculación	70
Cuadro 19. Respuesta del aguacate <i>Persea americana</i> Mill var. BOOTH-8 a la inducción de brotes a los 60 días de la inoculación	71

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Enraizamiento <i>in vitro</i> de un brote de aguacate <i>Persea americana</i>	56
Figura 2. En el Tratamiento 2, fue en el que se obtuvo la mejor respuesta a la brotación para la Variedad HASS	65
Figura 3. En el Tratamiento 6, fue en el que se obtuvo la mejor respuesta a la brotación para la Variedad BOOTH-8	72
Figura 4. Contaminación provocada por hongos	74
Figura 5. Presencia de raíces dentro del medio de cultivo	75
Figura 6. Limpieza del explante dentro de la campana de flujo laminar	75
Figura 7. Producción de raíces <i>in vitro</i>	76

**Respuesta de dos genotipos de
aguacate (*Persea Americana* var. Mill) a la micropropagación utilizando
diferentes combinaciones de auxinas y citocininas, realizado en el Laboratorio
de Cultivo de Tejidos Vegetales.**

**Response of two genotypes of
Avocado (*Persea Americana* var. MILL) to micropropagation using different
combinations of auxine and citocinine, carried out in the Laboratory of
Plant Tissue Culture.**

RESUMEN

El aguacate (*Persea americana* Mill), es una planta nativa del sureste de México, Guatemala y el resto de Centro América. En la actualidad Guatemala no cuenta con tecnología adecuada que permita la producción de plantas con uniformidad genética, libres de plagas y enfermedades, por lo que esta investigación pretende generar conocimientos, para encontrar así soluciones en cuánto a la propagación del aguacate.

La micropropagación es una técnica utilizada en muchas especies de importancia económica para su producción de una forma masiva, que permite conservar las características genéticas de las plantas madres.

La presente investigación se basó en observar la respuesta de dos cultivares de aguacate, siendo estos las variedades Hass y Booth-8, al cultivo *in vitro*, para lo cual se utilizó el medio nutritivo de Murashige & Skoog (MS), combinado con distintos reguladores del crecimiento, para estimular la brotación de las yemas laterales utilizadas como explantes. La investigación consistió en tres fases que fueron:

Fase I. Pruebas preliminares para controlar el oscurecimiento oxidativo, ya que este es uno de los principales problemas de las plantas leñosas, provocando la muerte de los explantes. Para la presente fase se evaluarón como antioxidantes el Carbón Activado al 0.5 %, 1.0 % y 1.5 % y el Acido Cítrico en concentraciones de 50, 100 y 150 mg/lit. A lo largo del proceso de la presente fase se obtuvo que el tratamiento que mejores resultados presentó para ambas variedades fue el que contenía Carbón Activado al 1.0 %, obteniendo un 80 % de sobrevivencia para la variedad Hass y un 90 % de sobrevivencia para la variedad Booth-8.

Fase II. Inducción de brotes. Para la presente fase se utilizó la citocina 6-bencilaminopurina (BAP) en niveles de concentración de 0.0, 0.5, 1.5 y 3.0 mg/lit así como el ácido giberélico (AG3) en concentraciones de 0.0, 0.5, 1.0 y 1.5 mg/lit. Para la variedad Hass el tratamiento donde se obtuvieron mejores resultados fue el Tratamiento que contenía 0.0 mg/lit de 6-bencilaminopurina más 0.5 mg/lit de ácido giberélico, obteniendo una respuesta del 40 % de brotación, mientras que para la variedad Booth-8 donde se obtuvieron mejores resultados fue en el Tratamiento que contenía 0.5 mg/lit de 6-bencilaminopurina más 0.5 mg/lit de +acido giberélico, obteniendo una respuesta del 50 % de brotación.

Fase III. Inducción de raíces. Esta fase no pudo llevarse a cabo de manera completa, debido a que no pudo multiplicarse el material de manera masiva, aunque si quedó demostrado que el cultivo de aguacate produce raíces *in vitro*, por lo que es importante seguir con investigaciones que nos permitan ampliar la fase de inducción de raíces en el cultivo de aguacate, para poder crear nuevas técnicas de propagación del mismo y poder ser competitivos a nivel internacional.

1. INTRODUCCIÓN

El aguacate *Persea americana* Mill, tiene como centro de origen Guatemala, algunos estados del sur-este de México y el resto de Centro América. La planta se identifica como *Persea americana* y se distinguen tres razas de acuerdo a su región fisiográfica y a características genéticas particulares. Los tipos de razas son: 1. *Persea americana* var. *drymifolia* (raza mexicana), 2. *P. Americana* Var. *americana* (raza antillana) y 3. *P. Americana* var. *guatemalensis* (raza guatemalteca) (30).

Después de que los Europeos vinieron a América, el aguacate gradualmente se diseminó en la mayor parte del mundo tropical y sub-tropical. Actualmente su consumo esta en todas las partes del mundo y en numerosas islas oceánicas en donde el clima es adecuado. Con una producción mundial total estimada en 1,700 ton. métricas, donde el nuevo mundo contribuye con mas del 75 % de la producción mundial, solo México reporta casi el 25 % del total producido. California, República Dominicana y Brasil junto con México, proporcionan la mitad de la producción mundial. En regiones tropicales húmedas, solamente la raza Antillana está bien adaptada para la temporada comercial. Para estas regiones las razas guatemaltecas son preferidas por su tolerancia y adaptabilidad a las bajas temperaturas, pero son los cultivares con germoplasma de México que prolongan la temporada de producción, además de la mayor resistencia a grandes períodos de heladas.

Según el Departamento de Cuarentena Vegetal del Ministerio de Agricultura, Ganadería y Alimentación (MAGA), se ha logrado incursionar en la exportación de aguacate a países Centroamericanos como: Costa Rica, Honduras, El Salvador y Nicaragua, mientras, que aún

Guatemala siendo centro de origen no se considera como un país con potencial económico para la exportación de aguacate.

El presente trabajo de investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales de la Facultad de Agronomía de la Universidad de San Carlos de Guatemala. El estudio consistió en tres fases, la primera fase fué la de pruebas para controlar el oscurecimiento oxidativo, utilizando como antioxidants el carbon activado y el ácido cítrico, donde obtuvimos que el tratamiento 2 que incluía carbón activado al 1.0 % fue el que controló la oxidación en ambas variedades .

La Segunda fase fué la de inducción de brotes, utilizando diferentes combinaciones de 6-bencilaminopurina y ácido giberélico, obteniendo para la variedad HASS que el tratamiento 2 que incluía 0.0 mg/lit de 6-bencilaminopurina más 0.5 mg/lit de ácido giberélico fue el que presentó mejores resultados, obteniendo un 40 % de brotación, en tanto que para la variedad BOOTH-8 el tratamiento 6 que incluía 0.5 mg/lit de 6-bencilaminopurina más 0-5 mg/lit de ácido giberélico fue el que presentó mejores resultados, obteniendo un 50 % de brotación.

La tercera fase consistió en la inducción de raíces, la cual no pudo llevarse a cabo de manera completa, ya que no se logró multiplicar el material masivamente, pero quedó demostrado que el aguacate si es una planta apta para su propagación *in vitro* ya que se logró enraizar un brote de la variedad HASS como se verá posteriormente.

2. DEFINICIÓN DEL PROBLEMA

El aguacate (*Persea americana* var. Mill) es un cultivo con amplias expectativas de comercialización tanto en el mercado local, Centroamericano y Europeo, por lo que es necesario manejar los cultivares mejorados en forma clonal, para que la diversidad genética no interfiera en el proceso de producción.

La propagación tradicional del aguacate no garantiza la sanidad de los materiales, por lo que se corre el riesgo de que se vea afectado su establecimiento en el campo como a la vez la producción a nivel comercial. Se reporta que existe dificultad para la propagación vegetativa por medio de semillas y esquejes, en éstos últimos existe el inconveniente de adaptación al sustrato, limitando de tal manera una propagación acelerada, razón por la cual se debe de buscar alternativas para solucionar dicho inconveniente.

Hasta ahora no ha sido posible tener una metodología de propagación clonal del aguacate (*Persea americana* var. Mill) que permita garantizar la pureza genética de los clones a través del tiempo y su reproducción masivamente, para poder así incorporarnos al mercado internacional y poder ser competitivos, ya que nuestro país es centro de origen del aguacate.

3. MARCO TEORICO

3.1 MARCO CONCEPTUAL

3.1.1 EL CULTIVO DEL AGUACATE

ORIGEN DEL AGUACATE CULTIVADO

3.1.2 Especies y variedades

Williams (31), piensa que todos los aguacates cultivados históricamente parten de dos especies de *Persea*: *P. americana* Mill. y *Persea nubigena* L. Wms, con dos variedades botánicas en cada una de ellas. El centro de origen de las especies a las cuales pertenecen los aguacates sería las tierras altas centrales y orientales de México hasta Guatemala. Seis especies de *Persea*, todas relacionadas con este fruto, son nativas de esta área, así como también dos híbridos considerados híbridos naturales, los cuales fueron descritos originalmente desde allí. Sólo una especie: *Persea primatogena* Williams y Molina se sabe que no ocurrió en otra área, pero se encontró en una región vecina, las montañas altas de Nicaragua.

Popenoe (1952, citado por Williams), tratando de evidenciar cuáles precursores de los aguacates cultivados se habían originado desde Honduras a Colombia, concluyó que el centro obvio de origen era el ya señalado para las especies de *Persea* y que solo dos especies ocurrían desde Honduras, pero con una cercana relación genética con las especies señaladas para México y Guatemala (31).

Las cuatro variedades, de las cuales se mencionan dos para cada especie son:

a) *Persea americana* Mill, var. *drymifolia*. Es el aguacate mexicano y el más antiguo usado como alimento por el hombre. Se usó desde antes del desarrollo de la agricultura hasta nuestros días. Hay muchas evidencias arqueológicas que muestran el uso del aguacate por el hombre primitivo americano. Se encontraron semillas fosilizadas, en estratos de cuevas, en el Valle de Tehuacán, Puebla, México, que datan de 7,000-8,000 años antes de Cristo. Hay evidencias que muestran que los antiguos habitantes de este valle, seleccionaron aguacates por su tamaño durante la prehistoria. De igual manera evidencias arqueológicas señalan un uso muy antiguo del aguacate como alimento humano, en el Valle de Oaxaca, México (22).

b) *Persea americana* Mill. var *americana*. Es el aguacate de Indias Occidentales. Su uso se extendió desde México hasta el Perú. Evidencias arqueológicas señalan la existencia de este tipo de aguacate, en Perú, desde hace 3,000 a 4,000 años. Plantas y frutos de esta antigüedad se conservaron debido a condiciones cismáticas, a lo largo de las costas de este país (31).

No obstante, se desconoce la ruta de introducción de esta planta desde México, hasta el Perú en tiempos prehistóricos, y tampoco se explica hoy cómo el aguacate de Indias Occidentales no fue reportada en la época del descubrimiento, dada la distancia tan corta entre México y Cuba, aunque se atribuye a los conquistadores españoles la introducción del aguacate en países tales como Venezuela, a partir de 1,498 (19).

Se piensa que a través de la costa norte y este de México, el aguacate fue desplazado hasta el sur de América, planteamiento sin evidencias arqueológicas, ya que el clima, con excepción del Perú, no permite la fosilización (31).

c) ***Persea nubigena* L. Wms. var. *nubigena*.** Es el ancestro silvestre del aguacate de Guatemala, el cual tiene una población relativamente homogénea, distribuida en toda la faja de la Cordillera de Talamanca en Costa Rica, población que se hace más amplia en Guatemala, donde las montañas altas son más extensas y forman bosques montañosos. También se localizan poblaciones silvestres de esta especie en las montañas altas y bosques nublados de Honduras y Nicaragua. La distribución tan amplia de formas muy silvestres de *P. nubigena*, puede haber dado lugar a una selección por tamaño, entre los pueblos, de las formas primitivas de aguacates allí encontrados (31).

d) ***Persea nubigena* L. Wms. var. *guatemalensis*.** Es el aguacate de Guatemala. Se estima como el mejor aguacate aparecido en tiempos de la preconquista de América (31), y el origen del mismo se atribuye a formas silvestres de *P. nubigena* L. Wms. var. *nubigena*, profusamente dispersas, como ya fue señalado en bosques altos, montañosos desde México hasta Guatemala.

Otras especies de aguacate explotados como cultivo son también originarios del área de Centro América; así tenemos *Persea steyennarkii* Allen, el cual se considera muy cercano a *P. nubigena*, aunque diferenciado de éste en el color del follaje y la venación de la hoja (18). Esta especie es reportada para Guatemala y El Salvador.

Persea schiediana Nees y *P. caerulea* Stand., son reportadas para Costa Rica (32).

3.1.3 Las razas

En general todas las formas cultivadas, conocidas como aguacates comerciales, son asociadas a tres razas ecológicas, que se incluyen dentro de la especie *Persea amepicana* Mill (15). Tales razas son las siguientes:

3.1.3.A Mexicana

Originada en tierras altas de México. Son caracteres de esta raza el olor a esencia de anís de las hojas, fruto pequeño que madura seis a ocho semanas después de la floración, cubierta fina, semillas más o menos alargadas y más pequeñas que la cavidad, cotiledones lisos y la pulpa tiene el más alto contenido de aceite, el cual llega hasta el 30%. Es una raza muy fuerte, resistente al frío, aunque de importancia comercial baja, excepto por su capacidad de hibridación con otras razas.

3.1.3.B Guatemalensis

Nativa de tierras altas de Centro América. Sus frutos son largos, usualmente ligeros de peso, maduran nueve a doce semanas después de la floración, se originan de un largo pedicelo, su cáscara es fina, verrugosa, quebradiza y la semilla cabe justamente en la cavidad, con sus coberturas adheridas. La pulpa tiene un mediano contenido de aceite, entre 8 y 15%. Esta raza es menos resistente al frío que la anterior.

3.1.3.C Indias Occidentales

Se originó en tierras bajas de Centro América, desde donde fue dispersada hacia América del Sur e Islas del Caribe (indias Occidentales), después del descubrimiento de América. El color de las hojas en esta raza es más brillante que en las otras, el fruto es largo, aunque varía en tamaño, en relación a la raza Guatemalensis, y se origina de pedicelos más largos; la cáscara es lisa y flexible, pero no tan fina como en la raza anterior; las semillas son largas y casi siempre más pequeñas que la cavidad; los cotiledones son jugosos; la pulpa tiene un bajo contenido de aceite, entre 3 y 10%. Es la raza más delicada, pero fue la que mejor se adaptó al trópico cálido y bajo.

