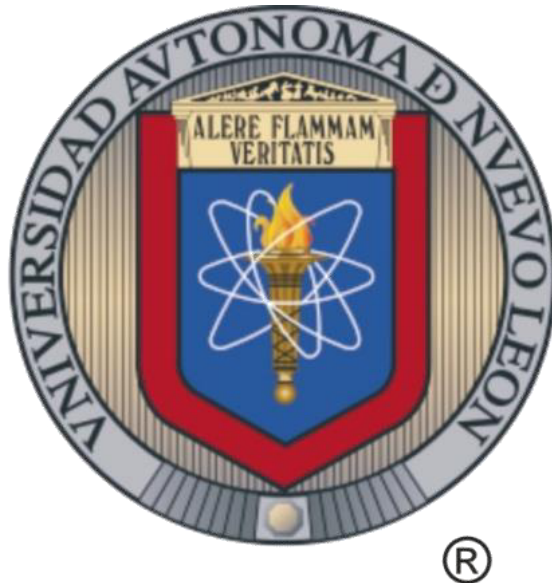


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE AGRONOMÍA**



TESIS

ORGANOGENESIS DE CUATRO CULTIVARES DE AGUACATE
Persea americana Mill

PRESENTA

ALEJANDRO IBARRA LÓPEZ

PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS EN PRODUCCIÓN AGRÍCOLA

JULIO 2015

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE AGRONOMÍA**



TESIS

**ORGANOGENESIS DE CUATRO CULTIVARES DE AGUACATE
Persea americana Mill**

PRESENTA

ALEJANDRO IBARRA LÓPEZ

PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS EN PRODUCCIÓN AGRÍCOLA

Escobedo, Nuevo León, México.

Julio, 2015

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE AGRONOMÍA**



TESIS

ORGANOGENESIS DE CUATRO CULTIVARES DE AGUACATE
Persea americana Mill

PRESENTA

ALEJANDRO IBARRA LÓPEZ

PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS EN PRODUCCIÓN AGRÍCOLA

Escobedo, Nuevo León, México.

Julio 2015

ESTA TESIS FUE REVISADA Y APROBADA POR EL
COMITÉ PARTICULAR COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRÍA EN CIENCIAS EN PRODUCCIÓN AGRÍCOLA

COMITÉ PARTICULAR

Dra. Ma. del Carmen Ojeda Zacarías
Asesor Principal

M. C. Eduardo Alejandro García Zambrano
Asesor Auxiliar

Dra. Adriana Gutiérrez Díez
Asesor Auxiliar

Dr. Ernesto Javier Sánchez Alejo
Subdirector de Posgrado e Investigación

DEDICATORIA

A mis padres, Adriana López Posada y Erberto de Jesús Ibarra Zarazúa, por su infinito apoyo, amor y comprensión.

A mis hermanos, Erberto y Ricardo, por el apoyo moral que siempre me han brindado.

A mis sobrinos, Daniel y Valeria, por alegrar cada día nuestro hogar.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por el apoyo económico otorgado para realizar mis estudios de posgrado.

A la Dra. Ma. del Carmen Ojeda Zacarías, por todo el apoyo en la realización de la presente investigación, por su confianza, por su paciencia, su amistad y los valiosos conocimientos y consejos brindados durante mi desarrollo profesional en la maestría.

Al M. C. Eduardo A. García Zambrano y la Dra. Adriana Gutiérrez Díez, integrantes de mi comité de tesis, por su apoyo en la revisión del escrito, así como sus sugerencias y aportaciones a la investigación.

A los maestros de Posgrado en Ciencias Agrícolas de la Facultad de Agronomía, UANL, por la formación, apoyo y valiosas enseñanzas.

A Gonzalo Martínez Peña y Gloria Peña Luna, por ser unas extraordinarias personas, por su amistad, consejos y apoyo.

A mis amigos y compañeros de laboratorio y maestría: Nimbe Carbajal, Jaime Cavazos, Milton Torres, Elisa Juárez, Félix Varela, Karla Frausto, Zahidd Meza y Héctor Rojas, por su amistad, sus enseñanzas y consejos que me dieron.

ÍNDICE DE CONTENIDO

Sección	Página
ÍNDICE DE CUADROS	x
ÍNDICE DE CUADROS DEL APÉNDICE	xii
ÍNDICE DE FIGURAS	xv
ABREVIATURAS.....	xvii
RESUMEN	xx
ABSTRACT	xxii
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Hipótesis	3
1.1.1 Hipótesis general.....	3
1.1.2 Hipótesis específicas.....	3
1.2 Objetivos	4
1.2.1 Objetivo general.....	4
1.2.2 Objetivos específicos	4
2. REVISIÓN DE LITERATURA	5
2.1 Origen del aguacate	5

2.1.1	Historia	5
2.1.2	Distribución.....	6
2.2	Taxonomía del aguacate.....	7
2.2.1	La familia Lauraceae	8
2.2.2	El género <i>Persea</i>	8
2.2.3	Aguacate <i>Persea americana</i> Mill	9
2.2.3.1	Hojas	9
2.2.3.2	Inflorescencia	10
2.2.3.3	Fruto.....	11
2.3	Diversidad de especies de aguacate.....	11
2.3.1	Razas de aguacate.....	11
2.3.2	Cultivares de aguacate	12
2.3.2.1	Cultivar Bacon	14
2.3.2.2	Cultivar Huevo de Toro.....	15
2.3.2.3	Cultivar Mantequilla	15
2.4	Importancia del aguacate	16
2.4.1	Importancia económica.....	16
2.4.2	Producción de aguacate	18
2.4.2.1	Mundial.....	18
2.4.2.2	Nacional	18

2.4.2.3	Estatal	19
2.4.3	Importancia nutrimental	19
2.4.3.1	Propiedades medicinales	20
2.5	Propagación del aguacate.....	21
2.6	Propagación mediante cultivo de tejidos vegetales.....	21
2.7	Etapas de la micropropagación <i>in vitro</i>	23
2.8	Micropropagación de aguacate	23
2.9	Iniciación de los cultivos.....	24
2.9.1	Factores que afectan el establecimiento de los explantes.....	24
2.9.2	Desinfección de los explantes	24
2.9.3	Medio de cultivo.....	27
2.9.4	Inducción de brotes	27
2.9.5	Enraizamiento <i>in vitro</i>	28
3.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	30
3.1	Localización del experimento	30
3.2	Material vegetal	30
3.3	Acondicionamiento previo del material vegetal	31
3.4	Pre-desinfección	31
3.5	Técnica de desinfección.....	32
3.6	Preparación del medio de cultivo	33

3.6.1	Establecimiento <i>in vitro</i>	33
3.6.2	Inducción de brotes	33
3.6.3	Inducción de raíces.....	34
3.7	Siembra <i>in vitro</i> de cultivares de aguacate.....	35
3.8	Diseño experimental.....	36
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	38
4.1	Establecimiento aséptico.....	38
4.1.1	Contaminación.....	38
4.1.2	Oxidación.....	40
4.1.3	Viabilidad	40
4.2	Tablas de contingencia	42
4.3	Inducción de brotes.....	43
4.3.1	Número de brotes	43
4.3.2	Longitud de brotes	47
4.3.3	Número de hojas	50
4.4	Inducción de raíces	55
5.	CONCLUSIONES	62
6.	LITERATURA CONSULTADA	63
7.	APÉNDICE	76

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Razas de aguacate de acuerdo al cultivar.....	30
2	Medios de cultivo utilizados para la etapa de inducción de brotes.....	34
3	Medios de cultivo utilizados para la etapa de enraizamiento.....	35
4	Porcentajes de contaminación, oxidación y viabilidad de microestacas de cuatro cultivares en cuatro medios de cultivo a 7 y 14 días del establecimiento <i>in vitro</i>	41
5	Significancia y prueba de Ji-cuadrada a 7 y 14 días del establecimiento <i>in vitro</i> en las variables contaminación, oxidación y viabilidad en los medios utilizados.....	43
6	Comparación de medias de la respuesta de los cultivares de aguacate en el número de brotes a 8, 12 y 16 semanas.....	46
7	Comparación de medias sobre el efecto de los medios de inducción, en el número de brotes a 8, 12 y 16 semanas.....	47

8	Comparación de medias de la respuesta de los cultivares de aguacate en la longitud de brotes a 8, 12 y 16 semanas.....	49
9	Comparación de medias sobre el efecto de los medios de inducción en la longitud de brotes a 8, 12 y 16 semanas.....	50
10	Comparación de medias de la respuesta de los cultivares de aguacate en el número de hojas a 8, 12 y 16 semanas.....	52
11	Comparación de medias sobre el efecto de los medios de inducción en el número de hojas a 8, 12 y 16 semanas.....	52
12	Porcentajes de formación de raíces en brotes regenerados <i>in vitro</i> de aguacate del cultivar Bacon a ocho semanas.....	58
13	Comparación de medias en las variables número y longitud de raíces en brotes de aguacate cv. Bacon en los medios de enraizamiento a ocho semanas.....	58