3.1.4 CLASIFICACIÓN TAXONOMICA DEL AGUACATE (24)

REINO:	Vegetal.
SUB-REINO:	Embryobionta.
DIVISIÓN:	Magnoliophyta.
CLASE:	Magnoliopsida.
SUB-CLASE:	Magnolidae.
ORDEN:	Magnoliales.
FAMILIA:	Lauraceae.
GENERO:	<i>Persea</i> .
ESPECIE:	<i>americana</i> .
N. CIENTÍFICO:	<i>Persea americana</i> .
N. COMUN:	Aguacate, Avocado, Acovado pear, Avocat, etc...

3.1.5 SINOPSIS TAXONOMICA DEL GENERO *Persea*

Como ya se mencionó, *Persea*, es un género grande de las Lauráceas y presenta dificultades taxonómicas. Esto dió lugar (31), a la formación de dos subgéneros: *Persea* y *Epiodapne* ($2n=2x=24$ cromosomas), los cuales entre sí son tan distintos como otros géneros de las Lauráceas.

El tipo del género *Persea* es la especie *Persea americana* Miller, según el Diccionario Gadners, ed. 8, 1768, donde se considera la raza "West Indian" como el aguacate sobre el cual Miller la describió. No obstante, ya Linneo conocía esta planta de fruto piriforme, la había descrito y la incluyó en "Species Plantarum", 370, 1753 con el nombre de *Laurus persea* L.

3.1.6 DESCRIPCION BOTÁNICA

El aguacate es un cultivo de plantación, generalmente propagado por semillas, aunque algunos cultivares heterocigotos se propagan vegetativamente. Bajo condiciones normales una

semilla es viable de 2 a 5 semanas, luego de haber sido removida del fruto, pero puede ser almacenada, por largo tiempo, en condiciones especiales de humedad.

Una buena y rápida germinación se logra, si es removida la cáscara de la semilla; la germinación es hipógea. Las semillas se siembran en viveros, desde donde una vez alcanzado el desarrollo de plántula, 2-4 meses después, son trasplantadas al campo. El desarrollo total de la planta y la producción se alcanza entre 5-6 años, o en 3-4 años para cultivares propagados vegetativamente (15).

Las flores se forman en panículas, son bisexuales y exhiben protoginea y dicogamia sincronizadas, esto es, las flores abren el primer día cuando el pistilo es receptivo y luego cierran y abren el segundo día, cuando el grano de polen está protegido o cubierto y ya los pistilos no son receptivos (10).

Existen variaciones en los diferentes cultivares en cuanto al tiempo de apertura y cierre de las flores de tal manera, que abren en la mañana del primer día y luego abren en la tarde del segundo día o viceversa.

En cada inflorescencia se producen numerosas flores, pero son pocas las que producen frutos.

El aguacate es polinizado por insectos, y *Apis mellifera*, de la familia Apidae, es un polinizador importante, *Metabolibia singulata* y *Polistes canadensis* de la familia Vespidae, son también polinizadores frecuentes (10).

La maduración del fruto se acelera después de cosechado, pero buenas técnicas de almacenamiento pueden retardar el proceso. La pulpa del fruto maduro contiene la siguiente composición: Agua 65-80%; azúcar 1 %; proteínas 1-4%; aceite 3-30%. El aceite es similar en su composición al aceite de oliva, es rico en vitamina B, bueno en vitamina A y E, y es altamente

digerible. En general, el aguacate como fruto contiene un alto valor energético, con un promedio de 1,000 calorías por libra (15).

Productivamente el aguacate es muy importante en América Central. En otras regiones tropicales el aguacate es cultivado a escala familiar o para mercados locales. La gran producción comercial está confinada a países tales como Estados Unidos (California y Florida), Cuba, Argentina, Brasil, Sur Africa, Australia, Hawaii e Israel, siendo este último país uno de los de más reciente introducción del cultivo.

En Europa no se cultiva el aguacate, aunque sí fue conocido el fruto después del descubrimiento de América.

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

3.1.7.1 Cultivar HASS

Cultivar comercial obtenido de una rigurosa selección a partir de la raza guatemalteca. El árbol es sensible al frío, susceptible fundamentalmente en el lapso de la floración, por lo que 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) (7).

Meira mencionado por Calderón dice que este cultivar se caracteriza por la gran producción de flores, teniendo, a veces, a un cuajado de muchos frutos, los 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 (2).

El fruto es oval-piriforme, de epidermis gruesa (lo que le da mas 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 gramos, 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 los requerimientos agroclimáticos para esta variedad tenemos: (2).

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 a 6.5 (9).
2. Altura recomendada de 1,200 a 1,700 m.s.n.m., susceptibles a heladas.
3. Topografía con pendientes del 10 al 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 de riego.
7. Época de producción: de octubre a febrero.

3.1.7.2 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 (U.S.A.). Arbol vigoroso de porte abierto, los frutos aparecen en grupos, con forma oblongo-ovaladas, de tamaño pequeño a medio, con peso de 250 a 800 gramos, semilla tamaño medio y adherida a la cavidad y de la pulpa amarillenta.

Entre los requerimientos agroclimáticos para este cultivar tenemos: (2).

1. Suelos iguales a los requeridos por la variedad Hass (14).
2. Altura de 0 a 1,00 m.s.n.m.
3. Topografía hasta pendientes no mayores al 30 %.
4. Temperatura con climas calurosos de costa y boca costa.
5. Vientos: sensible a vientos fuertes.
6. Humedad: sensible al exceso de humedad, en época seca requiere de riego.
7. Época de producción: de mayo a septiembre.

3.1.8 CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES

La técnica de Cultivo de Tejidos Vegetales se define como: el cultivo de células, tejidos y/u órganos extraídos de plantas, que se mantienen bajo condiciones artificiales y permiten producir plantas que poseen todas las características de la planta madre, o sea que es una técnica de propagación vegetativa en condiciones artificiales (20,25).

El cultivo de tejidos (cultivo *in vitro*) constituye un método excelente y rápido para propagar plantas. Los medios utilizados se basan en un medio sintético de crecimiento, el cual estimula el crecimiento.

La totipotencia de una célula se define como la capacidad de desarrollar a un individuo completo, basado en que toda célula contiene la información genética necesaria para poder dar origen a un individuo completo, el cultivo de tejidos *in vitro*, se desarrollo al darle aplicación al fenómeno de la totipotencia, que forma parte de la teoría celular actual (3,13).

3.1.8.1 Explante

El explante es una parte de un tejido o de un órgano que se aísla del resto de la planta con fines de cultivo. La selección del explante puede hacerse teniendo en cuenta el sistema de propagación de la planta (28).

La elección de un explante apropiado constituye el primer paso para el establecimiento de los cultivos; en primera instancia, dicha elección esta determinada por el objeto perseguido y la especie vegetal utilizada. En el caso de especies propagadas vegetativamente, los brotes jóvenes y los ápices meristemáticos han sido generalmente la fuente de los explantes (28).

3.1.8.2 Tamaño del explante

Según Villalobos (27), el tamaño del explante no tiene mayor influencia. Solamente en el caso de que se pretenda obtener plantas libres de virus, los meristemas (sin primordios foliares) tienen

una alta probabilidad de diferenciar plantas libres de estos patógenos; sin embargo, es más fácil regenerar de ellos plantas completas.

3.1.8.3 Asepsia

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 los 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.

Es conveniente llevar a cabo los siguientes pasos para establecer cultivos asépticos: 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.

Existe una vasta gama de compuestos químicos que se pueden utilizar como desinfectantes para los explantes, pero en la actualidad se generaliza el empleo de Etanol (70 % v/v) y de Hipoclorito de Sodio (NaOCl) del 1 % al 3 % contenido en productos de uso doméstico. Con menor frecuencia se usan el Hipoclorito de Calcio [$\text{Ca}(\text{OCl})_2$, 6 % a 12 %] y el Cloruro de Mercurio (HgCl_2 , 0.1 % a 1.5 %), aunque vale la pena recalcar que este compuesto es altamente tóxico y que no es fácilmente removible del explante (11).

3.1.9 MEDIOS DE CULTIVO

Hurtado y Merino (6) y Villalobos (27) 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 han establecido cultivos para casi todas las partes de una planta en diversas especies vegetales.

Villalobos (27) indica que para el crecimiento adecuado de las plantas se necesita que las mismas tomen del suelo cantidades importantes de macronutrientes entre los que se pueden mencionar: las sales de nitrógeno, calcio, potasio, cobre, magnesio, fósforo, cobalto y molibdeno. 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 lo son las vitaminas, reguladores del crecimiento y aminoácidos.

3.1.9.1 COMPONENTES DEL MEDIO DE CULTIVO

Entre los diferentes componentes del medio de cultivo podemos mencionar los siguientes:
(6).

A Agua: De intercambio iónico o agua destilada.

B Sales inorgánicas: Aquí se encuentran los macro y micronutrientes.

C Macronutrientes: Estos son importantes en el crecimiento y desarrollo celular. Entre los macronutrientes podemos mencionar: (27).

Hidrógeno, carbono y oxígeno, además:

El Nitrógeno que se adiciona en grandes cantidades y se encuentra presente en forma de nitrato o iones de amonio o una combinación de ambos. El nitrógeno en bajas concentraciones promueve el desarrollo de callo, mientras que en altas concentraciones promueve el enraizamiento.

El Magnesio que se adiciona en forma de Sulfato de Magnesio ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) que satisface también el requerimiento de Cobre. Función: Es una parte esencial en la clorofila, es necesario en la formación del azúcar, regula la absorción de otros elementos y actúa como transportador del fósforo en la planta. Promueve la formación de aceites y grasas, y juega un papel muy importante en la translocación de los almidones.

Síntomas de deficiencia: Pérdida general del color verde, que comienza en las hojas inferiores y después se desplaza hacia el tallo, hojas con las venas verdes, los tallos débiles y las raíces largas y nudosas.

El Fósforo que se adiciona de cualquiera de las siguientes formas: Fosfato ácido de Potasio ($NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ ó KH_2PO_4), el cual es necesario para el metabolismo de las plantas.

El Potasio, que existe en grandes cantidades en la naturaleza y puede agregarse de cualquiera de las siguientes formas: Cloruro de Potasio, Nitrato de Potasio ó Fosfato ácido de Potasio (KCl , KNO_3 ó KH_2PO_4).

El Calcio puede adicionarse como: Cloruro de Calcio Dihidratado, Nitrato de Calcio ó la forma anhidra de cualquier sal [$CaCl_2 \cdot 2H_2O$ ó $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$].

El Sodio, aunque este catión no es requerido por plantas superiores, sin embargo, puede ser un elemento esencial para cultivos de halófitas o C_4 .

El Cloro que esta presente en la forma de KCl ó CaCl₂. Función: Interviene en el metabolismo de los carbohidratos, ayuda a la absorción del magnesio.

Síntomas de deficiencia: No se han presentado hasta la fecha carencias de cloro en terrenos de cultivo, aunque quizás puedan existir en suelos ligeros de zonas lluviosas alejado del mar (27).

D Micronutrientes

Según Villalobos (27), estos son necesarios debido a que son componentes de las proteínas de las células vegetales teniendo importancia a nivel metabólico y fisiológico. Entre los mas importantes podemos mencionar:

El Hierro, el cual se requiere para la formación de precursores de clorofila, se añade en forma de quelatos (fe-EDTA) ya que como sulfato se precipita y no esta disponible. Función: Es necesario para la producción de la clorofila, es un componente en las enzimas que intervienen en la respiración.

Síntomas de deficiencia: Las plantas presentan coloración que varía de verde pálido a blanco (clorosis), no se forma clorofila aún cuando el abastecimiento de nutrientes sea adecuado, los brotes nuevos son afectados y la planta presenta poco desarrollo.

El Manganeso, necesario para el mantenimiento de la ultraestructura de las células y el proceso fotosintético. Función: Acelera la germinación y maduración, aumenta el aprovechamiento del calcio, magnesio y fósforo, ayuda a la síntesis de la clorofila y en la fotosíntesis, aumenta la calidad y los rendimientos de las cosechas.

Síntomas de deficiencia: Color que varía de verde pálido a amarillo.

El Zinc, requerido para la oxidación e hidroxidación de compuestos fenólicos. Función: Es necesario en la producción de la clorofila, necesario para mantener en actividad varios sistemas enzimáticos.

Síntomas de deficiencia: Hojas pequeñas amarillas o moteadas, hojas arrossetadas.

El Cobre. Función: Es constituyente de varias enzimas de oxidación como la polifenol-oxidasa, es un activador de las enzimas nitrito-reductasa, participa en la síntesis de la clorofila.

Síntomas de deficiencia: La falta de cobre en las plantas se manifiesta en forma variable según la especie. EJEMPLO: En jiltomate las hojas del extremo apical toman un color verde-azulado. En cítricos el resto de la planta permanece de un color verde a veces más intenso del normal, mientras que en el girasol y el tabaco hay un amarillamiento de las partes más jóvenes de la planta.

El Boro, que es necesario para el mantenimiento de la actividad meristemática. Función: Mejora la calidad de los cultivos y aumenta los rendimientos, es importante en la polinización, así como en la producción de semillas.

Síntomas de deficiencia: Tallos agrietados, amarillamiento en las puntas de las hojas.

E Vitaminas

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

Las vitaminas más empleadas son, la Tiamina (Vitamina B1), que se añade como tiamina HCl, en cantidades que varían entre 0.1 a 30 mg/l, esta es realmente la única vitamina esencial para el crecimiento de células vegetales. El ácido Nicotínico (Niacina). La Piridoxina (Vitamina B6), que se añade como piridoxina-HCl. El Myo-inositol, que no es propiamente una vitamina, sino un azúcar-alcohol, tiene un efecto estimulante sobre la morfogénesis, partiendo probablemente en la vía biosintética del ácido galacturónico. El ácido Pantoténico, que ayuda al crecimiento de ciertos tejidos. El ácido Fólico, el cual disminuye la proliferación de tejido en la oscuridad, mientras que en la luz la aumenta, esto se debe a que en presencia de luz, se hidroliza a ácido P-aminobenzóico. La Riboflavina, que es un inhibidor del crecimiento de raíces. La Vitamina E ayuda a la formación de callos que provienen de embriones y en cultivos en suspensión, ayudando a la viabilidad de las células (28).

F Reguladores del Crecimiento

Las hormonas son por definición, compuestos orgánicos sintetizados por las plantas superiores, que influyen sobre el crecimiento y desarrollo; que actúan generalmente en lugares diferentes de donde son producidas y se encuentran presentes y activas en muy pequeñas cantidades. También se han desarrollado otro tipo de hormonas sintéticas que pueden tener un efecto semejante a las naturales (16).

En cultivo de tejidos se utilizan propiamente cuatro grupos que son: (28).

a. Auxinas

Las auxinas comprenden una gran familia de sustancias, que tienen en común la capacidad de producir un agrandamiento y alargamiento celular; sin embargo, se ha encontrado al mismo tiempo que promueven la división celular en el cultivo de tejidos (8). La auxina se sintetiza principalmente en los ápices de tallos y raíces, de donde migra a la zona de elongación y a otras zonas donde ejercerá su acción.

i Uso de las auxinas en el cultivo de tejidos vegetales

Las auxinas son ampliamente utilizadas en trabajos de micropropagación y son incorporadas al medio nutritivo para promover el crecimiento de callo, suspensiones celulares u órganos y para regular la morfogénesis, conjuntamente con las citocininas.

La selección de auxinas a utilizar y la concentración requerida dependerá de:

- A. El tipo de crecimiento o desarrollo requerido,
- B. Los niveles naturales de auxina dentro del explante cuando es disectado,
- C. La capacidad de los tejidos cultivados para sintetizar auxina en forma natural y
- D. La interacción (si hay) entre las auxinas sintéticas aplicadas y las hormonas endógenas naturales.

ii Tipos de Auxinas

Entre las auxinas tenemos: El AIB (ácido indolbutírico), los que se utilizan en un rango de 0.1 a 10 mg/l. El AIA (ácido indolacético), que se utiliza en un rango de 0.1 a 10 mg/l. El ANA

(ácido naftalenacético), ácido 2,4-D (ácido 2,4-Diclorofenoxiacético). El PCA (ácido paracloro fenoxiacético), que se usa en un rango de 0.001 a 10 mg/l (4).

Existen varias auxinas llamadas “ naturales” que incluyen AIA, indol-3-acetamida, ácido indol-3-carboxílico, ácido indol-3-propiónico, ácido 5-hidroxilindol-3-acético, ácido indol-3-acetilas-pártico, y otras; es probable que a medida que se realicen mas investigaciones, se descubran más sustancias de esta naturaleza. De la auxinas “ naturales”, el AIA es el compuesto de mayor uso (8).

iii Modo de acción de las auxinas

Promueven el crecimiento induciendo la secreción de iones H en y a través de la pared celular. El enlace de la auxina conduce al rompimiento y acidificación de la pared, incrementando su tamaño.

Por un efecto sobre el metabolismo del ARN (y por tanto la síntesis de proteína), posiblemente por inducción de la transcripción de moléculas de ARN mensajero específico (ARNm). Los ARNm codifican proteínas que son requeridas para mantener (sostener) el crecimiento.

Morfogénesis. Las auxinas aplicadas son capaces de borrar la fisiología programada genéticamente de tejidos de plantas completas, que fuera previamente determinada en su estado diferenciado.

iv Respuestas fisiológicas

Afectan una expansión celular como ya fue explicado, a través del aumento de la plasticidad de la pared celular. Este efecto de estimular la expansión celular se traduce en un estímulo al crecimiento, en escala macroscópica.

- a) Otras respuestas fisiológicas asociadas a las auxinas, son la síntesis del ARN que es el estímulo de la división celular que ocurre en algunas situaciones después de la aplicación de auxina exógena, contribuye al estímulo del crecimiento.
- b) El enraizamiento de estacas.
- c) La dominancia apical. Una auxina producida en el meristemo apical impone un estado de dominancia en las yemas axilares localizadas abajo del meristemo apical, inhibiendo su crecimiento. Si el meristemo apical es removido, las yemas axilares son liberadas de la dominancia y comienzan a crecer.
- d) Otros efectos más específicos, como la inducción de la floración.

v Efectos de las auxinas en cultivo de tejidos vegetales

- A. Inducción de la formación de callo.
- B. Inhibición de formación de clorofila.
- C. Morfogénesis: formación de raíz y brote.
- D. Embriogénesis somática: altos niveles de auxina 2,4-D..
- E. Cultivo de órganos. Una auxina es casi invariablemente requerida para promover el crecimiento inicial de explantes de meristemo y puntas de brotes.

vi Ruta de biosíntesis del ácido indolacético

El IAA es formado del aminoácido L-triptófano y los niveles endógenos de la auxina se incrementan rápidamente en tejidos incubados en un medio de cultivo conteniendo este aminoácido. L-triptófano, puede también actuar como una auxina en algunas plantas, en estos casos puede estimular el crecimiento o inducir morfogénesis (crecimiento de callo de híbridos de *Nicotiana glauca* X *N. Langsdorfii* y la formación de callos embriogénicos en algunos cultivares de arroz).

vii Estabilidad de las auxinas en los medios de cultivo

IAA e IBA son termolábiles y son descompuestos durante la esterilización en autoclave, pero el IAA no es estable en el medio de cultivo aún si es esterilizado por ultrafiltración.

b. Citocininas

Skoog et al (1,955), propusieron el término cinina como un nombre genérico para sustancias naturales y sintéticas que presentaban los mismos tipos de actividad biológica que la cinetina 6-furfuril-aminopurina (Miller et al., 1,956). Con el fin de evitar confusión con el término cinina, según se utiliza en los sistemas animales, un poco más tarde se adoptó la palabra citocinina para designar sustancias de división celular (8).

La función de las citocininas, es promover la división celular y la organización de callos. Entre las más utilizadas están: La BA (Benciladenina), cinetina y zeatina, en concentraciones que

van de 0.03 a 30 mg/l. La BA es la citocinina de empleo más generalizada. La cinetina estimula la formación de brotes y yemas adventicias (4).

Las citocininas producen una gran variedad de efectos en el crecimiento y desarrollo de las plantas. Además de promover división celular, interactúan con las auxinas para inducir desarrollo de raíces y de tallos en un cultivo *in vitro*. También influyen en la estimulación de la germinación, el crecimiento de algunos frutos y el retardo de la senescencia de diferentes órganos. También interactúan con las auxinas y las giberelinas para regular el crecimiento y diferenciación de plantas.

i Biosíntesis de las citocininas

Las citocininas parecen ser sintetizadas por la incorporación de una cadena lateral, generalmente con cinco carbonos en la posición N de la base nitrogenada Adenina. Esta base nitrogenada tiene la estructura idéntica a la adenina que ocurre en los ácidos nucleicos. Los diferentes tipos de citocininas difieren entre sí por la modificación de las cadenas laterales.

Las citocininas naturales son encontradas en todas las plantas superiores, en las algas y en los hongos y en ciertas bacterias por el xilema y el floema.

ii Lugares de síntesis y transporte

El meristemo apical de la raíz es el principal lugar de síntesis de las citocininas en plantas. Las citocininas son transportadas por el xilema y el floema.

iii Mecanismos de acción

A. Las hormonas, de una manera general probablemente se integran con receptores que se encuentran en la superficie de la membrana celular o en el citoplasma. Recientemente fue identificada una proteína que actúa como receptor para una citocinina a la cual se le denominó *Cytokinin binding Factor* (CBF₁)

B. Se sugiere que este receptor sea una proteína del ribosoma y que este complejo citocinina-receptor regula la síntesis de proteínas.

C. Existen indicativos de que las citocininas aumentan la concentración del calcio en el citoplasma, promoviendo su absorción del medio externo. El calcio a través de la unión con la proteína calmodulina. La calmodulina es inactiva como regulador; pero el complejo Calmodulina-Calcio puede activar un gran número de enzimas.

Las citocininas parecen estimular la síntesis de proteínas específicas del cloroplasto, estabilizando ciertos mRNAs específicos que tienen su degradación difícil.

iv Actividad biológica

Las citocininas, en cultivo de tejidos, junto con las auxinas estimulan la división celular y el control de la morfogénesis. Agregado a un medio de cultivo de brotes, estos compuestos inhiben la dominancia apical y liberan yemas laterales de la dormancia.

v Efectos fisiológicos de las citocininas

A. Retardamiento de la senescencia.

- B. Inducción de división celular y formación de órganos.
- C. Las citocininas parecen reducir la fase G1, período entre la mitosis y el inicio de la síntesis del ADN y alarga la fase G2, período entre el final de la síntesis del ADN y el inicio de la mitosis.
- D. En cultivo de tejidos, las citocininas parecen ser necesarias para la división celular en plantas. En su ausencia, la metafase, pero no la profase de la mitosis, es prolongada considerablemente y ha sido sugerido que las citocininas pueden ser requeridas para regular la síntesis de proteínas involucradas en la formación y función del huso mitótico.

vi Efectos de las citocininas en cultivo de tejidos

- A. Estimulación de la división celular.
- B. Formación de brotes adventicios.
- C. Promueve la formación de callos embriogénicos.
- D. Uso en cultivo de brotes.
- E. Proliferación de brotes axilares.
- F. Formación de yemas adventicias de brote.
- G. Inhibición de formación de raíz.

vii El efecto de la temperatura

Manteniendo los cultivos *in vitro* a temperaturas altas anormales, reduce la eficacia de las citocininas, pero puede aumentar la actividad de las auxinas.

c. Acido Giberélico

Luego de su aislamiento a partir del hongo *Giberella fujikuroi*, el ácido giberélico (AG₃) se convirtió en un tema de intensa investigación, aunque la adición de este compuesto a los medios de cultivo de tejidos ha sido ocasional a pesar de sus efectos fisiológicos tan amplios. Se sabe que hay varias giberelinas relacionadas con el AG₃, que son productos complejos del metabolismo del hongo o de plantas superiores, y que son capaces de intervenir en el crecimiento de muchas plantas, ocasionando especialmente un alargamiento celular (8).

Están presentes generalmente, en gran cantidad en las regiones de crecimiento activo como pueden ser los ápices y hojas jóvenes en expansión, lo que sugiere que este es el lugar de síntesis.

El mecanismo bioquímico por el cual las giberelinas producen sus efectos no está bien establecido, pero se piensa que estaría relacionado con la inducción de la síntesis enzimática. Por ejemplo, el AG₃ estimula la síntesis de amilasa en el endospermo de granos de cebada.

Otro efecto característico de las giberelinas, es reemplazar los requerimientos de luz para germinar en semillas fotosensibles y sustituye los requerimientos de frío o de día largo necesarios para la floración de muchas especies.

Se ha observado un incremento de las giberelinas endógenas asociado a la ruptura del período de dormancia y por otra parte se ha visto que aplicaciones de AG₃, frecuentemente, inducen la ruptura de la latencia. Un uso agrícola importante de las giberelinas es su aplicación a racimos de uva (Thompson seedles) para aumentar su tamaño.

i Lugares de síntesis

Los órganos que poseen mayores concentraciones de giberelinas son probablemente los lugares de biosíntesis. Estos incluyen semillas en germinación, endospermo, frutos inmaduros y ápices de brotes y raíces. A nivel intracelular, los plastídios son sitios de biosíntesis.

ii Transporte

Las giberelinas son encontradas en concentraciones relativamente elevadas en la savia bruta, indicando transporte eficiente de los sitios de biosíntesis en las raíces hasta la parte aérea vía xilema. Las giberelinas también son encontradas en el floema donde ocurre el transporte de las hojas hacia otras partes de la planta.

iii Mecanismos de acción

Aún no ha sido identificado un receptor para las giberelinas. El estímulo de la expansión celular observado cuando AG_3 es aplicado a hipocotilos, no es acompañado por acidificación de la pared celular, indicando un mecanismo de acción diferente al de las auxinas.

El efecto clásico de la giberelinas es la inducción de síntesis de la enzima amilasa en semillas de cereales en germinación, depende la síntesis de mRNA, indicando la giberelina al nivel de transcripción de genes específicos para la amilasa. La inhibición de la síntesis de proteínas antes de aplicar la giberelina causa también la inhibición del efecto de la hormona sobre la amilasa.

Esta evidencia sugiere que alguna proteína es sintetizada después de la aplicación de la giberelina, y que esta proteína a su vez, induce la transcripción de dos familias de genes de

amilasa y de otros genes afectados simultáneamente. En realidad un gran número de enzimas aumenta su actividad después del tratamiento de semillas con giberelinas.

iv Actividad fisiológica

Aplicado a plantas completas, las giberelinas pueden influir en el crecimiento y desarrollo en una variedad de formas (incremento de longitud de tallo, promoción de floración o inducción de amarre de frutos).

La floración en especies vegetales con hábito de crecimiento del tipo roseta, puede ser inducida por la aplicación de giberelinas.

Determinación del sexo en flores en especies monóicas. Induce la formación de flores masculinas (opuesto a auxinas y etilino).

Después de la floración ocurre el crecimiento del fruto, que normalmente depende de las hormonas producidas por las semillas en desarrollo. Los frutos partenocárpicos, (sin semillas, en función de la falta de polinización u otro impedimento), se desarrollan cuando son tratados con giberelinas. Este fenómeno es marcado en frutos como la uva, pera y tomate (maca).

v Efectos del ácido giberelico en cultivo de tejidos vegetales

- A. Formación de brotes adventicios.
- B. Rizogénesis.
- C. Embriogénesis y desarrollo de embriones.
- D. Diferenciación celular.
- E. Actividad enzimática.

F. Uso en cultivo de meristemos, brotes y nudos.

Las plántulas de algunas especies maderables pueden volverse dormantes después de ser trasplantadas al suelo y pueden retrasar su crecimiento a menos que se les someta a un período de frío o tratadas con ácido giberélico (1 mg/l por 15 horas). La biosíntesis de las giberelinas es a menudo promovida por tratamiento en frío del material vegetal.

d. Acido Abscísico

Se utiliza en casos muy especiales, estimulando la sincronización durante la embriogénesis en ciertos cultivos, además de inhibir el crecimiento (4).

e. Interacción de Reguladores del Crecimiento

En micropropagación generalmente se utilizan auxinas y citocinicas como reguladores del crecimiento. Lo mas importante, es la proporción y cantidad de las mismas, las cuales se mencionan en el cuadro 1 (25).