ÍNDICE DE CUADROS DEL APÉNDICE

Cuadro		Página
1A	Componentes del medio de cultivo MS* (Murashige y Skoog, 1962).....	77
2A	Componentes del medio de cultivo DCR (Gupta y Durzan, 1985).	78
3A	Componentes del medio de cultivo Yasuda (Yasuda <i>et al.</i> , 1985).	79
4A	Componentes del medio de cultivo B5 (Gamborg <i>et al.</i> , 1968).....	80
5A	Tabla de contingencia de respuesta de microestacas en medio MS y prueba de Ji-cuadrada a 7 días del establecimiento.....	81
6A	Tabla de contingencia de respuesta de microestacas en medio MS y prueba de Ji-cuadrada a 14 días del establecimiento.....	81
7A	Tabla de contingencia de respuesta de microestacas en medio DCR y prueba de Ji-cuadrada a 7 días del establecimiento.....	82
8A	Tabla de contingencia de respuesta de microestacas en medio DCR y prueba de Ji-cuadrada a 14 días del establecimiento.....	82
9A	Tabla de contingencia de respuesta de microestacas en medio Yasuda y prueba de Ji-cuadrada a 7 días del establecimiento.....	83
10A	Tabla de contingencia de respuesta de microestacas en medio Yasuda y prueba de Ji-cuadrada a 14 días del establecimiento....	83

11A	Tabla de contingencia de respuesta de microestacas en medio B5 y prueba de Ji-cuadrada a 7 días del establecimiento.....	84
12A	Tabla de contingencia de respuesta de microestacas en medio B5 y prueba de Ji-cuadrada a 14 días del establecimiento.....	84
13A	Análisis de varianza de la interacción cultivar por medio de inducción, en las variables número y longitud de brotes y número de hojas a 8, 12 y 16 semanas.....	85
14A	Comparación de medias de la interacción cultivar por medio de inducción, en el número de brotes a 8 semanas.....	87
15A	Comparación de medias de la interacción cultivar por medio de inducción, en el número de hojas a 8 semanas.....	87
16A	Comparación de medias de la interacción cultivar por medio de inducción, en el número de brotes a 12 semanas.....	88
17A	Comparación de medias de la interacción cultivar por medio de inducción, en el número de hojas a 12 semanas.....	88
18A	Comparación de medias de la interacción cultivar por medio de inducción, en el número de brotes a 16 semanas.....	89
19A	Comparación de medias de la interacción cultivar por medio de inducción, en la longitud de brotes a 16 semanas.....	89
20A	Comparación de medias de la interacción cultivar por medio de inducción, en el número de hojas a 16 semanas.....	90

21A	Análisis de varianza del efecto de los medios de enraizamiento en brotes de aguacate cv. Bacon en el número de raíces a 8 semanas.....	90
22A	Análisis de varianza del efecto de los medios de enraizamiento en brotes de aguacate cv. Bacon en la longitud de raíces a 8 semanas.....	91

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Varetas de aguacate utilizadas para la siembra, a) cv. Huevo de Toro, b) Bacon, c) Mantequilla, d) R.H.....	31
2	Pasos generales del establecimiento <i>in vitro</i> de explantes de aguacate, a) lavado superficial de varetas con jabón y agua potable, b) lavados con agua potable en agitación, c) solución bactericida + Cloralex [®] , d) solución bactericida-fungicida, e) etanol absoluto, f) desinfección en campana, solución NaClO 2.7 %, g) permanencia en PVP, h) microestacas de aguacate antes de siembra, i) explantes en medio de cultivo.....	37
3	Explantes viables a 14 días del establecimiento <i>in vitro</i> sembrados en medio Yasuda a) cv. Huevo de Toro, b) Bacon, c) Mantequilla, d) R.H.....	42
4	Respuesta de los cultivares de aguacate utilizados en los medios de inducción de brotes a 12 semanas. a-c) cv. Huevo de Toro; d-f) cv. Bacon. a) M1, b) M2, c) M4, d) M1, e) M2, f) M3.....	53

5	Respuesta de los cultivares de aguacate utilizados en los medios de inducción de brotes a 12 semanas. a-c) cv. Mantequilla; d-f) cv. R.H. a) M2, b) M3, c) M4, d) M1, e) M3, f) M4.....	54
6	Efecto del carbón activado adicionado al medio de cultivo, en brotes de aguacate regenerados <i>in vitro</i> . Cv. Bacon.....	56
7	Efecto de los medios de enraizamiento durante las primeras cuatro semanas en brotes de aguacate. a) cv. Huevo de Toro en M2, b) cv. Bacon en M3.....	57
8	Formación de raíces en brote del cultivar Bacon en medio M2.....	59

ABREVIATURAS

MS	Murashige y Skoog, 1962
DCR	Gupta y Durzan, 1985
Yasuda	Yasuda <i>et al.</i> , 1985
B5	Gamborg <i>et al.</i> , 1968
DF	Dixon y Fuller, 1976
WPM	Woody Plant Medium, Lloyd y McCown, 1980
ANA	Ácido 1-naftalenacético
AIB	Ácido indol-3-butírico
AIA	Ácido indolacético
AG ₃	Ácido giberélico
BAP	6-bencilaminopurina
2,4-D	Ácido 2,4-diclorofenoxiacético
TDZ	Thidiazuron
AC	Agua de coco
CH	Caseína hidrolizada
CA	Carbón activado
NaClO	Hipoclorito de sodio

PVP	Polivinilpirrolidona
Tween-20	Polisorbato 20
mL	Mililitro
L	Litro
mg	Miligramo
g	Gramo
kg	Kilogramo
t	Tonelada
Mt	Millones de toneladas
s	Segundo
min	Minuto
h	Hora
mm	Milímetro
cm	Centímetro
ha	Hectárea
μM	Micromolar
mL L^{-1}	Mililitro por litro
mg L^{-1}	Miligramo por litro
g L^{-1}	Gramo por litro
kg cm^{-2}	Kilogramo por centímetro
v/v	Volumen sobre volumen
$^{\circ}\text{C}$	Grados Celsius
%	Porcentaje

SPSS	Statistical Package for the Social Sciences
FV	Fuentes de variación
SC	Suma de cuadrados
GL	Grados de libertad
CM	Cuadrado medio
F	F calculada
Sig	Significancia
X^2	Ji-cuadrada
Cv	Cultivar

RESUMEN

El aguacate (*Persea americana* Mill) es un importante cultivo tropical originario de Mesoamérica; actualmente esta especie está distribuida por todo el mundo y México es el principal productor.

Los métodos tradicionales de propagación son tardados y costosos, ya que la especie presenta un largo periodo juvenil y en algunos casos no se asegura su homogeneidad. El cultivo de tejidos vegetales permite la propagación clonal de un gran número de plantas, además de permitir la conservación de germoplasma. Los enfoques de la micropropagación en aguacate son la multiplicación de portainjertos de interés comercial y el rejuvenecimiento de material adulto.

El objetivo de la presente investigación fue establecer una metodología para inducir la organogénesis en cultivares de aguacate, en los que se probaron diferentes medios de cultivo, concentraciones de reguladores de crecimiento y suplementos.

Para disminuir los problemas de contaminación de los explantes, se probaron diferentes cantidades de fungicidas y bactericidas agrícolas en la desinfección del material vegetal. De igual manera, para la oxidación se utilizaron antioxidantes como ácido ascórbico, ácido cítrico y PVP.

Se evaluaron los medios de cultivo MS, DCR, Yasuda y B5 para el establecimiento de los explantes, los cuales fueron microestacas con yemas axilares. En este caso el mejor medio de cultivo fue el Yasuda, ya que permitió la mayor viabilidad de las microestacas después de 14 días.

Para la inducción de brotes se probaron los medios MS, DCR y Yasuda, suplementados con agua de coco (AC), BAP, AG₃ y AIA; o con la combinación de caseína hidrolizada (CH), BAP y AIB. En esta etapa se evaluó el número y longitud de brotes y número de hojas a 8, 12 y 16 semanas. El análisis de varianza demostró que el cultivar Bacon en todas las variables, respondió de mejor manera en los medios de inducción utilizados. Mientras que el medio M3 (Yasuda + AC, BAP, AG₃ y AIA), fue satisfactorio para iniciar la presencia, proliferación y longitud de brotes, así como el desarrollo de hojas en los cuatro cultivares de aguacate utilizados.

Finalmente, en el enraizamiento *in vitro* de brotes, se utilizó una solución concentrada de 3.0 g L⁻¹ de AIB para sumergir los brotes, y después transferirlos a los medios MS, DCR y Yasuda con dos dosis de AIB (0.5 y 1.0 g L⁻¹). En estos medios, sólo el cultivar Bacon presentó respuesta para la formación de raíces, siendo el medio M2 (MS + 1.0 mg L⁻¹ AIB) el más favorecedor con 1.8 raíces por brote y hasta 2.76 cm de longitud.

ABSTRACT

Avocado (*Persea americana* Mill) is a major tropical crop with origin in Mesoamerica area. At present time, this species is worldwide distributed and Mexico is the main producer.

Traditional methods of propagation are time-consuming and costly, since the species presents a long juvenile period and in some cases is not assured its homogeneity. Plant tissue culture allows the clonal propagation of a large number of plants, in addition to allow for the conservation of germplasm. The approaches of micropropagation in avocado, are the multiplication of rootstocks of commercial interest and the rejuvenation of adult material.