Cuadro 1. Interacción de Reguladores del Crecimiento

Relación para la formación o inhibición de yemas adventicias.	
Promoción	Auxinas < Citocininas
Inhibición	Auxinas > Citocininas
Relación para la formación o inhibición de raíces adventicias.	
Promoción	Auxinas < Citocininas
Inhibición	Auxinas > Citocininas
Relación para la formación o inhibición de diferenciación de callos.	
Promoción	Auxinas < Citocininas
Inhibición	Auxinas > Citocininas

G Aminoácidos

Los aminoácidos tienen importancia en la amplificación de las respuestas morfogénicas, proporcionando mayor crecimiento celular y facilitando la diferenciación en el sentido de la regeneración (23).

H Medios de soporte

a. Agar

El agar es uno de los componentes más impuros en cultivo de tejidos, es un polisacárido de algas marinas. El agar debe ser de buena calidad, la concentración usada varía de 0.6 a 1 % (de 6 a 10 g/l).

El agar impuro es constituido de polisacáridos, aminoácidos, sales, azúcar, debiendo ser lavado con agua destilada antes de ser usado. El agar es alcalino, líquido a temperatura de 80 °C y se solidifica a 40 °C.

Otros productos gelificantes como el Gelrite y Phytigel, son más puros que el agar. Proviene de fermentaciones bacterianas. Usados en la concentración de 0.2 % (2 g/l). Estos productos pueden causar vitrificación en algunas especies (23).

I Carbón Activado

Es utilizado para eliminar sustancias tóxicas producidas por el explante *in vitro*. Se usa en concentraciones de 3 g/l. El producto debe ser bastante fino. Es utilizado cuando ocurre el oscurecimiento *in vitro*, decoloración del medio de cultivo, formación de callo en la fase de

enraizamiento de propágulos, o cuando se inhibe el crecimiento del tejido. Absorbe productos provenientes del metabolismo, así como sustancias hormonales y vitaminas. Se sugiere, en algunos casos, aumentar la concentración de auxinas, en la presencia del carbón activado. La pureza de este producto es variable (23).

3.1.9.2 Cualidades físicas del medio

Las cualidades físicas del medio de cultivo, a semejanza de la composición química, pueden desempeñar un papel importante en el establecimiento de un cultivo *in vitro*. Hay especies cuyos explantes se desenvuelven mejor en medio líquido, otros en medio sólido y un tercer grupo responde mejor en medio líquido con soporte de papel filtro. En la utilización de medio sólido se debe de considerar la concentración y pureza del agente gelificante (23).

3.1.9.3 pH

El crecimiento de tejido *in vitro* es mejor en pH de 5.0. Este valor es recomendado para las formulaciones líquidas. Para medios gelificantes con agar, se recomienda un pH que debe ser ajustado a 5.8, pues en pH de 5.0 ocurre la hidrólisis de polisacáridos. En pH de 6.0 a 6.2 se verifica la precipitación de sales (23).

3.1.9.4 Cantidad de medio

Como regla general, cuánto menor es el explante, menor es la cantidad de medio a ser utilizado. Entretanto, en cultivos establecidos, la tasa de crecimiento es directamente proporcional a la cantidad de medio (23).

3.1.10 ESTERILIZACION DEL MEDIO DE CULTIVO

3.1.10.1 Tiempo mínimo de autoclaveado

Los medios de cultivo de tejidos de plantas, son generalmente esterilizados y autoclaveados a 121 °C y a 1.05 Kilogramos por centímetro cuadrado de presión.

El tiempo requerido para esterilización depende del volumen del medio en el recipiente, tal como se muestra en el cuadro 2 (21).

Cuadro 2. Tiempo mínimo requerido para esterilización de diferentes volúmenes de medio

VOLUMEN DE MEDIO POR RECIPIENTE (ml)	TIEMPO MINIMO DE AUTOCLAVEADO (minutos)
25	20
50	25
100	28
250	31
500	35
1,000	40
2,000	48
4,000	63

3.1.10.2 Desinfectantes comunes usados

La contaminación bacterial y por hongos, es detrimental en el cultivo de tejidos, los explantes son esterilizados en soluciones desinfectantes (21). En el cuadro 3 se presentan los desinfectantes comúnmente usados, con su concentración y tiempo de exposición para preservar los explantes libres de contaminación microbial.

Cuadro 3. Desinfectantes comúnmente usados en cultivo de tejidos de plantas.

DESINFECTANTE.	CONCENTRACIÓN (%)	TIEMPO DE EXPOSICIÓN (minutos)
Hipoclorito de Calcio	9 – 10	5 - 30
Hipoclorito de Sodio	0.5 – 5	5 - 30
Agua Oxigenada	3 – 12	5 - 15
Alcohol etílico	70 – 95	5 - 15
Nitrato de Plata	1	5 - 30
Cloruro de Mercurio	0.1 - 1	2 – 10

3.1.11 FACTORES FISICOS DEL AMBIENTE EN LOS CULTIVOS

Dentro de los factores más importantes del ambiente en los cultivos, tenemos lo que es la luz y la temperatura. No se tocará la humedad relativa, ya que a menudo es cercana al 100 % en los recipientes de cultivo (26).

3.1.11.1 Necesidades de luz

Los requerimientos de luz se dividen en diferentes parámetros: la potencia luminosa por unidad de superficie (o intensidad) expresada en W/m cuadrado. La duración de la iluminación expresada en horas/día y la calidad espectral de la luz recibida. En los tejidos cultivados, la fotosíntesis no es una actividad necesaria, ya que la energía es proporcionada en forma de glúcidos. Sin embargo, según observaciones, la fotosíntesis no se suprime por completo sino que sólo se reduce de manera considerable, talvez por la presencia de azúcares en el medio. Además, la luz es indispensable para regular ciertos procesos morfogénéticos, como lo comprueban numerosos estudios (26).

A Intensidad Lumínica

Algunos fracasos en los cultivos de tejidos han sido causados por usar una intensidad de luz excesiva, del orden de la que se utiliza en los fitotrones; 50 W/m², o sea, unos 10,000 lux. Por lo general, en las salas de cultivos de tejidos, las intensidades luminosas varían de 5 a 25 W/m² (1,000 a 5,000 lux) con uso muy común de 10 a 15 W/m². A menudo, en la fase 3 de la multiplicación vegetativa, se tiende a aumentar la intensidad luminosa para “ fortalecer ” y preparar a las plántulas que van a ser trasladadas al invernadero (26).

B Período de Iluminación

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

En la práctica, la mayoría de los cuartos de incubación de tejidos tienen un período de iluminación que va de 16 a 18 horas/día (26).

C Calidad de la luz

La calidad del espectro de la lámpara utilizada es de suma importancia en la iniciación de parte aérea y raíz en cultivos *in vitro*. Las lámparas recomendadas deben ser fluorescentes (blanco-frías) grolux u otros tipos de lámparas con emisiones en las regiones del rojo (430 nm) y azul (660 nm). Estas regiones del espectro influyen los procesos morfogénéticos.

La región del azul es crítica para la inducción de la parte aérea. La iniciación de raíces adventicias es estimulada por la luz roja. En cultivo de tejidos, cuando se persigue la multiplicación de plantas, las lámparas deben contener dosis adecuadas de luz azul y roja, pues ambas están involucradas en la iniciación de la parte aérea y raíz.

Las lámparas fluorescentes deben ser cambiadas cada seis meses (23).

D Fotoperíodo

Existen distintos modos en que influye el fotoperíodo en las plantas:

- a) Regulando la cantidad de energía radiante interceptada. El crecimiento de las plantas depende de la actividad fotosintética y es proporcional al tiempo de la longitud de exposición de luz natural o luz artificial.
- b) A través de mecanismos controladores por medio del cual las plantas son capaces de reconocer cambios en el medio ambiente. Por este propósito, las plantas son capaces de realizar cambios con relación a la duración de luz de cada día (fotoperíodo) (5).

3.1.11.2 Influencia de la temperatura

La temperatura de los cuartos de incubación de tejidos se regula en forma constante a una temperatura entre 22 a 25 °C. Esta práctica es criticable puesto que la temperatura real de los tejidos en el interior de los recipientes de cultivo puede ser mayor en 2 a 4 °C a la del cuarto (según mediciones hechas con termopares). En la práctica se regula la temperatura del cuarto en 2 °C por debajo de la que se desee para los tejidos cultivados. Las especies de climas templados están “ acostumbradas ” a temperaturas mas bajas que las especies tropicales. Por esta razón sería importante tener en los cuartos de incubación una temperatura del orden de 20 ± 1 grados centígrados para las primeras y del orden de 25 ± 1 grados centígrados para las segundas (26).

3.1.12 HISTORIA DE LA MICROPROPAGACION

Originalmente, la micropropagación se definió como cualquier procedimiento séptico que comprenda la manipulación en las plantas, de órganos, tejidos ó células que produzcan poblaciones de plántulas y que permitan el desvío tanto del proceso sexual normal como de la propagación vegetativa no aséptica que se practica convencionalmente. La micropropagación es prácticamente una multiplicación masiva *in vitro* (28).

La técnica de generar plantas nuevas en un medio de crecimiento artificial y bajo condiciones asépticas, se inició con investigaciones sobre fisiología vegetal. Así mismo estas investigaciones tomaron auge cuando Sacks en 1,860 y Knops en 1,861 observaron que los principales nutrientes de la planta eran compuestos orgánicos, para lo cuál prepararon una solución que contenía una

mezcla de ellos; esta mezcla se utilizó posteriormente por casi todos los investigadores que siguieron este campo de estudio (6).

Haberland mencionado por Hurtado, (6) en 1,902 aisló y cultivó tejido vegetal, utilizando asepsia, mientras que Kotte en 1,922 cultivó conjuntamente con Haberland ápices radiculares de chícharo y maíz, utilizando medio enriquecido con sales orgánicas, glucosa, peptona y varios aminoácidos. Robinson por su parte suplemento este medio agregando glucosa, agar y sales inorgánicas (6).

3.1.13 FASES DE LA MICROPROPAGACIÓN

Existen tres pasos importantes, que deben tomarse en cuenta en la micropropagación, según lo propuesto por Murashige en 1,974. Entre estos tenemos:

3.1.13.1 Asépsia del cultivo

Los medios de cultivo pueden provocar la proliferación de microorganismos en donde pueden crecer y desarrollarse compitiendo con el cultivo, es por eso que se hace necesario que todos los explantes estén debidamente limpios y desinfectados (11).

3.1.13.2 Multiplicación

En esta etapa es donde sucede la formación de nuevas células por división o por aumento en tamaño. Esta etapa está influenciada por las condiciones *in vitro* y la ganancia en peso seco y da como resultado la diferenciación de novo.

3.1.13.3 Enraizamiento de brotes y trasplante

Para que se de esta etapa, se debe trasladar el cultivo a otro medio con menos cantidad de sales inorgánicas y cambios en el balance hormonal, es decir disminuir las citocininas y aumentar las auxinas. La última etapa de la micropropagación es el período de endurecimiento o aclimatación en la cual la planta deberá colocarse en condiciones normales para su desarrollo total. Para lograr esta fase se deberá de lavar la planta y eliminar los restos del medio de cultivo que pudieran quedar en las raíces y luego sembrarlas en suelo estéril, cubriéndolas con bolsas plásticas a las cuales se le abrirán agujeros para irlas aclimatando poco a poco a su nuevo hábitat.

3.2 MARCO REFERENCIAL

3.2.1 LOCALIZACION DEL EXPERIMENTO

Este trabajo de investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales de la Facultad de Agronomía de la Universidad de San Carlos de Guatemala, el cuál se encuentra ubicado en el Edificio T-8 en el tercer nivel salón C-16, en el Campus Central de la Ciudad Universitaria Zona 12 de la Ciudad de Guatemala.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

Contribuir al desarrollo de un protocolo de propagación *in vitro* del aguacate (*Persea americana* Mill.) var. Booth-8 y Hass.

4.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

4.2.1.- Determinar la efectividad de los antioxidantes (carbón activado y ácido cítrico) para reducir el oscurecimiento oxidativo de las yemas en los medios de cultivo.

4.2.2.- Determinar las combinaciones de 6-bencilaminopurina y ácido giberélico que inducen a la brotación de las yemas de aguacate en los medios de cultivo.

4.2.3.- Determinar la dosis de ácido indol-butírico y porcentaje del medio de cultivo MS que inducen a la formación de raíces, en brotes provenientes de la fase II.

5. HIPÓTESIS

5.1 Al menos un tratamiento de antioxidantes reduce el oscurecimiento oxidativo de las yemas en los medios de cultivo.

5.2 Al menos una combinación de 6-bencilaminopurina y ácido giberélico inducirán a la brotación de las yemas de aguacate en los medios de cultivo.

5.3 Al menos una dosis de ácido indol-butírico y porcentaje del medio de cultivo MS inducirán a la formación de raíces, en brotes provenientes de la fase II.

6. MATERIALES Y METODOS

6.1 Equipo y cristalería

La cristalería y el equipo básico utilizado durante la elaboración de la presente investigación fué:

Horno de microondas, refrigerador, campana de flujo laminar, balanza analítica, microespátulas, autoclave, potenciómetro, tubos de ensayo, diversa cristalería y reactivos.

6.2 Material vegetal

El material vegetal de donde se obtuvieron los explantes para la presente investigación provenían de viveros de Sacatepéquez y Chimaltenango para la variedad Hass y de Amatitlán y Santa Lucía Cotzumalguapa para la variedad Booth-8. Los explantes utilizados fueron yemas laterales de ramas en crecimiento, seleccionando las puntas meristemáticas ya que ese es tejido joven y tiende a ser más regenerativo. La colecta de los explantes se realizó entre las 6:00 y 8:00 de la mañana, introduciéndolas en una solución de funguicidas (Benomyl al 0.15%), bactericidas (Agrimycin al 0.1%), ácido cítrico al 0.4 % y ácido ascórbico al 0.2 % para evitar la contaminación de los mismos, así como también la fenolización, tratando de reducir la oxidación.

La longitud de los explante con que se trabajó fue de aproximadamente 1 centímetro, los cuales tenían una yema cada explante con un tamaño aproximado de 2 a 4 mm.

6.3 Desinfección del tejido vegetal en el vivero

El material de donde se extrajeron los explantes se mantuvieron dentro de un ambiente controlado de plagas y enfermedades, para lo cual se hacían aplicaciones de funguicidas y bactericidas de

amplio espectro cada 15 días, además se llevaron a cabo programas de fertilización, para mantener a la planta saludable al igual que el riego dependiendo de las necesidades de las plantas.