The aim of the present investigation was to establish a methodology to induce organogenesis in cultivars of avocado, in which there were studied different culture media, concentrations of growth regulators and supplements.

To alleviate the contamination problems of the explants, different amounts of fungicides and bactericides were tested in the disinfection of plant material. Similarly, for oxidation, the antioxidants ascorbic acid, citric acid, and PVP were used.

MS, DCR, Yasuda and B5 culture media were evaluated for the establishment of the explants, which were microcuttings with axillary buds. In this case the best culture medium was Yasuda, as it allow the greatest viability of microcuttings after 14 days.

For shoot induction, MS, DCR and Yasuda culture media were tested, supplemented with coconut water (CW), BAP, GA₃ and IAA; or the combination of casein hydrolysate (CH), BAP and IBA. At this stage the number and shoot length and number of leaves after 8, 12 and 16 weeks was evaluated. Analysis of variance showed that the cultivar Bacon in all the variables, respond better to induction media used. While the medium M3 (Yasuda + CW, BAP, IAA and AG₃), was satisfactory to start the presence, proliferation and shoot length and leaf development in the cultivars of avocado used.

Finally, for *in vitro* rooting, a concentrated solution of 3.0 g L⁻¹ of IBA to immerse shoots was used, and then transfer to the MS, DCR and Yasuda media with two doses of IBA (0.5 and 1.0 g L⁻¹). In these media, only Bacon cultivar presented response to the formation of roots, being the M2 medium (MS + 1.0 mg L⁻¹ IBA) the most flattering with 1.8 roots per shoot and up to 2.76 cm in length.

1. INTRODUCCIÓN

El aguacate (*Persea americana* Mill) es un importante cultivo frutal de las zonas tropicales y subtropicales, originario de Mesoamérica (Premkumar *et al.*, 2003; Galindo-Tovar *et al.*, 2008). Es un árbol perenne de la familia Lauraceae, cultivado por sus frutos los cuales son altamente valorados en sus regiones de origen, donde constituye un componente esencial de la dieta diaria debido a su alto contenido de aceites y como fuente balanceada de proteínas, carbohidratos, minerales y vitaminas (Ben-Ya'acov y Michelson, 1995; Knight, 2002; Chanderbali *et al.*, 2008; Márquez-Martín *et al.*, 2012).

México es uno de los países con mayor diversidad de tipos de aguacate con al menos 20 diferentes especies, riqueza que debe ser valorada, conservada y aprovechada para una producción de mayor calidad, además de ser el principal productor y consumidor de aguacate en el mundo (Bergh, 1992; Moreno-Limón *et al.*, 2010). En 2013, la producción mundial total de aguacate fue de 4.7 millones de toneladas (Mt), de las cuales 1.41 Mt fue contribuida solamente por México, colocándose en el primer lugar mundial de producción de aguacate (FAO, 2013).

Ante este panorama existen programas de mejoramiento para incorporar resistencia a enfermedades y otros rasgos deseables en el aguacate; estos programas son tardados y minuciosos debido al largo periodo juvenil y heterocigosidad de la especie (Ben

Ya'acov, 1987; Pliego-Alfaro y Bergh, 1992; Litz *et al.*, 2007; Raharjo *et al.*, 2008). Asimismo, se ve afectado el uso de portainjertos a partir de semilla, lo cual no garantiza homogeneidad genética y comportamiento estable en campo (Ben Ya'acov, 1987). La propagación clonal de aguacate se ha logrado principalmente por injerto, un proceso costoso y que consume mucho tiempo (Brokaw, 1987), debido a esto, se deben implementar y desarrollar diversos métodos de propagación para el cultivo de aguacate (Barceló-Muñoz *et al.*, 1999).

El rescate de germoplasma de aguacate es prioritario para iniciar los programas de mejoramiento genético en este frutal. Una alternativa segura de conservación es a través del establecimiento *in vitro* bajo condiciones de crecimiento normales o limitadas (Vidales-Fernández *et al.*, 2011).

La micropropagación en aguacate está enfocada en propagar en masa portainjertos de interés comercial, o para revitalizar material adulto que posteriormente podría multiplicarse por técnicas convencionales (Barceló-Muñoz y Pliego-Alfaro, 2003). Diversos cultivares de aguacate se han establecido a partir de segmentos nodales con yemas laterales y apicales, embriones inmaduros, ejes embrionarios y semillas (Dalsaso y Guevara, 1988; Barringer *et al.*, 1996; Barceló-Muñoz *et al.*, 1999; Rodríguez *et al.*, 1999; De la Viña *et al.*, 2001; Premkumar *et al.*, 2002, 2003; Vidales-Fernández, 2002; Sánchez-Romero *et al.*, 2007; Nhut *et al.*, 2008; Zulfiqar *et al.*, 2009).

Por lo anterior, el objetivo de la presente investigación fue establecer una metodología para inducir la organogénesis en cultivares de aguacate, en los que se probaron diferentes medios de cultivo, concentraciones de reguladores de crecimiento y suplementos.

1.1 Hipótesis

1.1.1 Hipótesis general

La organogénesis en cultivares de aguacate *Persea americana* Mill, se puede lograr mediante la aplicación de diversas combinaciones y concentraciones de reguladores de crecimiento en los medios de cultivo.

1.1.2 Hipótesis específicas

1. La combinación de agentes desinfectantes permitirá el establecimiento aséptico de explantes de cultivares de aguacate.
2. Los explantes de aguacate responderán a las sales de los diferentes medios de cultivo.
3. La inducción de brotes en cultivares de aguacate, se puede lograr mediante la combinación óptima de reguladores de crecimiento y suplementos adicionados a los diferentes medios de cultivo.
4. La formación de raíces en brotes de aguacate se induce mediante los diferentes medios de cultivo y la dosis óptima de AIB.

1.2 Objetivos

1.2.1 Objetivo general

Establecer una metodología para inducir organogénesis en explantes de cultivares de aguacate *Persea americana* Mill.

1.2.2 Objetivos específicos

1. Evaluar la combinación de agentes desinfectantes que permita el establecimiento aséptico, en explantes de cultivares de aguacate.
2. Definir el medio de cultivo que permita el establecimiento *in vitro* en explantes de cultivares de aguacate.
3. Determinar el medio de cultivo, la combinación óptima de reguladores de crecimiento y suplementos, para inducir la formación de brotes en explantes de cultivares de aguacate *Persea americana* Mill.
4. Definir el medio de cultivo y la dosis de AIB sobre el efecto de formación de raíces en brotes de cultivares de aguacate.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Origen del aguacate

El aguacate es nativo de América. Es una importante fruta tropical originaria de Mesoamérica, en la región alta del centro de México y Guatemala (Williams, 1976, 1977; Galindo-Tovar *et al.*, 2008). Se dispersó hacia Sudamérica por las culturas que habitaron en Mesoamérica en la época prehispánica (Galindo-Tovar *et al.*, 2007). El aguacate se desarrolló en el Neotrópico desde tiempos antiguos y es posible que su domesticación en Mesoamérica se iniciara antes que otras plantas anuales hace 5,000 años A.C. (Smith, 1969; Galindo-Tovar *et al.*, 2008). Los restos fósiles de aguacate encontrados en cuevas de Coxcatlán, Valle de Tehuacán, en el estado de Puebla, México, tienen una antigüedad de 8,000-7,000 años A.C. y probablemente fueron de un árbol nativo que crecía al este, en el bosque mésico en una de las barrancas en la ladera de la montaña. La cantidad de semillas de aguacate y la presencia de otras plantas cultivadas, indica que los árboles de aguacate estaban siendo plantados cerca de arroyos hace 6,500 años (Smith, 1966).

2.1.1 Historia

Las culturas antiguas contaban con un buen conocimiento del aguacate y de sus variantes, como se muestra en el Códice Florentino, donde se mencionan tres tipos de

aguacate que de acuerdo a la descripción “aoacatl” podría tratarse de *Persea americana* var. *drymifolia* (Raza Mexicana), “tlacacolaocatl” a *P. americana* var. *americana* (Raza Antillana) y “quillaoacatl” posiblemente a *P. americana* var. *guatemalensis* (Raza Guatemalteca) (Bergh, 1992).

Existen registros históricos en donde se menciona al aguacate, como pago de tributos de los pueblos mesoamericanos a la corona española, referencia de pueblos indios, y resultado de incursiones e investigaciones hechas por los conquistadores europeos (Barrientos-Priego y López-López, 2002).

Por otra parte, el Códice Mendocino cita al aguacate y menciona los tributos a enviar de Tenochtitlán por una región que comprendía 14 pueblos, de los cuales el quinto es representado por un árbol y su nombre escrito es “Ahuacatla”, donde ahucatl significa aguacate (testículo) o árbol del aguacate (de los testículos), mientras que el posfijo –tla significa “lugar”, por lo tanto, “Ahuacatla” se traduce como “Lugar del árbol de los aguacates” (Barrientos-Priego y López-López, 2002).