6.4 Medio Nutritivo

El medio nutritivo basal que se utilizó en todos los experimentos realizados en este trabajo fué el medio MS descrito por Murashige & Skoog (1,962). Dicho medio además de llevar los reactivos que lo componen, se complementó con 30 gr/lit de sacarosa y 7 gr/lit de agar bacteriológico. El pH del medio se ajustó a 5.7 ya que a dicho pH disminuye en el explante la actividad de fenolización. El medio se esterilizó en el autoclave durante 25 minutos a una presión de 1.1 Kg/cm² y a una temperatura de 121 °C.

6.4.1 Preparación de las soluciones madres del medio Murashige & Skoog ó MS

Las soluciones madres para la elaboración del medio MS se llevaron a cabo en base a las soluciones concentradas de concentración conocida descritas en el cuadro 4.

6.4.1.A Solución madre de macronutrientes ó macro “A”

Se prepararon 500 ml de solución, utilizando los siguientes componentes (ver cuadro 4).

Cuadro 4. Componentes para elaboración de macro “A” a 10 X

COMPONENTES	CANTIDAD EN grs
NH ₄ NO ₃	8.25
KNO ₃	9.50
MgSO ₄ 7H ₂ O	1.85
KH ₂ PO ₄	0.85

En un beaker de 500 ml se agregaron 200 ml de agua desmineralizada autoclaveada, la cual se mantuvo en constante agitación, luego se fueron agregando uno a uno los reactivos hasta observar que todos estuvieran disueltos, dicha solución se trasladó a una probeta de 500 ml y se aforó. Seguidamente se virtió nuevamente en el beaker, se agitó y se depositó en un frasco estéril identificado, guardándolo en la refrigeradora a 4 °C hasta el momento de su uso.

6.4.1.B Solución madre de macronutrientes ó macro “B”

Se prepararon 500 ml de solución, utilizando los siguientes componentes (ver cuadro 5).

Cuadro 5. Componentes para elaboración de macro “B” a 10 X

COMPONENTE	CANTIDAD EN grs
CaCl ₂ 2H ₂ O	2.2

En un beaker de 500 ml se agregaron 200 ml de agua desmineralizada autoclaveada, la cual se mantuvo en constante agitación, luego se agregó el reactivo hasta observar que estuviera disuelto, dicha solución se trasladó a una probeta de 500 ml y se aforó. Seguidamente se virtió nuevamente en el beaker, se agitó y se depositó en un frasco estéril identificado, guardándolo en la refrigeradora a 4 °C hasta el momento de su uso.

6.4.1.C Solución madre de micronutrientes

Se prepararon 3 soluciones, cada una de 100 ml, a las cuales se les denominó Micro “A”, Micro “B” y Micro “C”, utilizando los siguientes componentes (ver cuadro 6).

Cuadro 6. Componentes para elaboración de micro "A" a 1,000 X, micro "B" a 5,000 X y micro "C" a 1,000X

COMPONENTES	CANTIDAD EN grs.
Micro "A" a 1,000X	
H ₃ BO ₃	0.62
MnSO ₄ 4H ₂ O	2.23
ZnSO ₄ 7H ₂ O	0.86
Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ O	0.025
Micro "B" a 5,000X	
CuSO ₄ 5H ₂ O	0.0125
CoCl ₂ 6H ₂ O	0.0125
Micro "C" a 1,000X	
KI	0.083

Para cada una de las soluciones se utilizó un beaker de 200 ml, agregándole 50 ml de agua desmineralizada autoclaveada, la cual se mantuvo en constante agitación, luego se agregaron los reactivos uno a uno hasta observar que estuvieran disueltos, dicha solución se trasladó a una probeta de 100 ml y se aforó. Seguidamente se vertió nuevamente en los beakers, se agitó y se depositó cada solución en un frasco estéril identificado, guardándolo en la refrigeradora a 4 °C hasta el momento de su uso.

6.4.1.D Solución madre de hierro a 100 X

Se prepararon 200 ml de solución, utilizando los siguientes componentes (ver cuadro 7).

Cuadro 7. Componentes para elaboración de solución de hierro a 100 X

COMPONENTES	CANTIDAD EN grs.
Na ₂ EDTA	0.746
FeSO ₄ 7H ₂ O	0.556

En un beaker de 250 ml se agregaron 100 ml de agua desmineralizada autoclaveada, la cual se mantuvo en constante agitación, luego se fueron agregando uno a uno los reactivos hasta observar que todos estuvieran disueltos, dicha solución se trasladó a una probeta de 250 ml y se aforó. Seguidamente se vertió nuevamente en el beaker, se agitó y se depositó en un frasco estéril identificado, guardándolo en la refrigeradora a 4 °C hasta el momento de su uso.

6.4.1.E Solución madre de vitaminas a 1,000 X

Se prepararon 100 ml de solución, utilizando los siguientes componentes (ver cuadro 8)

Cuadro 8. Componentes para elaboración de solución de vitaminas a 1,000 X

COMPONENTES	CANTIDAD EN grs.
Acido Nicotínico	0.05
Piridoxina - HCl	0.05
Thiamina - HCl	0.01
Glicina	0.2

En un beaker de 250 ml se agregaron 50 ml de agua desmineralizada autoclaveada, la cual se mantuvo en constante agitación, luego se fueron agregando uno a uno los reactivos hasta observar que todos estuvieran disueltos, dicha solución se trasladó a una probeta de 100 ml y se aforó. Seguidamente se vertió nuevamente en el beaker, se agitó y se depositó en un frasco de vidrio color ambar estéril identificado y se guardó en la refrigeradora a 4 °C.

6.4.1.F Solución madre de Myo-Inositol a 10 X

Se prepararon 500 ml de solución, utilizando el siguiente componente (ver cuadro 9).

Cuadro 9. Componentes para elaboración de solución de Myo-Inositol a 10 X

COMPONENTE	CANTIDAD EN grs.
Myo-Inositol	0.5

En un beaker de 500 ml se agregaron 200 ml de agua desmineralizada autoclaveada, la cual se mantuvo en constante agitación, luego se agregó el reactivo hasta observar que estuviera disuelto, dicha solución se trasladó a una probeta de 500 ml y se aforó. Seguidamente se vertió nuevamente en el beaker, se agitó y se depositó en un frasco de vidrio estéril identificado el cual se guardó en la refrigeradora a 4 °C para ser utilizado posteriormente.

6.4.1.G Preparación de los reguladores del crecimiento

Los reguladores del crecimiento utilizados en la presente investigación fueron: BAP (bencilaminopurina), AG₃ (ácido giberélico) e IBA (ácido indolbutírico), para lo cual se tuvieron que realizar soluciones madres de los mismos a una concentración de 250 ppm cada una.

6.4.2 Elaboración de los medios de cultivo

Dependiendo de la cantidad de medio a preparar se procedió de la siguiente manera:

En un beaker conteniendo un agitador magnético se agregó agua desmineralizada previamente autoclaveada, al momento de tener las soluciones concentradas preparadas, se extrajeron alícuotas de cada una, con el propósito de preparar una sola solución, agregando cada una en el siguiente orden:

- a. Macronutriente "A"
- b. Macronutriente "B"
- c. Micronutriente "A"

- d. Micronutriente “B”
- e. Micronutriente “C”
- f. Solución de Hierro
- g. Solución de vitaminas
- h. Myo-Inositol
- i. Reguladores del crecimiento (cantidad agregada dependiendo de la cantidad de medio a preparar y del tratamiento que se tratara)
- j. Sacarosa
- k. Antioxidante (determiando en la fase I de la presente investigación)

Luego de agregados todos los componentes al beaker y agitados, se procedió a aforar la solución para luego calibrar el pH a 5.7, utilizando hidróxido de sodio ó ácido clorhídrico, dependiendo del pH de la solución al aforarla.

Al momento de tener el pH calibrado se agregó el agar (7 gr/l) y se calentó la solución en el horno de microondas para que el mismo se disolviera y así distribuirla en las unidades experimentales que fueron frascos de vidrio de 100 ml de capacidad y posteriormente tubos de ensayo. Se taparon los frascos o tubos de ensayo con papel aluminio, se identificaron según el tratamiento al que pertenecían y luego se introdujeron al autoclave para esterilizarlos durante 25 minutos a una presión de 1.1 Kg/cm² y a una temperatura de 121 °C. Al salir del autoclave los medios de cultivo se colocaron en el cuarto de incubación para su posterior utilización.

6.5 FASES O ETAPAS DE LA INVESTIGACIÓN

El estudio comprendió de tres fases, las cuales se describen a continuación:

6.5.1 FASE I. PRUEBAS PRELIMINARES PARA CONTROLAR EL OSCURECIMIENTO OXIDATIVO

Lo que se pretendió con la implementación de esta fase fué encontrar un antioxidante, así como la dosis del mismo en el que se redujeran al máximo los niveles de oscurecimiento oxidativo de las yemas de aguacate. En la presente fase se utilizarón dos antioxidantes que fueron el carbón activado y el ácido cítrico.

A Descripción de los tratamientos para control de la oxidación

Para poder realizar la fase I y conocer la respuesta de las yemas laterales sobre el medio de cultivo para el oscurecimiento oxidativo, se utilizaron 2 tipos de antioxidantes los cuales fueron: Carbón activado en concentraciones de 0.5, 1.0 y 1.5 % y ácido cítrico en 50, 100 y 150 mg/l. Los distintos tratamientos se describen en el Cuadro 10.

Cuadro 10. Tratamientos utilizando dos diferentes anti-oxidantes para estudiar el oscurecimiento oxidativo en los explantes de aguacate.

Antioxidante.	Trat.	Concentración
Carbón Activado (%)	1	0.5
	2	1.0
	3	1.5
Acido Cítrico (mg/l)	4	50
	5	100
	6	150

Se trabajó con seis tratamientos distintos utilizando los dos antioxidantes mencionados, haciendo 10 repeticiones de cada uno, para un total de 60 unidades experimentales para cada variedad, es decir un total de 120 unidades experimentales para la fase I.

B Variable de respuesta

a) Número y porcentaje de explantes no oxidados

Luego de realizado el ensayo se hizo el conteo de los explantes que se encontraban verdes, determinando el porcentaje de los explantes no oxidados, ya que los oxidados presentaban coloraciones que iban desde café claro hasta negro, las lecturas se llevaron a cabo 15 días después de sembrados los explantes.

C Análisis de los resultados

No fue factible aplicar diseño estadístico debido a que los datos obtenidos fueron muy pocos, por lo que se utilizó estadística descriptiva, así como la elaboración de tablas para una mayor ilustración.

6.5.2 FASE II. INDUCCION DE BROTES

Después de la fase de control del oscurecimiento oxidativo, al ya haber obtenido el mejor tratamiento, se procedió a implementar la presente fase para estimular el crecimiento o inducción de brotes.

A Descripción de los tratamientos para la inducción de brotes

Se utilizó la citocinina 6-bencilaminopurina (BAP) y el ácido giberélico (AG₃) en distintas concentraciones, en el cuadro 11 pueden observarse los distintos tratamientos.

Todas las unidades experimentales de la presente fase ya tenían incluido el antioxidante que se determinó en la fase I con la dosis adecuada de carbón activado al 1.0 % para contrarrestar la oxidación de los explantes.

Cuadro 11. Tratamientos utilizando distintas concentraciones de citocininas 6-bencilaminopurina (BAP) y ácido giberelico (AG₃) para la inducción de brotes.

Tratamientos	BAP (mg/l)	AG ₃ (mg/l)	Trat/combinaciones	Código
1	0.0	0.0	0.0/0.0	A1B1
2		0.5	0.0/0.5	A1B2
3		1.0	0.0/1.0	A1B3
4		1.5	0.0/1.5	A1B4
5	0.5	0.0	0.5/0.0	A2B1
6		0.5	0.5/0.5	A2B2
7		1.0	0.5/1.0	A2B3
8		1.5	0.5/1.5	A2B4
9	1.5	0.0	1.5/0.0	A3B1
10		0.5	1.5/0.5	A3B2
11		1.0	1.5/1.0	A3B3
12		1.5	1.5/1.5	A3B4
13	3.0	0.0	3.0/0.0	A4B1
14		0.5	3.0/0.5	A4B2
15		1.0	3.0/1.0	A4B3
16		1.5	3.0/1.5	A4B4

BAP = Bencilaminopurina

AG₃ = Acido giberélico

B Selección del material vegetal

Se seleccionaron las yemas que se encontraban en crecimiento vegetativo, es decir los tejidos con ápices meristemáticos, ya que estas son mas regenerativas que el material adulto. Se seleccionaron ramas de aproximadamente 10 a 15 centímetros de longitud, las cuales al cortarlas eran lavadas con agua estéril y jabón, luego se secaban con papel mayordomo. Se introducían en una solución de fungicidas y bactericidas durante 6 horas, luego se preservaron en frío en el refrigerador a 4 °C para ser trasladados posteriormente al laboratorio. Debido al alto índice de contaminación se dejaron reposar en la solución durante 24 horas.

C Traslado del material vegetal al laboratorio

El material se trasladó al laboratorio en un frasco de vidrio el cual contenía los explantes y la solución de fungicidas y bactericidas descrita en el inciso 6.2.

D Desinfección del material vegetal para la siembra *in vitro*

Esta desinfección se llevó a cabo dentro de la campana de flujo laminar, y se realizó de la siguiente manera:

- a. Se lavó el material con agua estéril.
- b. Se lavó el material con agua y jabón.
- c. Después de lavado el material, este se puso dentro de alcohol al 70 % durante 4 minutos.
- d. Transcurrido el tiempo se sacó el material y se lavó con agua estéril.
- e. Seguidamente se introdujo en cloro al 0.50 % durante 5 minutos.
- f. Luego se sacó el material y se lavó 4 veces con agua estéril para eliminar el exceso de cloro en los explantes.
- g. Luego de lavado el material se introdujo en una solución de ácido cítrico a 100 ppm estéril aislado de la luz.
- h. Se disectaron los cortes de los explantes que tuvieron contacto directo con el alcohol y el cloro para luego dejar las yemas a utilizar a un tamaño de aproximadamente 1 centímetro de longitud, dicho procedimiento se realizó en cajas de petrí y con la ayuda de un bisturí y pinzas, todo previamente esterilizado.