2.1.2 Distribución

Desde su centro de origen, el aguacate se dispersó hacia Norteamérica por México hasta el Sudeste de los Estados Unidos; hacia las Antillas, todo Centroamérica y gran parte de Sudamérica: Colombia, Venezuela, Las Guyanas, Ecuador, Perú y Bolivia. Esta dispersión tan amplia a través de áreas de desarrollo de civilizaciones antiguas, se explica por la alta estima que los indígenas tenían por el fruto carnoso, nutritivo y de sabor único (Moreno-Limón *et al.*, 2010).

Después del descubrimiento de América y de la invasión de México, Centroamérica, Colombia y Perú, el aguacate se diseminó a otros lugares del mundo. Después de la conquista, los españoles llevaron el aguacate a España en 1600, al Caribe en 1630, África entre 1750 y 1904, a Israel en 1908, Brasil en 1809, Chile y Australia en 1850, 1910 en Nueva Zelanda, Singapur en 1830 y la India en 1892 (Téliz y Mora, 2007).

En México el cultivo de aguacate se localiza en casi todo el territorio, siendo los estados de Michoacán, Jalisco, Edo. de México, Nayarit y Morelos, los principales productores por superficie y producción (SIAP, 2013).

En Nuevo León dado que se considera uno de los estados centros de origen del aguacate criollo, los municipios que reportan este cultivo son: Allende, Aramberri, Bustamante, Cadereyta Jiménez, Galeana, General Zaragoza, Rayones, Sabinas Hidalgo, Santa Catarina y Villaldama (SIAP, 2013).

2.2 Taxonomía del aguacate

México es uno de los países con amplia diversidad de tipos de aguacate y existen en el país al menos 20 diferentes especies relacionadas con el aguacate. Esta gran variabilidad puede ser debida a diferentes condiciones ambientales existentes en el territorio nacional y a la naturaleza que ha conferido al aguacate, mecanismos que maximizan el cruzamiento con otros tipos, y por lo tanto, incrementa la variabilidad genética ampliando la adaptación a un mayor número de ambientes (Bergh, 1992).

2.2.1 La familia Lauraceae

Esta familia es numerosa e incluye alrededor de 3,500 especies agrupadas en 55 géneros. La mayoría de las especies son árboles con distribución en zonas tropicales y templadas. Esta familia incluye especies de importancia económica y cultural. El nombre de la familia se debe a que incluye entre sus miembros al laurel (*Laurus nobilis* L.), que era utilizado para reconocer las hazañas deportivas en la antigua Grecia (Moreno-Limón *et al.*, 2010; Chanderbali *et al.*, 2013).

En la familia Lauraceae se encuentran géneros importantes como *Persea* (aguacate), *Laurus* (laurel), *Cinnamomum* (canela), *Cassia* (alcanforero) y *Sassafras* (sasafrás). Otros géneros importantes son *Ocotea*, *Aniba*, *Litsea*, *Chlorocardium*, *Endiandra* y *Eusideroxylon* (Chanderbali *et al.*, 2008).

2.2.2 El género *Persea*

El género *Persea* (Miller), reúne árboles o arbustos con hojas alternas, subverticiladas, penninervadas, glabras o pubescentes; las inflorescencias paniculadas, tirsoideas, racemosas o capitadas, axilares o pseudoterminales; flores hermafroditas, campanuladas; tépalos 6, ovados, elípticos u oblongos, semejantes entre sí, o los exteriores más pequeños que los interiores, glabros o pubescentes, verde amarillentos, deciduos o persistentes; estambres fértiles 9, los filamentos más largos que las anteras, los tres interiores con glándulas en la base, anteras con cuatro esporangios; hipanto corto, plano; ovario ovoide o globoso; fruto asentado directamente en un pedicelo más o menos engrosado, sin cúpula, cuando los pétalos

son persistentes, se observan fuertemente imbrincados formando un tubo corto (Van der Werff y Lorea, 1997).

Todos los taxa que se conocen como aguacates (aguacate, aguacatillo, aguacate de monte, aguacate de la montaña, aguacate criollo, aguacate cimarrón, pawa, guaslipe, chinini, yas, palta, etc.) pertenecen al género *Persea*, el cual incluye en la actualidad cerca de 85 especies, la mayoría de ellas distribuidas en América, desde Estados Unidos hasta Chile (Moreno-Limón *et al.*, 2010). México reúne alrededor de 10 a 12 especies, que son más abundantes en bosques mesófilos de montaña y bosques de pino o encino. Se reconocen tres subgéneros: *Persea* (sólo en América), caracterizado por la presencia de tépalos iguales, totalmente deciduos en el fruto; *Eriodaphne* (sólo en América), con tépalos desiguales y persistentes en el fruto; y *Machilus* (sólo en Asia), con tépalos iguales, persistentes y reflexos en el fruto (Van der Werff y Lorea, 1997).

2.2.3 Aguacate *Persea americana* Mill

2.2.3.1 Hojas

Hojas espaciadas o algunas veces hacinadas cerca de la punta de las ramas, en ocasiones ausentes por corto tiempo (plantas deciduas), peciolos de 1 a 5 cm de largo, pubescentes o glabros, láminas variables en forma, por lo común angosta a ampliamente elípticas, de (6) 10 a 18 (30) cm de largo, por (2.5) 5 a 12 cm de ancho, ápice redondeado, obtuso agudo, algunas veces acuminado, base aguada a redondeada, verdes o glaucas en el envés, venas laterales 6 a 8 (10) pares, inmersas

en la haz, más o menos prominentemente elevadas en el envés, venas terciarias formando un retículo fino, cartáceas, haz glabra, envés glabro o variadamente pubescente, algunas veces con olor a anís (Van der Werff y Lorea, 1997).

2.2.3.2 Inflorescencia

Flores en inflorescencias axilares o usualmente hacinadas en la base de las ramas nuevas, de (3.5) 5 a 11 cm de largo, glabras o pubescentes, pedicelos florales de 4 a 8 mm de largo, pubescentes. Flores subcampanuladas, de 5 a 5.5 mm de largo, amarillentas. Los tépalos elípticos o angostamente elípticos, de 3.7 a 6.3 mm de largo, por 1.8 a 3 mm de ancho, los externos ligeramente más cortos que los internos, densamente pubescentes en la cara exterior e interior; estambres de los verticilos I y II de 2.8 a 3.7 mm de largo; filamentos del doble de la longitud de las anteras, densamente pubescentes; anteras glabras excepto por la base del conectivo que es adaxialmente pubescente al igual que la base de la antera del lado abaxial; estambres del verticilo III de 3 a 4.3 mm de largo; filamentos del doble o más de la longitud de las anteras, densamente pubescentes; anteras pubescentes en su mitad inferior adaxialmente, pubescentes en la base al igual que en el conectivo abaxialmente. Glándulas de 0.4 a 0.8 mm de largo, elípticas, conspicuamente pediceladas; pedicelos tan largos o más largos que las glándulas, pubescentes, estaminodios de 1.1 a 2.2 mm de largo, con filamentos pubescentes abaxial y adaxialmente; ápice pubescente en su base adaxialmente, pubescente abaxialmente; hipanto ausente; ovario y estilo pubescentes (Van der Werff y Lorea, 1997).

2.2.3.3 Fruto

El fruto es una baya de 5 a 15 cm de largo, que consta de una sola semilla grande, rodeada por una pulpa mantecosa. La piel es variable en espesor y textura. El color del fruto en la madurez puede ser verde, amarillo-verde, negro, púrpura o rojizo, dependiendo del cultivar. En general, la pulpa es totalmente pálida a amarillo intenso, mantecosa y suave. En forma, la fruta es generalmente piriforme u oval y redonda, y el peso llega hasta 2.3 kg. El contenido de aceite difiere entre 7.8 hasta 40 % en base al peso fresco. La semilla puede ser achatada, redonda, cónica u ovoide, de 5 a 6.4 cm de largo, dura y pesada, de color marfil, encerrada en dos cubiertas delgadas y de color café (Van der Werff y Lorea, 1997; Ospina, 2002).

2.3 Diversidad de especies de aguacate

2.3.1 Razas de aguacate

Con el curso del tiempo, el aguacate primitivo (*P. americana* Mill) dió origen a tres y posiblemente más tipos de aguacate que se desarrollaron en aislamiento geográfico, dando lugar a taxones distintos. Estos taxones son conocidos en el medio hortícola como “razas” o “variedades” en el ámbito de la botánica sistemática. De acuerdo a lo anterior, se reconocen tres razas de aguacate; Mexicana, Guatemalteca y Antillana (Moreno-Limón *et al.*, 2010; Téliz y Mora, 2007).

Bergh y Ellstrand, (1986), realizaron una clasificación de las razas de aguacate, agrupando a los aguacates de la raza Mexicana en la variedad botánica *drymifolia* (*P. americana* var. *drymifolia*), la raza Guatemalteca en la variedad *guatemalensis* (*P. americana* var. *guatemalensis*) y a la raza Antillana en la variedad *americana* (*P. americana* var. *americana*).