E Siembra de explantes dentro del medio de cultivo (Inoculación)

La siembra de los explantes se llevó a cabo dentro de la campana de flujo laminar, desinfectándola minutos antes de iniciar el trabajo con alcohol al 70 %. Se procedió a la siembra de las yemas de un centímetro de longitud en cada unidad experimental, todo el procedimiento realizado bajo condiciones asépticas en la campana de flujo laminar.

F Incubación de los tejidos

Luego de haber realizado la inoculación de todas las unidades experimentales, las mismas se trasladaron al cuarto de incubación, el cual proporciona las condiciones adecuadas para el desarrollo de los explantes. El cuarto de incubación se encuentra a una temperatura promedio de $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$, una fuente de luz proporcionada por lámparas fluorescentes de luz blanca de aproximadamente 1,000 a 3,000 lux de intensidad, además de un fotoperíodo de 16 horas luz y 8 horas de oscuridad.

G Descripción de las unidades experimentales

Para la presente fase se utilizaron como unidades experimentales tubos de ensayo conteniendo 15 ml de medio nutritivo, el cual incluía reguladores del crecimiento así como la dosis de antioxidante encontrada en la fase I y un explante que tenía una yema por cada unidad.

H Variables de respuesta

a) Porcentaje de explantes vivos

Consistió en determinar el porcentaje de explantes que no se oxidaron y/o contaminaron, esto con relación al total de unidades experimentales con que se inició cada tratamiento. Se realizó observando cada unidad experimental.

b) Porcentaje de brotes obtenidos

Las lecturas se llevaron a cabo a los 15, 30 y 60 días después de la siembra. Se contó el número de unidades experimentales que respondieron a la brotación, relacionándolo con el número total de unidades experimentales sembradas.

c) Número de hojas por brote

La lectura se llevó a cabo a los 60 días después de la siembra. Se realizó un conteo de forma visual en cada unidad experimental.

I Análisis de los resultados

El análisis de la información se realizó de manera descriptiva, ya que no pudo aplicarse diseño estadístico, trabajando con porcentajes de las variables de respuesta, realizando tablas para una mejor ilustración.

6.5.3 FASE III. INDUCCIÓN DE RAICES

Para poder llevar a cabo la fase de enraizamiento se necesitaba tener 200 brotes para cada una de las variedades (Hass y Booth-8) ya que eran 20 tratamientos con 10 repeticiones cada uno. Al momento de querer propagar masivamente los explantes de ambas variedades, me topé con el inconveniente de la contaminación tanto de hongos como de bacterias, por lo que realice diferentes tipos de pruebas tanto en tiempo como con diferentes productos químicos para reducir la contaminación no habiendo logrado resultados favorables.

En cuanto a las pruebas que se realizaron tenemos:

1. Se preparó la solución de fungicidas y bactericidas que se utilizó al inicio de la investigación dejando el material inmerso en la solución por períodos de 4, 8, 12 y 24 horas no teniendo resultados favorables ya que en los períodos de 4, 8 y 12 horas al momento de realizar la inoculación y dejar pasar 5 días el material se contaminaba y para el período de 24 horas el material sufría daño irreversible provocando que las yemas se quemaran, no dejando así que estas pudieran brotar.

2. Debido a que la exposición de las plantas dentro de la solución de bactericidas y fungicidas no dió resultados se determinó que el hongo que estaba afectando a los explantes era *Fusarium sp.*, se utilizó el fungicida Carbendazim, el cual es específico para dicho hongo utilizando la dosis recomendada por el fabricante, se preparó la solución, la cuál se esterilizó por filtración para introducir los explantes al momento de hacer la colecta de los mismos en el invernadero, dejándolos dentro de la solución por un período de 8 horas ya que si se dejaba más tiempo el daño que se producía en las yemas era irreversible, transcurrido el tiempo se hizo el acostumbrado proceso de desinfección dentro de la campana de flujo laminar previo a la siembra, luego se inocularon las unidades experimentales y a los 5 días se observó la contaminación de las mismas.

3. Debido a que la contaminación se siguió presentando dados los dos pasos anteriores se optó por agregar antibióticos a los medios de cultivo, utilizando Tetraciclina Clorhidrato así como Rifamycin B utilizando las dosis recomendadas por los fabricantes. Se hicieron las soluciones esterilizándolas mediante filtrado y se agregó a los medios de cultivo ya que el hongo se presentó de manera endógena en el explante, así de esta manera la planta podría absorber los antibióticos directamente del medio, lo cual no dió resultados positivos ya que los medios seguían presentando una contaminación casi del 100 %.

No se logró multiplicar el material de ninguna de las variedades en forma masiva para poder llevar a cabo la presente fase, pero se obtuvo el enraizamiento de 1 brote de la variedad HASS (figura 1) lo que demuestra que el aguacate *Persea americana* si es un cultivo apto para enraizar a nivel de laboratorio.



Figura 1. Enraizamiento *in vitro* de un brote de aguacate *Persea americana* Mill var. Hass

7. RESULTADOS Y DISCUSION

7.1 FASE I. PRUEBAS PRELIMINARES PARA CONTROLAR EL OSCURECIMIENTO OXIDATIVO

Vuylsteke (29) indica que el ennegrecimiento del explante es causado por la oxidación de compuestos fenólicos, en la herida del tejido. Estos compuestos son exudados dentro del medio, son atrapados por el agar y acumulados, formando un área negra alrededor del explante. Esta puede interferir con la absorción de nutrientes, resultando una inhibición del crecimiento.

En cuanto a la oxidación las variedades de aguacate Hass y Booth-8 no son la excepción, ya que al momento de realizar las pruebas se pudo constatar que los explantes tendían a oxidarse en su totalidad dentro de los medios produciendo manchas de color café claro al inicio en el área donde se habían realizado los cortes para luego terminar necrosados y de un color negro, por lo que fue necesario hacer uso de antioxidantes para prevenir que los explantes se oxidaran en la fase I.

Los antioxidantes que se utilizaron en la presente fase fueron, carbón activado en dosis de 0.5%, 1.0% y 1.5%, así como el ácido cítrico en concentraciones de 50.0, 100.0 y 150.0 mg/lit, para ambas variedades.

De éstos dos antioxidantes trabajados, el ácido cítrico fué el que menos controló la oxidación en los explantes de ambas variedades, ya que las dosis con las que se trabajó, presentaron unos porcentajes muy bajos comparados con los del carbon activado, que fue con el que se obtuvieron los mejores resultados. En el caso de la variedad Hass se obtuvo en el ácido cítrico a 50 mg/lit un

porcentaje de sobrevivencia del 40 %, siendo este el valor mas alto a la sobrevivencia en las tres distintas dosis que se evaluaron.

El uso de carbon activado fué el que presentó los mejores resultados para la variedad HASS a una concentración de 1.0 %, ya que se obtuvo un porcentaje de sobrevivencia del 80 %, con lo que queda demostrado que ese fué el mejor tratamiento obtenido en la fase I. (ver cuadro 12)

Cuadro 12. Resultados obtenidos en el control del oscurecimiento oxidativo en explantes de aguacate variedad HASS a los 30 días de inoculados los tejidos usando como antioxidantes ácido cítrico y carbon activado a distintas concentraciones.

Antioxidante	Trat.	Concentración	Número de explantes/trat	Número de explantes vivos	Número de explantes oxidados	% de sobrevivencia
Carbón Activado (%)	1	0.5	10	6	4	60
	2	1.0	10	8	2	80
	3	1.5	10	5	5	50
Acido Cítrico (mg/lit)	4	50	10	4	6	40
	5	100	10	3	7	30
	6	150	10	2	8	20

Para el caso de la variedad Booth-8, el valor más alto de sobrevivencia en el uso de ácido cítrico se obtuvo en la dosis de 100 mg/lit, siendo este de 60 %.

El uso de carbon activado fué el que presentó los mejores resultados para la variedad BOOTH-8 a una concentración de 1.0 %, ya que el porcentaje de sobrevivencia fué del 90 %, con lo que queda demostrado que ese fué el mayor tratamiento obtenido en la fase I. (ver cuadro 13)

Cuadro 13. Resultados obtenidos en el control del oscurecimiento oxidativo en explantes de aguacate variedad BOOTH-8 a los 30 días de inoculados los tejidos usando como antioxidantes ácido cítrico y carbon activado a distintas concentraciones.

Antioxidante	Trat.	Concentración	Número de explantes/trat	Número de explantes vivos	Número de explantes oxidados	% de sobrevivencia
Carbón Activado (%)	1	0.5	10	6	4	60
	2	1.0	10	9	1	90
	3	1.5	10	6	4	60
Acido Cítrico (mg/lit)	4	50	10	4	6	40
	5	100	10	6	4	60
	6	150	10	5	5	50

7.2 FASE II. INDUCCION DE BROTES

7.2.1 Porcentaje de sobrevivencia de explantes a la oxidación y contaminación por microorganismos en la fase II.

7.2.1.A Variedad Hass

a. Porcentaje de explantes vivos y oxidación de explantes en el medio de cultivo

De acuerdo al resultado obtenido en la fase I, sobre el mejor antioxidante para ser utilizado en la fase II, se obtuvo que los explantes de la variedad Hass sobrevivían en un 80 % con el carbón activado al 1.0 %, por lo que se procedió a elaborar los medios de cultivo de la manera en que se

describió en el inciso 6.4.2, para luego poder inocular las yemas de aguacate y así determinar el porcentaje de sobrevivencia de los explantes a la oxidación, como una prueba inicial previo a montar el ensayo final de la presente fase para cada una de las variedades.

La oxidación que se observó durante esta prueba, fué de manera progresiva, iniciando en el área donde se habían realizado los cortes, tornándose de un color verde del explante a café oscuro, debido a la proliferación de fenoles, contrarrestándose en gran parte comparado con los medios que se probaron al inicio, donde todos los explantes se oxidaban. Calderón (31) concluye que los explantes de especies leñosas como el aguacate son muy susceptibles a la oxidación fenólica, lo que incide en forma negativa en el desarrollo y crecimiento de los brotes.

Los tratamientos que presentaron mayor porcentaje de oxidación fueron:

T3, incluyó combinación hormonal de 0.0 mg/l de BAP + 1.0 mg/l de AG₃ con un 40 % de oxidación,

T4, incluyó combinación hormonal de 0.0 mg/l de BAP + 1.5 mg/l de AG₃ con un 30 % de oxidación

y T6, incluyó combinación hormonal de 0.5 mg/l de BAP + 0.5 mg/l de AG₃ con un 30 % de oxidación.

Por el contrario los tratamientos que no presentaron ningún explante oxidado fueron:

T12 que incluyó combinación hormonal de 1.5 mg/l de BAP y 1.5 mg/l de AG₃

T13 que incluyó combinación hormonal de 3.0 mg/l de BAP y 0.0 mg/l de AG₃ y

T15 que incluyó combinación hormonal de 3.0 mg/l de BAP y 1.0 mg/l de AG₃.

Los tratamientos restantes presentaron algunos 10 % y otros 20 % de oxidación, la cual pudo observarse al momento de realizar la lectura a los 15 días de inoculados los explantes.

Como pudo observarse en los resultados obtenidos, puede que la concentración de los componentes contenidos en el medio de cultivo haya influido en la oxidación de los explantes.

En el cuadro 14 se presentan de manera detallada los números y porcentajes de explantes con oxidación, así como el porcentaje de sobrevivencia.

Cuadro 14. Resultados de porcentajes de sobrevivencia a la oxidación de explantes de aguacate *Persea americana* Mill var. Hass utilizando carbón activado al 1 % a los 15 días de la inoculación en los medios.

Trat.	Combinación de Reguladores (mg/l)	Número de explantes verdes	Número de explantes oxidados	% de oxidación	% de sobrevivencia
1	0.0 BAP + 0.0 AG ₃	8	2	20	80
2	0.0 BAP + 0.5 AG ₃	8	2	20	80
3	0.0 BAP + 1.0 AG ₃	6	4	40	60
4	0.0 BAP + 1.5 AG ₃	7	3	30	70
5	0.5 BAP + 0.0 AG ₃	8	2	20	80
6	0.5 BAP + 0.5 AG ₃	7	3	30	70
7	0.5 BAP + 1.0 AG ₃	8	2	20	80
8	0.5 BAP + 1.5 AG ₃	8	2	20	80
9	1.5 BAP + 0.0 AG ₃	9	1	10	90
10	1.5 BAP + 0.5 AG ₃	8	2	20	80
11	1.5 BAP + 1.0 AG ₃	9	1	10	90
12	1.5 BAP + 1.5 AG ₃	10	0	0	100
13	3.0 BAP + 0.0 AG ₃	10	0	0	100
14	3.0 BAP + 0.5 AG ₃	9	1	10	90
15	3.0 BAP + 1.0 AG ₃	10	0	0	100
16	3.0 BAP + 1.5 AG ₃	9	1	10	90

BAP = Bencilaminopurina

AG₃ = Acido giberélico

b. Porcentaje de brotes obtenidos

b.1 Brotación obtenida a los 15 días

El porcentaje de brotación que se había producido a los 15 días no pudo determinarse ya que las yemas que habían empezado a responder se encontraban muy pequeñas todavía por lo que se dejó pasar el tiempo para hacer otra lectura a los 30 días de inoculados los explantes.

b.2 Brotación obtenida a los 30 días

El porcentaje de brotación que se obtuvo a los 30 días de inoculados los explantes se observó que los tratamientos que mejor respondieron fueron los siguientes:

Tratamiento 2 (0.0 mg/lit de BAP + 0.5 mg/lit de AG_3) con 30 % de brotación,

Tratamiento 3 (0.0 mg/lit de BAP + 1.0 mg/lit de AG_3) con 20 % de brotación,

Tratamiento 13 (3.0 mg/lit de BAP + 0.0 mg/lit de AG_3) con 20 % de brotación y

En el resto de los tratamientos la respuesta fue nula en algunos casos, mientras que en otros la respuesta fué muy escasa, obteniendo un 10 % como máximo de respuesta.

En el cuadro 15 se observa de manera detallada la respuesta a la brotación de los explantes a los 30 días de inoculados, en cada uno de los tratamientos.

Cuadro 15. Respuesta del aguacate *Persea americana* Mill var. Hass a la inducción de brotes a los 30 días de la inoculación

Tratamiento	Combinación de reguladores (mg/l)	Explantos con brotación	Explantos sin brotación	% de explantes con brotación	% de explantes sin brotación
1	0.0 BAP+0.0 AG ₃	0	10	0	100
2	0.0 BAP+0.5 AG ₃	3	7	30	70
3	0.0 BAP+1.0 AG ₃	2	8	20	80
4	0.0 BAP+1.5 AG ₃	0	10	0	100
5	0.5 BAP+0.0 AG ₃	0	10	0	100
6	0.5 BAP+0.5 AG ₃	1	9	10	90
7	0.5 BAP+1.0 AG ₃	1	9	10	90
8	0.5 BAP+1.5 AG ₃	0	10	0	100
9	1.5 BAP+0.0 AG ₃	1	9	10	90
10	1.5 BAP+0.5 AG ₃	0	10	0	100
11	1.5 BAP+1.0 AG ₃	1	9	10	90
12	1.5 BAP+1.5 AG ₃	1	9	10	90
13	3.0 BAP+0.0 AG ₃	2	8	20	80
14	3.0 BAP+0.5 AG ₃	1	9	10	90
15	3.0 BAP+1.0 AG ₃	0	10	0	100
16	3.0 BAP+1.5 AG ₃	1	9	10	90

BAP = Bencilaminopurina

AG₃ = Acido giberélico

b.3 Brotación obtenida a los 60 días

A los 60 días de inoculados los explantes, el tratamiento que más porcentaje de brotación obtuvo fue el tratamiento 2 (0.0 BAP+0.5 AG₃) con un 40 % de brotación, seguido de los tratamientos 3 (0.0BAP+0.5 AG₃), 13 (3.0 BAP+0.0 AG₃) y 14 (3.0 BAP+0.5 AG₃) los tres con un 20 % de brotación.

En el cuadro 16 se presentan de forma detallada cada uno de los tratamientos así como sus respectivos porcentajes de brotación y/o porcentajes de no brotación, en donde se pudo observar que en cuanto a la combinación de las dosis de los reguladores utilizados para la inducción de

brotos, la que más porcentaje de brotación presentó fue la combinación del tratamiento 2 (0.0 mg/l de BAP + 0.5 mg /l de AG₃), lo que sugiere que el uso de ácido giberélico en bajas concentraciones sin combinarlo con auxinas, promueve de manera mas eficiente la brotación de las yemas de aguacate *Persea americana* var. Hass.

Por el contrario, aplicaciones de BAP combinado con AG₃ en altas concentraciones se pudo observar que la brotación fue escasa o no hubo ninguna respuesta como en el caso de los tratamientos 15 (3.0 BAP+1.0 AG₃) donde el porcentaje de brotación fue de 0 % y el tratamiento 16 (3.0 BAP+1.0 AG₃) que presentó un 10 % de brotación.

Cuadro 16. Respuesta del aguacate *Persea americana* Mill var. Hass a la inducción de brotes a los 60 días de la inoculación

Tratamiento	Combinación de reguladores (mg/l)	Explantos Con brotación	Explantos sin brotación	% de expla con brota	% de explantes sin brotación
1	0.0 BAP+0.0 AG ₃	0	10	10	100
2	0.0 BAP+0.5 AG₃	4	6	40	60
3	0.0 BAP+1.0 AG ₃	2	8	20	80
4	0.0 BAP+1.5 AG ₃	0	10	0	100
5	0.5 BAP+0.0 AG ₃	0	10	0	100
6	0.5 BAP+0.5 AG ₃	1	9	10	90
7	0.5 BAP+1.0 AG ₃	1	9	10	90
8	0.5 BAP+1.5 AG ₃	0	10	0	100
9	1.5 BAP+0.0 AG ₃	1	9	10	90
10	1.5 BAP+0.5 AG ₃	0	10	0	100
11	1.5 BAP+1.0 AG ₃	1	9	10	90
12	1.5 BAP+1.5 AG ₃	1	9	10	90
13	3.0 BAP+0.0 AG ₃	2	8	20	80
14	3.0 BAP+0.5 AG ₃	2	8	20	80
15	3.0 BAP+1.0 AG ₃	0	10	0	100
16	3.0 BAP+1.5 AG ₃	1	9	10	90

BAP = Bencilaminopurina

AG₃ = Acido giberélico

En la figura 2 se muestra la respuesta de los explantes de la variedad HASS al mejor tratamiento en la fase II.



Figura 2. En el Tratamiento 2, fue en el que se obtuvo la mejor respuesta a la brotación como se observa en la fotografía.

c. Número de hojas por brote

En cuánto al número de hojas por brote, se realizó un conteo individual de cada unidad experimental que respondió a la brotación con el fin de poder determinar en cual de los tratamientos fue donde se obtuvo el mayor número de hojas por explante, obteniendo los resultados siguientes:

En el Tratamiento 2 (0.0 BAP+0.5 AG₃) se obtuvieron 4 brotes con 10, 10 9 y 7 hojas respectivamente.

En el Tratamiento 3 (0.0 BAP+1.0 AG₃) se obtuvieron 2 brotes con 6 hojas cada uno.

En el Tratamiento 6 (0.5 BAP+0.5 AG₃) se obtuvo 1 brote con 4 hojas.

En el Tratamiento 7 (0.5 BAP+1.0 AG₃) se obtuvo 1 brote con 2 hojas.

En el Tratamiento 9 (1.5 BAP+0.0 AG₃) se obtuvo 1 brote con 5 hojas.

En el Tratamiento 11 (1.5 BAP+1.0 AG₃) se obtuvo brote con 3 hojas.

En el Tratamiento 12 (1.5 BAP+1.5 AG₃) se obtuvo 1 brote con 2 hojas.

En el Tratamiento 13 (3.0 BAP+0.0 AG₃) se obtuvieron 2 brotes con 3 y 6 hojas respectivamente.

En el Tratamiento 14 (3.0 BAP+0.5 AG₃) se obtuvieron 2 brotes con 5 y 6 hojas respectivamente.

En el Tratamiento 16 (3.0 BAP+1.5 AG₃) se obtuvo 1 brote con 2 hojas.

Como puede observarse el Tratamiento 2 (0.0 BAP+0.5 AG₃) fué el que mejor respondió a la brotación, de la misma manera fue en el que se obtuvo el mayor número de hojas por brote, lo que deja de manera más clara que el uso del ácido giberélico (AG₃) en bajas concentraciones en el aguacate variedad Hass estimula de manera mas eficiente la respuesta de los explantes, desarrollándose de mejor forma.

7.2.1.B Variedad Booth-8

a. Porcentaje de explantes vivos y oxidación de explantes en el medio de cultivo

De acuerdo al resultado obtenido en la fase I, sobre el mejor antioxidante para ser utilizado en la fase II, se obtuvo que los explantes de la variedad Booth-8 sobrevivieron en un 90 % con el carbón activado al 1.0 %, por lo que se procedió a elaborar los medios de cultivo de la manera en que se describió en el inciso 6.4.2, para luego poder inocular las yemas de aguacate y así determinar el porcentaje de sobrevivencia de los explantes a la oxidación.

La oxidación que se observó durante esta prueba, fué de manera progresiva, iniciando en el área donde se habían realizado los cortes, tornándose de un color verde del explante a café oscuro, debido a la proliferación de fenoles, contrarrestándose en gran parte comparado con los medios que se probaron al inicio, donde todos los explantes se oxidaban. Calderón (31) concluye que los explantes de especies leñosas como el aguacate son muy susceptibles a la oxidación fenólica, lo que incide en forma negativa en el desarrollo y crecimiento de los brotes.

Los tratamientos que presentaron mayor porcentaje de oxidación fueron:

T4 incluyó combinación hormonal de 0.0 mg/l de BAP + 1.5 mg/l de AG₃ con un 20 % de oxidación,
T5 incluyó combinación hormonal de 0.5 mg/l de BAP + 0.0 mg/l de AG₃ con un 20 % de oxidación,
T7 incluyó combinación hormonal de 0.5 mg/l de BAP + 1.0 mg/l de AG₃ con un 20 % de oxidación
T11 incluyó combinación hormonal de 1.5 mg/l de BAP + 1.0 mg/l de AG₃ con un 30 % de oxidación.

Por el contrario los tratamientos que no presentaron ningún explante oxidado fueron:

T3 que incluyó combinación hormonal de 0.0 mg/l de BAP + 1.0 mg/l de AG₃,
T8 que incluyó combinación hormonal de 0.5 mg/l de BAP + 1.5 mg/l de AG₃,
T9 que incluyó combinación hormonal de 1.0 mg/l de BAP + 0.0 mg/l de AG₃,
T10 que incluyó combinación hormonal de 1.0 mg/l de BAP + 0.5 mg/l de AG₃,
T12 que incluyó combinación hormonal de 1.5 mg/l de BAP + 1.5 mg/l de AG₃,
T15 que incluyó combinación hormonal de 3.0 mg/l de BAP + 1.0 mg/l de AG₃ y
T16 que incluyó combinación hormonal de 3.0 mg/l de BAP + 1.5 mg/l de AG₃

Los tratamientos restantes presentaron 10 % de oxidación, la cual pudo observarse al momento de realizar la lectura a los 15 días de inoculados los explantes. Como pudo

observarse en los resultados obtenidos, puede que la concentración de los componentes contenidos en el medio de cultivo haya influido en la oxidación de los explantes, ya que cada variedad responde de distinta manera.

En el cuadro 17 se presentan de manera detallada los números y porcentajes de explantes con oxidación, así como porcentaje de sobrevivencia.

Cuadro 17. Resultados de porcentajes de sobrevivencia a la oxidación de explantes de aguacate *Persea americana* Mill var. Booth-8 utilizando carbón activado al 1 % a los 15 días de la inoculación en los medios.

Trat.	Combinación de Reguladores (mg/l)	Número de explantes verdes	Número de explantes oxidados	% de oxidación	% de sobrevivencia
1	0.0 BAP + 0.0 AG ₃	9	1	10	90
2	0.0 BAP + 0.5 AG ₃	9	1	10	90
3	0.0 BAP + 1.0 AG ₃	10	0	0	100
4	0.0 BAP + 1.5 AG ₃	8	2	20	80
5	0.5 BAP + 0.0 AG ₃	8	2	20	80
6	0.5 BAP + 0.5 AG ₃	9	1	10	90
7	0.5 BAP + 1.0 AG ₃	8	2	20	80
8	0.5 BAP + 1.5 AG ₃	10	0	0	100
9	1.5 BAP + 0.0 AG ₃	10	0	0	100
10	1.5 BAP + 0.5 AG ₃	10	0	0	100
11	1.5 BAP + 1.0 AG ₃	7	3	30	70
12	1.5 BAP + 1.5 AG ₃	10	0	0	100
13	3.0 BAP + 0.0 AG ₃	9	1	10	90
14	3.0 BAP + 0.5 AG ₃	9	1	10	90
15	3.0 BAP + 1.0 AG ₃	10	0	0	100
16	3.0 BAP + 1.5 AG ₃	10	0	0	100

b. Porcentaje de brotes obtenidos**b.1 Brotación obtenida a los 15 días**

El porcentaje de brotación obtenido a los 15 días no pudo determinarse ya que las yemas que habían empezado a responder se encontraban muy pequeñas todavía por lo que se dejó pasar el tiempo para hacer otra lectura a los 30 días de inoculados los explantes.

b.2 Brotación obtenida a los 30 días

El porcentaje de brotación que se obtuvo a los 30 días de inoculados los explantes se observó que los tratamientos que mejor respondieron fueron los siguientes:

Tratamiento 3 (0.0 mg/lit de BAP + 1.0 mg/lit de AG₃) con 20 % de brotación,

Tratamiento 4 (0.0 mg/lit de BAP + 1.5 mg/lit de AG₃) con 20 % de brotación,

Tratamiento 5 (0.5 mg/lit de BAP + 0.0 mg/lit de AG₃) con 20 % de brotación y

Tratamiento 6 (0.5 mg/lit de BAP + 0.5 mg/lit de AG₃) con 30 % de brotación.

En el resto de los tratamientos la respuesta fue nula en algunos casos, mientras que en otros la respuesta fué muy escasa, obteniendo un 10 % como máximo de respuesta.

En el cuadro 18 se observa de manera detallada la respuesta a la brotación de los explantes a los 30 días de inoculados, en cada uno de los tratamientos.

Cuadro 18. Respuesta del aguacate *Persea americana* Mill var. Booth-8 a la inducción de brotes a los 30 días de la inoculación

Tratamiento	Combinación de reguladores (mg/l)	Explantos con brotación	Explantos sin brotación	% de explantes con brotación	% de explantes sin brotación
1	0.0 BAP+0.0 AG3	0	10	0	100
2	0.0 BAP+0.5 AG3	1	9	10	90
3	0.0 BAP+1.0 AG3	2	8	20	80
4	0.0 BAP+1.5 AG3	2	8	20	80
5	0.5 BAP+0.0 AG3	2	8	20	80
6	0.5 BAP+0.5 AG3	3	7	30	70
7	0.5 BAP+1.0 AG3	1	9	10	90
8	0.5 BAP+1.5 AG3	0	10	0	100
9	1.5 BAP+0.0 AG3	0	10	0	100
10	1.5 BAP+0.5 AG3	1	9	10	90
11	1.5 BAP+1.0 AG3	1	9	10	90
12	1.5 BAP+1.5 AG3	1	9	10	90
13	3.0 BAP+0.0 AG3	0	10	0	100
14	3.0 BAP+0.5 AG3	1	9	10	90
15	3.0 BAP+1.0 AG3	1	9	10	90
16	3.0 BAP+1.5 AG3	0	10	0	100

BAP = Bencilaminopurina

AG₃ = Acido giberélico

b.3 Brotación obtenida a los 60 días

A los 60 días de inoculados los explantes, el tratamiento que más porcentaje de brotación produjo fué el tratamiento 6 (0.5 BAP+0.5 AG₃) con un 50 % de brotación, seguido de los tratamientos 4 (0.0 BAP+1.5 AG₃) y 5 (0.5 BAP+0.0 AG₃), ambos con un 30 % de brotación.

En el cuadro 19 se presentan de forma detallada cada uno de los tratamientos así como sus respectivos porcentajes de brotación y/o porcentajes de no brotación, en donde se pudo observar que en cuanto a la combinación de las dosis de los reguladores utilizados para la inducción de brotes, la que más porcentaje de brotación presentó fue la combinación del tratamiento 6 (0.5 mg/l de BAP + 0.5 mg /l de AG₃), lo que sugiere que el uso de la bencil-aminopurina en bajas

concentraciones combinado con el ácido giberélico en bajas concentraciones, promueve de manera mas eficiente la brotación de las yemas de aguacate *Persea americana* var. Booth-8.