Ben-Ya'acov *et al.* (1995), indicaron que en Costa Rica no existen aguacates de las razas Mexicana y Guatemalteca, y la raza Antillana se encuentra en formas comunes en las partes bajas. Sin embargo, existe un tipo endémico en ese país que se conoce como “aguacate de monte” que es una variante muy primitiva de la especie *P. americana*, sugerida como una variedad botánica aparte y propuesta como var. *costaricensis*.

2.3.2 Cultivares de aguacate

Los cultivares son conocidos comúnmente como variedades, sin embargo, es importante señalar que la variedad, en términos estrictamente taxonómicos son una categoría infraespecífica formada por grupos de individuos de una especie que son morfológica y genéticamente distintos, generalmente como resultado del aislamiento geográfico. En tanto que el cultivar es también una población única de plantas, que no existe en la naturaleza y se mantiene artificialmente por esfuerzo humano (Hartmann, *et al.*, 2002).

Los criterios importantes en la selección de los cultivares de aguacate, se pueden agrupar en 1) la producción y 2) las consideraciones de calidad de la fruta. Para los

huertos familiares, las características de producción pueden no ser tan importantes como la buena calidad del fruto (Bender, 2012; Crane *et al.*, 2013a). Mientras que para los cultivadores comerciales, las características de producción podrían ser extremadamente importantes, pero las preferencias del consumidor para la apariencia y calidad del fruto son también importantes para determinar si es o no una selección apropiada (Bergh, 1969; Campbell y Malo, 1976; Bender, 2012).

Los árboles de aguacate se adaptan de acuerdo a su ascendencia de las distintas razas (Téliz y Mora, 2007). La raza Mexicana tiene una piel delicada, la semilla es grande y por lo común suelta en la cavidad, los frutos son pequeños lo que es comercialmente deseable (Bergh y Ellstrand, 1986; Knight, 1999). Sus principales ventajas son la resistencia al frío, la adaptación a grandes alturas y su alto contenido de aceite (Berg y Ellstrand, 1986; Barrientos-Priego y López-López, 2002; Knight, 1999). La raza Guatemalteca produce frutos con la más alta calidad hortícola de las tres razas (Bergh y Ellstrand, 1986; Knight, 1999). La piel es bastante gruesa lo que facilita su transporte, la semilla es pequeña y está ajustada a la cavidad (Barrientos-Priego y López-López, 2002). La principal ventaja de los frutos de esta raza es que tienen una mayor cantidad de tiempo a la madurez. Están adaptados a elevaciones altas y tienen la capacidad de sobrevivir a climas fríos (Bergh y Ellstrand, 1986; Knight, 1999). La raza Antillana se adapta a regiones tropicales con baja elevación (Bergh y Ellstrand, 1986; Knight, 1999), y como portainjerto es más tolerante a la salinidad y clorosis (Barrientos-Priego y López-López, 2002).

De acuerdo con el Plan Rector Nacional del Sistema Producto Aguacate (PRN, 2012), los principales cultivares que se cultivan en México son Hass, Fuerte, Bacon, Colín V-33, Reed y Lamb Hass.

2.3.2.1 Cultivar Bacon

Originado en Buena Park, California, E. U. A. por James Bacon y liberada a prueba en los 1920s (Crane *et al.*, 2013b). Tipo híbrido Mexicano x Guatemalteco (Crane *et al.*, 2013b; Ayala-Silva y Ledesma, 2014) Árbol erecto y angosto con corona puntiaguda; hojas con olor a anís cuando se maceran; moteado de color rojo en la madera de nuevos brotes. Flores de grupo B. Posee frutos de 170 a 510 g, de forma ovoide, cáscara verde oscuro y brillante, delgada, lisa, fácil de pelar; buen sabor, pulpa de color amarillo-verde pálido, contenido medio de aceite y con una semilla mediana a grande (Téliz y Mora, 2007; SAGARPA, 2011; Crane *et al.*, 2013b; Ayala-Silva y Ledesma, 2014). Fuerte productor, pero no persistente por mucho tiempo en el árbol; rendimientos más altos que el cultivar "Fuerte" en zonas frías. Buena tolerancia al frío hasta 4.4 °C. Susceptible al ataque de insectos, extremadamente susceptible a antracnosis. Cultivar inadecuado para áreas con clima subtropical húmedo. La piel puede presentar cicatrices provocadas por el viento, y en casos graves, la fruta puede exponer la semilla. Este cultivar se ha utilizado como un polinizador del "Hass" (Crane *et al.*, 2013b; Ayala-Silva y Ledesma, 2014).

2.3.2.2 Cultivar Huevo de Toro

Originario de Montemorelos. Árbol de porte erecto, corteza lisa, hojas de color negro anchas, follaje denso, brotes verde oscuro, floración en enero o febrero. Llega a producir hasta 150 kg/árbol, es resistente a las heladas, no presenta cosechas bianuales (Moreno-Limón *et al.*, 2010). El tamaño promedio del fruto es de 11.3 a 12.5 cm de largo y una longitud del pedúnculo de 5.3 cm. El fruto es alargado y tiene la forma de un testículo de toro, color verde, cáscara lisa y muy delgada, fácil de pelar; excelente sabor, con fibra no visible en la pulpa; el fruto madura en forma escalonada y el peso alcanza entre 187 y 206 g (Moreno-Limón *et al.*, 2010; Acosta-Díaz *et al.*, 2012). Se considera de ciclo intermedio entre el 16 de Julio y 14 de Agosto, y tiene una vida de anaquel de aproximadamente 4.3 días (Acosta-Díaz *et al.*, 2012).

2.3.2.3 Cultivar Mantequilla

Cultivado principalmente en el municipio de Aramberri. Cultivar de ciclo tardío entre el 8 de Octubre y 5 de Noviembre. Fruto esférico de color verde claro en madurez fisiológica, un tamaño aproximado de 7.0 cm de largo y con una longitud promedio de 15.7 cm del pedúnculo. El peso del fruto puede alcanzar los 80 g y tiene una vida de anaquel de 6.3 días (Acosta-Díaz *et al.*, 2012).

2.4 Importancia del aguacate

2.4.1 Importancia económica

El aguacate, *P. americana* Mill, en México y Centroamérica está incorporado a la dieta de la población desde hace muchos siglos, y muy posteriormente a la colonización llegó a otros puntos fuera del continente, y en estos últimos años Europa y Asia empiezan a importar aguacate en forma creciente (Moreno-Limón *et al.*, 2010).

En México, Nuevo León se considera uno de los estados centros de origen del aguacate criollo (*P. americana* var. *drymifolia*), el cual está muy localizado en los municipios de Galeana, Rayones, General Zaragoza y Aramberri. En el estado, el aguacate criollo es cultivado en diferentes sistemas agrícolas y de forma intensiva tanto en huertas familiares como de traspatio, estas formas de producción son importantes centros de experimentación, introducción de plantas y mejoramiento de cultivos así como refugios de diversidad genética única. En aguacate criollo, las razas locales o variedades consisten de selecciones locales de especies que se han cultivado en muchas regiones y que tienen una fuerte tendencia a ser sustituidas por variedades modernas, aunque aún es posible encontrar poblaciones de aguacate criollo formando parte de las huertas o de la vegetación natural (Gutiérrez-Díez *et al.*, 2009).

Su importancia económica recae en el máximo aprovechamiento que de la planta entera se realiza, presentando una variada posibilidad de usos como: remedios caseros para malestares, desparasitación, caída de cabello, como aliado en la salud y prevención de enfermedades, como fuente maderable; además de productos

industrializados como pulpas base para productos untables (guacamole), obtención de aceite, tradicionalmente para fines cosméticos, aceite extra virgen para fines culinarios, entre otros (Moreno-Limón *et al.*, 2010).

La importancia socioeconómica del aguacate se deriva del beneficio que derrama entre productores, comercializadores, industrializadores y consumidores. Los huertos generan empleo al demandar mano de obra para las podas, los riegos, el cuidado nutritivo y fitosanitario, la cosecha, el acarreo, la selección, el empaque, el traslado, el mercadeo y ventas al mayoreo y menudeo. La demanda de mano de obra para la poda, cosecha, selección y comercialización es una aportación del aguacate a la atención de los problemas socioeconómicos derivados de la globalización de la economía. El valor del cultivo por unidad de área hace del aguacate una opción comercial enfocada a los mercados nacionales e internacionales (Téliz y Mora, 2007).

La importancia del aguacate en el mercado internacional ha crecido sostenidamente, dejando de ser una fruta exótica para incorporarse en la dieta de muchos países. Esta tendencia se ha reforzado por la importancia mundial creciente en el consumo de productos naturales. A nivel internacional, la explotación comercial de aguacate se ha intensificado, ya que la producción mundial se ha incrementado en 550,000 t durante los últimos 15 años (Téliz y Mora, 2007).

2.4.2 Producción de aguacate

2.4.2.1 Mundial

La FAO en 2013, reporta una producción mundial de 4.71 Mt de aguacate, donde el continente Americano destaca con la mayor producción (70.3 %), seguido por África (15.2 %) y Asia (10.9 %). Los principales países productores de este fruto son México, República Dominicana, Colombia, Perú e Indonesia. Estos reportes evidencian un claro aumento en la producción de aguacate a lo largo de cinco años (37 %), cuando en 2008 se reportaban 3.44 Mt de este cultivo.

2.4.2.2 Nacional

De acuerdo al Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP, 2013), en México el cultivo de aguacate se localiza en casi todo el territorio, ya que cuenta con una superficie sembrada mayor a las 168,000 ha.

La evolución del aguacate como cultivo de importancia dentro de la República Mexicana se evidencia en las cifras registradas desde la década de los 80's hasta la actualidad, marcando una tendencia a incrementar el volumen de producción llegando en el 2013 a 1.46 Mt (FAO, 2013; SIAP, 2013). El estado de Michoacán ostenta el primer lugar en producción del cultivo de aguacate con un volumen de 1.19 Mt, seguido por Jalisco con 87,367 t, el Estado de México con 56,672 t y Nayarit con 34,345 t. Lo cual generó ganancias superiores a los 18.06 millones de pesos, siendo Michoacán el estado que más aporta a esta derrama económica (SIAP, 2013).

2.4.2.3 Estatal

El cultivo de aguacate en el Estado de Nuevo León se realiza solamente en 10 de los 51 municipios que conforman la entidad, siendo estos: Allende, Aramberri, Bustamante, Cadereyta Jiménez, Galeana, General Zaragoza, Rayones, Sabinas Hidalgo, Santa Catarina y Villaldama; con un área sembrada de 688 ha (SIAP, 2013).

El volumen de producción de aguacate en el 2013 fue de 2,039 t, destacando el municipio de Rayones con 980 t, lo cual representa el 48 % de la producción total en el estado. Le continúan los municipios de Aramberri con 498 t y Sabinas Hidalgo con 242 t. Estos valores de producción generaron ganancias superiores a los 21,139 miles de pesos (SIAP, 2013).

2.4.3 Importancia nutrimental

El aguacate es un alimento rico en nutrientes que contiene una alta proporción de ácidos grasos monoinsaturados, una baja cantidad de ácidos grasos saturados y nada de colesterol (Pérez-Rosales *et al.*, 2005). Esta composición de ácidos grasos, puede llegar en algunos cultivares hasta el 30 %, pero normalmente se encuentra entre 10 y 15 % (Moreno-Limón *et al.*, 2010). Por lo que su aceite, cumple con las recomendaciones nutrimentales que se enfocan a reducir la cantidad de grasa saturada en la dieta, siendo tan efectivo como utilizar aceite de maíz, soya o girasol (Pérez-Rosales *et al.*, 2005). Otras cualidades nutrimentales del aguacate, es su alto contenido de proteínas (2-4 %) en el fruto fresco, además de tener altos niveles de

potasio (igual o mayor que en el plátano), posee altas concentraciones de antioxidantes y cantidades apreciables de vitaminas A y E y vitaminas del grupo B (Lyle, 2006).

2.4.3.1 Propiedades medicinales

Los beneficios para la salud documentados con el consumo de aguacate en general, y ahora con su aceite, son numerosos e incluyen entre ellos, disminuir el riesgo de padecer cardiopatía coronaria, cataratas, diabetes, hipertrofia prostática benigna y diferentes tipos de cánceres (Eyres *et al.*, 2001; Ding *et al.*, 2007). Entre otras propiedades adicionales del aceite de aguacate, se incluye la cicatrización de heridas y hepatoprotección, los cuales pueden estar vinculados a los pigmentos de la pulpa de aguacate, la cual incluye clorofilas, carotenoides y antocianinas (Ding *et al.*, 2007). Además, el aguacate se utiliza por su riqueza en vitaminas D y E que estimula la formación de colágeno así como en saponinas, constituye un buen bálsamo para la piel, ideal para tratar los problemas de la misma, especialmente en casos de eccemas y dermatitis a los que se puede combatir aplicando una crema realizada con la pulpa de esta fruta o mediante la aplicación externa de su aceite. Estas mismas preparaciones pueden utilizarse para el tratamiento externo de otras afecciones de la piel, como granos, manchas o costras producidas por la psoriasis (Moreno-Limón *et al.*, 2010).

2.5 Propagación del aguacate

El uso de plantas de semillero como portainjertos de aguacate se ha relacionado con la falta de uniformidad en los huertos en términos de producción, vigor y/o tolerancia a los agentes patógenos transmitidos por el suelo o condiciones adversas del suelo. En aguacate, la propagación vegetativa es difícil; existen diferencias en la capacidad de enraizamiento debido a la edad ontogenética del material vegetal o su genotipo (Ben-Ya'acov, 1987; Köhne, 1992; Barceló-Muñoz y Pliego-Alfaro, 2003). La propagación por injerto es el método más apropiado para reproducir los cultivares seleccionados para cultivo comercial (Moreno-Limón *et al.*, 2010), ya que en los árboles injertados se espera que sean longevos, de alto rendimiento y uniformes en la calidad, forma y tamaño de los frutos (Barrientos-Priego *et al.*, 2007), sin embargo resulta costoso y consume mucho tiempo (Brokaw, 1987). Por tanto, se deben implementar y desarrollar métodos de propagación deseables para el cultivo de aguacate (Barceló-Muñoz *et al.*, 1999).

2.6 Propagación mediante cultivo de tejidos vegetales

Una de las herramientas vitales de la biotecnología vegetal es el cultivo *in vitro* de plantas, comúnmente llamado cultivo de tejidos vegetales o micropropagación, el cual se utiliza como ayuda experimental y permite la tecnología para la producción agrícola, el fitomejoramiento, la modificación de plantas, la producción de metabolitos vegetales, la manipulación genética y la rápida propagación clonal de plantas de acuerdo a las

necesidades deseadas, ya que requiere de espacios reducidos y poca mano de obra (Kumar y Loh, 2012; De Filippis, 2014).

Dentro de las principales ventajas de la micropropagación sobre los métodos tradicionales de propagación clonal se encuentran: a) la producción de un gran número de plantas a partir de un genotipo selecto en un espacio reducido y corto tiempo, b) la necesidad de pequeñas piezas de tejido vegetal para iniciar el cultivo, c) la tasa de multiplicación es mayor que los métodos de propagación convencional, d) se puede aplicar en genotipos donde la propagación vegetativa sea difícil o imposible, e) la multiplicación se puede desarrollar en cualquier época del año, f) los germoplasmas libres de virus, pueden mantenerse a salvo de una reinfección y las plantas micropropagadas pueden exportarse sin problemas, g) las plantas *in vitro* se mantienen relativamente seguras de infestaciones de microorganismos, h) la producción *in vitro* puede ser mejor planeada debido al almacenaje de cultivos *in vitro* en bajas temperaturas en temporadas de baja demanda de mercado, i) en plantas micropropagadas se pueden adquirir nuevos rasgos deseables del cultivo (Bhojwani y Dantu, 2013).

Entre otras ventajas, el cultivo de tejidos se ha vinculado con éxito para la conservación e intercambio de germoplasma en la horticultura (Ayala-Silva y Ledesma, 2014). En este sentido, Vidales-Fernández *et al.* (2011), señalan que el rescate de germoplasma en aguacate es prioritario para iniciar los programas de mejoramiento genético, la variabilidad que durante cientos de años ha creado la selección natural hay que conservarla, caracterizarla y utilizar los genes de manera ordenada, con apoyo de la biotecnología.

2.7 Etapas de la micropropagación *in vitro*

La micropropagación es un proceso de cinco etapas bien definido, cada una con sus requerimientos y problemas específicos (Bhojwani y Razdan, 1996): Etapa 0: es la etapa de preparación para proveer explantes de calidad; Etapa 1: iniciación de los cultivos asépticos; Etapa 2: multiplicación; Etapa 3: enraizamiento en brotes obtenidos *in vitro*; Etapa 4: aclimatación de las plántulas.

2.8 Micropropagación de aguacate

Plantas de aguacate han sido regeneradas *in vitro* por medio del cultivo de brotes (Pliego-Alfaro *et al.*, 2013). La micropropagación de aguacate está enfocada en propagar masivamente portainjertos de interés comercial, principalmente con resistencia a enfermedades transmitidas por el suelo, o tolerancia a condiciones de suelos salinos o calcáreos, así como para revitalizar material adulto que posteriormente podría multiplicarse por técnicas convencionales (Barceló-Muñoz y Pliego-Alfaro, 2003; Litz *et al.*, 2007).

Con plantas leñosas como el aguacate, la capacidad de morfogénesis es generalmente más baja en plantas adultas que juveniles (Pliego-Alfaro y Murashige, 1987; Read y Bavougian, 2013), por lo tanto, la micropropagación se desarrolla con explantes de plantas jóvenes y los resultados se pueden usar como guía para la propagación de la planta adulta (Barceló-Muñoz y Pliego-Alfaro, 2003).

2.9 Iniciación de los cultivos

2.9.1 Factores que afectan el establecimiento de los explantes

El explante es una pieza de tejido vegetal que se coloca en el medio de cultivo. Los factores a considerar en la selección de los explantes son: 1) la edad ontogénica del órgano que servirá como fuente del explante, 2) la temporada en que el explante se obtuvo, 3) el tamaño del explante, 4) la calidad de la planta donadora, 5) genotipo (Smith, 2013).