Por el contrario, aplicaciones de BAP combinado con AG₃ en altas concentraciones se pudo observar que la brotación fue escasa como en el caso de los tratamientos 15 (3.0 BAP+1.0 AG₃) donde el porcentaje de brotación fue de 10 % y el tratamiento 16 (3.0 BAP+1.5 AG₃) que presentó un 10 % de brotación.

Cuadro 19. Respuesta del aguacate *Persea americana* Mill var. Booth-8 a la inducción de brotes a los 60 días de la inoculación

Tratamiento	Combinación de reguladores (mg/l)	Explantos con brotación	Explantos sin brotación	% de explantos con brotación	% de explantos sin brotación
1	0.0 BAP+0.0 AG ₃	0	10	0	100
2	0.0 BAP+0.5 AG ₃	1	9	10	90
3	0.0 BAP+1.0 AG ₃	2	8	20	80
4	0.0 BAP+1.5 AG ₃	3	7	30	70
5	0.5 BAP+0.0 AG ₃	3	7	30	70
6	0.5 BAP+0.5 AG ₃	5	5	50	50
7	0.5 BAP+1.0 AG ₃	1	9	10	90
8	0.5 BAP+1.5 AG ₃	2	8	20	80
9	1.5 BAP+0.0 AG ₃	0	10	0	100
10	1.5 BAP+0.5 AG ₃	1	9	10	90
11	1.5 BAP+1.0 AG ₃	1	9	10	90
12	1.5 BAP+1.5 AG ₃	1	9	10	90
13	3.0 BAP+0.0 AG ₃	0	10	0	100
14	3.0 BAP+0.5 AG ₃	1	9	10	90
15	3.0 BAP+1.0 AG ₃	1	9	10	90
16	3.0 BAP+1.5 AG ₃	1	9	10	90

BAP = Bencilaminopurina
AG₃ = Acido giberélico

En la figura 3 se muestra la respuesta de los explantes de la variedad BOOTH-8 al mejor tratamiento en la fase II.



Figura 3. En el Tratamiento 6, fue en el que se obtuvo la mejor respuesta a la brotación como se observa en la fotografía.

c. Número de hojas por brote

En cuanto al número de hojas por brote, se realizó un conteo individual de cada unidad experimental que respondió a la brotación con el fin de poder determinar en cual de los

tratamientos fue donde se obtuvo el mayor número de hojas por explante, obteniendo los resultados siguientes:

En el Tratamiento 2 (0.0 BAP+0.5 AG₃) se obtuvo 1 brote con 2 hojas.

En el Tratamiento 3 (0.0 BAP+1.0 AG₃) se obtuvieron 2 brotes con 5 y 3 hojas respectivamente.

En el Tratamiento 4 (0.0 BAP+1.5 AG₃) se obtuvieron 3 brotes con 2 hojas cada uno.

En el Tratamiento 5 (0.5 BAP+0.0 AG₃) se obtuvieron 3 brotes con 3, 4 y 6 hojas respectivamente.

En el Tratamiento 6 (0.5 BAP+0.5 AG₃) se obtuvieron 5 brotes con 3, 4, 5, 5 y 7 hojas respectivamente.

En el Tratamiento 7 (0.5 BAP+1.0 AG₃) se obtuvo 1 brote con 3 hojas.

En el Tratamiento 8 (0.5 BAP+1.5 AG₃) se obtuvieron 2 brotes con 2 hojas cada uno.

En el Tratamiento 10 (1.5 BAP+0.5 AG₃) se obtuvo 1 brote con 3 hojas.

En el Tratamiento 11 (1.5 BAP+1.0 AG₃) se obtuvo 1 brote con 3 hojas.

En el Tratamiento 12 (1.5 BAP+1.5 AG₃) se obtuvo 1 brote con 5 hojas.

En el Tratamiento 14 (3.0 BAP+0.5 AG₃) se obtuvo 1 brote con 1 hoja.

En el Tratamiento 15 (3.0 BAP+1.0 AG₃) se obtuvo 1 brote con 4 hojas.

En el Tratamiento 16 (3.0 BAP+1.5 AG₃) se obtuvo 1 brote con 7 hojas.

Como puede observarse el Tratamiento 6 (0.5 BAP+0.5 AG₃) fué el que mejor respondió a la brotación, de la misma manera fue en el que se obtuvo el mayor número de hojas por brote, lo que deja de manera más clara que el uso de la bencil-aminopurina (BAP) en bajas concentraciones combinado con el ácido giberélico (AG₃) en bajas concentraciones en el aguacate variedad Booth-8 estimula de manera mas eficiente la respuesta de los explantes, desarrollándose de mejor forma.

7.3 FASE III. INDUCCION DE RAICES

La presente fase no pudo llevarse a cabo debido a que el material no logró propagarse de manera masiva como se esperaba, pero queda demostrado que el aguacate es un cultivo apto para reproducirse *in vitro*, ya que se obtuvo un brote con raíces, por lo que deben llevarse a cabo más investigaciones para poder propagarlo en forma vegetativa e inducirle raíces a los brotes obtenidos (ver figura 4).



Figura 4. Contaminación provocada por hongos luego de: **a.** Uso de solución de fungicidas y bactericidas durante 12 horas. **b.** Uso de Carbendazim durante 8 horas y **c.** Agregar antibióticos directamente en los medios de cultivo.

La figura 5 muestra el explante de aguacate variedad Hass con sus raíces dentro del medio de cultivo MS.



Figura 5. Presencia de raíces de la variedad HASS dentro del medio de cultivo.

La figura 6 muestra el momento en el que se está sacando el explante del tubo de ensayo para poder hacer el conteo de las raíces y la toma de fotografías de las mismas, todo este proceso se llevó a cabo dentro de la campana de flujo laminar, para evitar así la contaminación del explante.



Figura 6. Limpieza del explante dentro de la campana de flujo laminar.

En la figura 7 se pueden apreciar las raíces producidas por el explante, luego de haberle retirado la mayor parte del medio nutritivo, lo que demuestra que el aguacate puede ser reproducido *in vitro*, ya que este induce a la brotación así como la producción de raíces.



Figura 7. Producción de raíces de aguacate variedad HASS *in vitro*.

8. CONCLUSIONES

1. Los explantes provenientes de plantas leñosas como el aguacate, son muy susceptibles a la oxidación, obteniendo después de las pruebas que el carbón activado a una concentración de 1.0 % fué el antioxidante que contrarrestó de manera más efectiva la oxidación de los explantes, presentando un 80 % de sobrevivencia para la variedad Hass y un 90 % de sobrevivencia para la variedad Booth-8.
2. La combinación de 0.0 6-bencilaminopurina mg/lt + 0.5 mg/lt ácido giberélico fué el que presentó mejores resultados en cuánto a la brotación así como en el número de hojas por brote para la variedad Hass, teniendo un 40 % de respuesta. Para la variedad Booth-8 la mejor combinación fué 0.5 6-bencilaminopurina mg/lt + 0.5 mg/lt ácido giberélico, ya que se obtuvo un 50 % de respuesta así como mayor número de hojas por brote.
3. La contaminación que se presentó al momento de propagar masivamente el material, se debió a que tanto los hongos como las bacterias se encontraban de manera endógena en los explantes dificultando así su propagación.
4. Los pasos a seguir para el establecimiento del cultivo *in vitro* de aguacate (*Persea americana*) var. HASS y BOOTH-8 son: Preparación de los medios de cultivo con antioxidantes y reguladores del crecimiento, esterilización de los medios de cultivo, colecta del material vegetal en el campo, lavado del material, uso de solución de funguicidas y bactericidas, traslado al laboratorio, desinfección de la campana de flujo laminar, proceso de lavado y desinfección de los explantes dentro de la campana de flujo laminar, inoculación y por último incubación de las unidades experimentales.

9. RECOMENDACIONES

1. La dosis de carbón activado al 1.0 % redujo de manera significativa en un 80 % la oxidación, por lo que en estudios futuros deberán realizarse pruebas con dosis cercanas al 1.0 % para tratar de controlar en un 100 % la oxidación del aguacate.
2. Evaluar en investigaciones futuras otros medios de cultivo con el fin de determinar si alguno podría ser mas efectivo que el MS.
3. Realizar estudios a nivel de laboratorio, basándose en los tratamientos que presentaron los mejores resultados para cada una de las variedades, evaluando así rangos más cercanos a los valores obtenidos en la presente investigación para poder obtener mayor número de brotes.
4. Efectuar investigaciones sobre inducción de enraizamiento del aguacate *Persea americana* ya que aunque no se logró montar dicha fase en la presente investigación se ha comprobado que los explantes de aguacate sí producen raíces *in vitro*.

10. BIBLIOGRAFÍA

1. Bidwell R, GS. 1979. Fisiología vegetal. Trad. por Guadalupe Cano. México, AGT. 722 p.
2. Calderón Estrada, JR. 2000. Respuesta de dos cultivares de aguacate *Persea americana* Mill. var. Guatemalensis var. Hass y var. Americana var. Booth-8 al cultivo de tejidos *in vitro*. Tesis Ing. Agr. Guatemala, USAC. 69 p.
3. Doods, JH; Lorin,WR. 1985. Experiments in plant tissue culture. 2 ed. New York, US, Cambridge University Press. 232 p.
4. Fundamentos teórico-prácticos del cultivo de tejidos vegetales. 1990. Ed. por CH. Rossel; VM. Villalobos. Roma, FAO. p. 105. (Producción y protección forestal.)
5. George, EF. 1993. Plant propagation by tissue culture. 2 ed. US, Exegeties. 1,574 p.
6. Hurtado, SM; Merino, ME. 1987. Cultivo de tejidos vegetales. México, Trillas. p. 227-970.
7. Janick, J; Moore, JN. 1975. Advances in fruit breeding; sub-tropical fruits. Indiana, US, Purdue University Press. p. 23.
8. Krikorian, AD. 1989. Medios de cultivo: generalidades, composición y preparación. *In* Cultivo de tejidos en la agricultura, fundamentos y aplicaciones. Ed. William Roca; Luis A. Mroginski. Colombia, CIAT. p. 41-70.
9. Litz, RE. 1999. *In vitro* conservation of *Persea*. Florida, US, Agricultural Experiment Station Journal Series no. R-06366. p. 16.
10. Minas K, P. 1976. Some aspects of the flower behavior, pollination and fruit set of avocado (*Persea americana*). California Avocado Society Yearbook. p. 106-153.
11. Mroginski, LA; Roca, WM. 1991. Establecimiento de cultivos de tejidos vegetales *in vitro*. *In* Cultivo de tejidos en la agricultura; fundamentos y aplicaciones. Ed. William Roca; Luis A. Mroginski. Colombia, CIAT. p. 19-40.
12. Orozco, C. 1996. Cultivo de tejidos y su aplicación en agricultura. *In* Simposio Nacional sobre Cultivo de Tejidos Vegetales (1.,1996, Guatemala). Guatemala, Instituto de Ciencia y Tecnología Agrícolas. p. 45.
13. Perea, M; Navarro, AW. 1988. Técnicas *in vitro*. Costa Rica, Universidad Nacional Costa Rica. 105 p.
14. PROFRUTA (Proyecto Desarrollo de la Fruticultura y Agroindustria, GT). 1997. Aguacates variedad Hass y Booth-8: la alternativa rentable de la nueva producción de aguacate. Guatemala. 5 p.
15. Purseglove, JW. 1979. Tropical crops dicotyledons. London, England, Loongman. p. 192-198.

16. Ruiz, D. 1996. Forma de preparación de medios de cultivo Murashige & Skoog. San Pedro Sula, Honduras, Fondo Hondureño de Investigación Agrícola. 25 p.
17. Sauls, JW; Phillip, RL; Jackson, LK. 1976. First international tropical fruit: short course. The Avocado. p. 17.
18. Schieber, E; Zentmyer, GA. 1978. Hunting for *Persea steyermarkii* in the mountains of Guatemala. California Avocado Society Yearbook. p. 67-71.
19. Serpa, D. 1968. Avocado culture in Venezuela. California Avocado Society Yearbook. 52 p. 153- 168.
20. Shiide Rentschler, L; Shmiediche, P.E. 1984. El cultivo de tejidos, su pasado, presente y futuro. CIP, Circular (Perú) 12(1):12.
21. Sigma US. 1990. Catalogue plant cell culture. p. 91.
22. Smith, CE. 1966. Archeological evidence for selection of avocados. Econ. Bot. 20: 169-175.
23. Torres, AC; Teixeira Ferreira, A; Campos de Araujo, M. 1996. Medio de cultivo. Brasilia, D.F, Centro Brasileiro Argentino de Biotecnología. p. 21.
24. Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Agronomía. s.f. Clasificación de variedades de aguacate *Persea americana* Mill. de acuerdo a su floración. Guatemala. s.p.
25. Usui, K. *et al.* 1996. Principios básicos del cultivo de tejidos. Ed. por RV. Pernillo; AE. Ramírez. Guatemala, ICTA / JOCV. 166 p.
26. Vidallie, H. 1986. Cultivo *in vitro*. Trad. por Ma. Eugenia de Aragón Espejo. México, Editorial Científica. p. 42-52.
27. Villalobos A, VM. 1986. Fundamentos teóricos y prácticos del cultivo de tejidos vegetales. Chapingo, México, Colegio de Post-graduados, Centro de Genética, Laboratorio de Biotecnología. 192 p.
28. Villalobos A, VM; Thrope, T.A. 1991. Micropropagación: conceptos, metodología y resultados. *In* Cultivo de tejidos en la agricultura, fundamentos y aplicaciones. Ed. William Roca; Luis A. Mrogniski. Colombia, CIAT. p. 70-141.
29. Vuylsteke, DR. 1989. Shot-tip culture for de propagation, conservation and exchange of *Musa* germplasm. Roma, International Board for Plant Genetic Resources. p. 56.
30. Whiley, AW; Schaffer, B. 1994. Avocado. *In* Handbook of environmental physiology of fruit crops: subtropical and tropical crops. Ed. by B. Schaffer and PC Anderson. Boca Ratón, FL, US, CRC Press. v. 2, p. 3-35.

31. Williams, LO. 1977. The avocados, a synopsis of genus *Persea*, subg. *Persea*. *Economic Botany* 31(3): 315-320.
32. Zentmyer, G; Schieber, E. 1976. Exploring for *Persea* in Costa Rica. *California Avocado Society Yearbook*. p. 172-175.