En aguacate, durante la fase de iniciación de los cultivos, se pueden presentar serios problemas, como alta contaminación, baja tasa de germinación, producción de exudados y oscurecimiento (Cooper, 1987; Zirari y Lionakis, 1994).

2.9.2 Desinfección de los explantes

La capacidad de establecer y crecer cultivos de células, órganos y tejidos vegetales, ha sido ampliamente explotada para la investigación básica y aplicada, y para la producción comercial de plantas (micropropagación). Independientemente de si la aplicación es para la investigación o el comercio, es fundamental que los cultivos que se establecieron *in vitro*, estén libres de alguna contaminación biológica y se mantengan como cultivos asépticos durante la manipulación, el crecimiento y almacenamiento (Cassells, 2012).

En aguacate, al igual que otras especies vegetales, el pretratamiento de las plantas madre es clave para el éxito del establecimiento de los cultivos, en este aspecto, las

plantas donadoras pueden ser asperjadas con soluciones bactericidas y fungicidas para disminuir la carga microbiana (Cooper, 1987; Dalsaso y Guevara, 1988; Zirari y Lionakis, 1994).

Después de la escisión del material vegetal de la planta madre, se lleva a cabo un tratamiento de asepsia. Para ello no existen reglas porque el tratamiento dependerá de cuan limpio o sucio se encuentre el material vegetal. El protocolo seleccionado deberá ser el que dañe menos al explante. El agente limpiador más utilizado son las soluciones comerciales de hipoclorito de sodio (NaClO) en diferentes concentraciones, a los cuales puede adicionarse un agente surfactante, Tween-20, el cual reduce la tensión superficial del material mientras se limpia, permitiendo de este modo que el blanqueador sea más efectivo (Kyte y Kleyn, 1996; Smith, 2013).

Dentro de la micropropagación de aguacate existen diversos métodos utilizados para la desinfección de diferentes explantes.

Los cultivares de aguacate Dade, Maxima, Cataloia, Tower 2, Choquette, Hass, Suardía y Jaruco No. 1, se han establecido a partir de semillas utilizando detergente comercial y agua potable para la limpieza superficial, y una solución de blanqueador comercial al 20 % (v/v) hasta por 20 min (Mohamed-Yassen, 1993; Barringer *et al.*, 1996) o sumergiendo las semillas en etanol 96 % y después flamearlas dentro de la campana de flujo laminar (Rodríguez *et al.*, 1999).

Por su parte, Campos y Pais (1996), utilizaron una solución de etanol 80 % por 10 min para la desinfección superficial de semillas de *Persea indica* L. (Spreng.), seguido de una inmersión en NaClO 10 % por 30 min. Mientras que Cob *et al.* (2010), para semillas

de *P. lingue* Miers usaron etanol al 70 % por 5.0 min y después una solución de blanqueador comercial al 50 % (v/v) por 20 min.

En cambio, los cultivares Duke 7, Velvick, Lula, Hopkins, Hass, Fuerte, IV-8, RR-86 y material de la raza Mexicana, se han establecido a partir de microestacas y yemas axilares. Estos explantes generalmente se limpian bajo el chorro de agua, en tiempos que van de 30 a 120 min, con la finalidad de eliminar la máxima cantidad de fenoles. Después se colocan en etanol a concentraciones de 70 hasta 95 %, en tiempos que no deben rebasar 1.0 min. Las concentraciones de NaClO más utilizadas son de 0.5 a 2.0 % por hasta 30 min, aunque en algunos casos, la concentración del blanqueador comercial puede ser hasta de 60 % (v/v). La adición de detergente surfactante Tween-20 o Tween-80 es constante (Harty, 1985; Cooper, 1987; Dalsaso y Guevara, 1988; Zirari y Lionakis, 1994; Castro *et al.*, 1995; Barceló-Muñoz *et al.*, 1999; Rodríguez *et al.*, 1999; De la Viña *et al.*, 2001; Vidales-Fernández, 2002; Nhut *et al.*, 2008; Zulfiqar *et al.*, 2009; Cortés-Rodríguez *et al.*, 2011).

En algunos casos se pueden utilizar soluciones bactericidas-fungicidas por hasta 20 min (Dalsaso y Guevara, 1988; Vidales-Fernández, 2002; Cortés-Rodríguez *et al.*, 2011). Dalsaso y Guevara (1988) y Nhut *et al.* (2008), sustituyen el NaClO por cloruro mercúrico (0.15-1.0 %). De igual forma se reporta el uso de antioxidantes, como ácido ascórbico, ácido cítrico y PVP (polivinilpirrolidona), para reducir la oxidación de lo explantes antes de proceder a sembrarlos (Dalsaso y Guevara, 1988; Castro *et al.*, 1995; Rodríguez *et al.*, 1999)

2.9.3 Medio de cultivo

Las formulaciones minerales son clave importante en el establecimiento del cultivo de aguacate (Barceló-Muñoz y Pliego-Alfaro, 2003). La fórmula del medio MS (Murashige y Skoog, 1962), ha sido utilizada en algunas investigaciones (Dalsaso y Guevara, 1988; Mohamed-Yasseen, 1993; Barringer *et al.*, 1996; Campos y Pais, 1996; Nhut *et al.*, 2008) o en combinación con vitaminas del medio B5 (Gamborg *et al.*, 1968) (Cortés-Rodríguez *et al.*, 2011). Formulaciones minerales de menor contenido iónico, como WPM (Lloyd y McCown, 1980) (Cooper, 1987; Castro *et al.*, 1995), MS con macroelementos en concentraciones de 20-80 %, el cual también puede utilizarse de doble fase (Barceló-Muñoz *et al.*, 1990; Zirari y Lionakis, 1995; Barceló-Muñoz *et al.*, 1999; Rodríguez *et al.*, 1999; Witjaksono *et al.*, 1999; De la Viña *et al.*, 2001; Vidales-Fernández, 2002; Zulfiqar *et al.*, 2009; Cob *et al.*, 2010), DF (Dixon y Fuller, 1976) (Harty, 1985; Rodríguez *et al.*, 1999) o N₄₅K (Margara, 1984) (Dalsaso y Guevara, 1988; Premkumar *et al.*, 2002, 2003) son más adecuados.

La citocinina utilizada comúnmente para el establecimiento de aguacate, es el BAP (6-bencilaminopurina), a concentraciones de 0.1 hasta 2.0 mg L⁻¹ (Barceló-Muñoz y Pliego-Alfaro, 1987; Cooper, 1987; Barceló-Muñoz *et al.*, 1990; Rodríguez *et al.*, 1999; De la Viña *et al.*, 2001).

2.9.4 Inducción de brotes

En la inducción de brotes de aguacate, la citocinina BAP es el regulador de crecimiento más utilizado, ya sea solo, a concentraciones de 0.1 a 6.0 mg L⁻¹ (Campos y Pais,

1996; Barceló-Muñoz *et al.*, 1999; Zirari y Lionakis, 1995; Witjaksono *et al.*, 1999; De la Viña *et al.*, 2001; Zulfiqar *et al.*, 2009) o en combinación con ácido indol-3-butírico (AIB) en concentraciones de 0.1 a 1.0 mg L⁻¹ (Cooper, 1987; Dalsaso y Guevara, 1988; Castro *et al.*, 1995; Rodríguez *et al.*, 1999; Vidales-Fernández, 2002; Cob *et al.*, 2010; Cortés-Rodríguez *et al.*, 2011), ácido 1-naftalenacético (ANA) (0.5 µM) (Mohamed-Yasseen, 1993; Barringer *et al.*, 1996), ácido giberélico (AG₃) (0.5-2.0 mg L⁻¹) (Dalsaso y Guevara, 1988; Castro *et al.*, 1995; Rodríguez *et al.*, 1999) o thidiazuron (TDZ) (0.2-2.0 mg L⁻¹) (Mohamed-Yasseen, 1993). Sin embargo, Harty (1985) utiliza concentraciones de hasta 60 mg L⁻¹ de BAP, cinetina o 2-isopenteniladenina (2iP). Además los medios de cultivo se pueden adicionar con antioxidantes, fungicidas o peptona (Dalsaso y Guevara, 1988; Castro *et al.*, 1995; Vidales-Fernández, 2002; Nhut *et al.*, 2008; Cortés-Rodríguez *et al.*, 2011).

2.9.5 Enraizamiento *in vitro*

Para el enraizamiento, los brotes deben tener un tamaño adecuado y una superficie foliar mínima; estos rasgos se pueden obtener después de mantener brotes de más de seis semanas en medio de proliferación; además es recomendable la dilución de las sales de los medios de cultivo (Cooper, 1987; Barceló-Muñoz y Pliego-Alfaro, 2003).

El proceso de enraizamiento puede incluir dos fases: la primera con auxina, para la inducción de raíces (hasta 4.92 µM AIB), y la segunda para su elongación, en medio MS con macroelementos al 30 %, sin reguladores de crecimiento, pero con 1.0 g L⁻¹

de carbón activado (Barceló-Muñoz *et al.*, 1990; Zirari y Lionakis, 1995; Barceló-Muñoz *et al.*, 1999; Witjaksono *et al.*, 1999; De la Viña *et al.*, 2001; Premkumar *et al.*, 2003), o con 8.0 g L⁻¹ de carbón activado y concentraciones de 5, 30 y 50 g L⁻¹ de sacarosa (Premkumar *et al.*, 2002). También los brotes se pueden sumergir en una solución concentrada esterilizada de AIB o ANA (1.0-5.0 g L⁻¹), durante unos segundos y después sembrarlos en un medio sin hormonas (Cooper, 1987; Campos y Pais, 1996). Así como también pueden permanecer en un medio con AIB, en concentraciones de 0.5 hasta 5.0 mg L⁻¹ (Barringer *et al.*, 1996; Campos y Pais, 1996; Rodríguez *et al.*, 1999; Vidales-Fernández, 2002; Zulfiqar *et al.*, 2009; Cortés-Rodríguez *et al.*, 2011). Por su parte, Nhut *et al.* (2008), recomiendan utilizar 2.0 % de peptona y 2.7 µM de ANA, para inducir raíces en brotes de aguacate.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Localización del experimento

La presente investigación se realizó en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal, de la Facultad de Agronomía, Unidad Marín de la Universidad Autónoma de Nuevo León UANL, ubicado en la carretera Zuazua-Marín km 17.5, durante el periodo Agosto 2013 a Mayo 2015.

3.2 Material vegetal

El germoplasma vegetal consistió en varetas de aproximadamente 5 a 10 cm de longitud, recolectadas de árboles de aguacate en desarrollo de los cultivares Huevo de Toro, Bacon, Mantequilla y R.H., provenientes del municipio de Aramberri, Nuevo León (Cuadro 1) (Figura 1).

Cuadro 1. Razas de aguacate de acuerdo al cultivar.

Cultivar	Raza
Huevo de Toro	Mexicana
Bacon	Mexicana x Guatemalteca
Mantequilla	Mexicana
R.H.	Mexicana



Figura 1. Varetas de aguacate utilizadas para la siembra, a) cv. Huevo de Toro, b) Bacon, c) Mantequilla, d) R.H.

3.3 Acondicionamiento previo del material vegetal

Con la finalidad de disminuir la presencia de patógenos presentes en los árboles de aguacate traídos de campo, se asperjaron dos veces por semana con una solución que contenía 2.0 g L⁻¹ de AGRY-GENT PLUS 800® (sulfato de gentamicina 2.0 %; clorhidrato de Oxitetraciclina 6.0 %) (Gowan® MEXICANA) y 2.0 g L⁻¹ de Antrak (Benomilo 50 %) (Agroquímica Tridente).

3.4 Pre-desinfección

Se seleccionaron varetas en óptimas condiciones con gran número de yemas, las cuales se lavaron con detergente comercial líquido (Axion®) y unas gotas de

blanqueador comercial (Cloralex[®]) y se enjuagaron con agua potable. Posteriormente, las varetas fueron seccionadas en unidades más pequeñas de 2 a 3 cm y se colocaron en agua potable y jabón líquido en tres lapsos de 10 min c/u y en agitación, con la finalidad de disminuir la cantidad de fenoles (Vidales-Fernández, 2002). Después se colocaron en una solución a base de bactericida vegetal (Microdyn[®]) 2.0 mL L⁻¹ y blanqueador comercial (Cloralex[®]) 2.0 mL L⁻¹ durante 15 min en agitación. Seguido a esto, se enjuagaron tres veces con agua bidestilada para colocarlos en una solución fungicida-bactericida, la cual contenía 2.0 g L⁻¹ de AGRY-GENT PLUS 800[®] (sulfato de gentamicina 2.0 %; clorhidrato de Oxitetraciclina 6.0 %) (Gowan[®] MEXICANA), 2.0 g L⁻¹ de Antrak 500 PH (Benomilo 50 %) (Agroquímica Tridente), 1.5 mL L⁻¹ de Amistar[®] Gold (azoxistrobin 18 %) (Syngenta[®]), 800 mg L⁻¹ de ácido ascórbico, 800 mg L⁻¹ de ácido cítrico, 2.0 mL L⁻¹ de bactericida vegetal (Microdyn[®]) y 30 g L⁻¹ de sacarosa, durante 1.5 horas en agitación. Concluido el tiempo, se enjuagó el material vegetal con agua bidestilada (Figura 2).

3.5 Técnica de desinfección

Una vez que se concluyó la fase de pre-desinfección de los explantes, se llevaron a la campana de flujo laminar con la finalidad de trabajar en condiciones de asepsia. La desinfección consistió en la inmersión del material vegetal en etanol absoluto durante 1.0 min, seguido de una inmersión en una solución de hipoclorito de sodio (NaClO) al 2.7 % (50 % v/v Cloralex[®]) más 0.02 % de Tween-20 durante 20 min en agitación. Concluido el tiempo, se enjuagó tres veces con agua bidestilada esterilizada. Inmediatamente el material vegetal se colocó en una solución de PVP 400 mg L⁻¹ para

reducir la oxidación del mismo. Finalmente, el material vegetal previamente desinfectado fue seccionado en segmentos internodales con una o dos yemas laterales (microestacas), de 1.0 cm de longitud para ser utilizados posteriormente en los medios de establecimiento (Figura 2).

3.6 Preparación del medio de cultivo

3.6.1 Establecimiento *in vitro*

Los explantes se sembraron en los medios de cultivo MS con macroelementos al 50 %, DCR (Gupta y Durzan, 1985), Yasuda (Yasuda *et al.*, 1985) y B5, suplementados con vitaminas, 30 (MS, DCR y Yasuda) y 20 g L⁻¹ (B5) de sacarosa, 2.0 mg L⁻¹ de BAP, 0.3 mg L⁻¹ de AIB, 2.0 g L⁻¹ de Oxitetraciclina y 2.0 g L⁻¹ de Benomilo. El pH de los medios de cultivo se ajustó a 5.5 ± 0.02 para B5, 5.7 ± 0.02 para MS y Yasuda y 6.0 ± 0.02 para DCR. Los medios de cultivo se solidificaron con 4.5 g L⁻¹ de Phytigel™ y se colocaron en recipientes de vidrio de 150 mL y finalmente se esterilizaron en autoclave a 1.2 kg cm⁻² durante 15 min.

3.6.2 Inducción de brotes

Después de 14 días del establecimiento *in vitro*, las microestacas viables se subcultivaron a los medios de cultivo MS con macroelementos al 50 %, DCR y Yasuda, adicionados con vitaminas, 30 g L⁻¹ de sacarosa y solidificados con 4.5 g L⁻¹ de Phytigel™; además suplementados de las combinaciones: 20 % de agua de coco (AC)

(C5915, Sigma-Aldrich USA), 2.0 mg L⁻¹ de BAP, 0.01 mg L⁻¹ de AIA (ácido indolacético) y 0.5 mg L⁻¹ de AG₃ (Sandoval-Prando *et al.*, 2014); 2.0 g L⁻¹ de caseína hidrolizada (CH) (22090, Sigma-Aldrich USA), 1.0 mg L⁻¹ de BAP y 0.3 mg L⁻¹ de AIB (Cuadro 2). El pH de los medios de cultivo se ajustó a 5.7 ± 0.02 en MS y Yasuda y 6.0 ± 0.02 en DCR. Posteriormente, los medios de cultivo se colocaron en recipientes de vidrio de 150 mL y se esterilizaron a 1.2 kg cm⁻² de presión a 121 °C durante 15 min.

Cuadro 2. Medios de cultivo utilizados para la etapa de inducción de brotes.

Medio	AC + BAP + AG₃ + AIA	CH + BAP + AIB
MS	M1	M4
DCR	M2	M5
Yasuda	M3	M6

3.6.3 Inducción de raíces

Brotes bien formados y de aproximadamente 1.0 cm de largo, fueron subcultivados al medio de cultivo Yasuda adicionado con vitaminas, 30 g L⁻¹ de sacarosa y 2.0 g L⁻¹ de carbón activado. El pH del medio se ajustó a 5.7 ± 0.02 y se solidificó con 4.5 g L⁻¹ de Phytigel™. Los brotes permanecieron durante 14 días en este medio de cultivo y fue con la finalidad de absorber la mayor parte de los residuos de los reguladores de crecimiento vegetal y suplementos de los medios de inducción, así como reducir la mayor cantidad de fenoles presentes en los brotes.

Una vez transcurrido el tiempo de permanencia en el medio de cultivo anterior, los brotes de aguacate, se sumergieron durante cinco segundos en una solución esterilizada de 3.0 g L⁻¹ de AIB; después se sembraron en los medios de inducción de raíces, los cuales fueron MS con macroelementos al 50 %, DCR y Yasuda, adicionados con vitaminas, 30 g L⁻¹ de sacarosa, 1.0 g L⁻¹ de carbón activado, 0.3 mg L⁻¹ de BAP, y suplementados de las concentraciones 0.5 y 1.0 mg L⁻¹ de AIB (Cuadro 3). El pH se ajustó a 5.7 ± 0.02 para los medios de cultivo MS y Yasuda y 6.0 ± 0.02 en DCR. Los medios de cultivo se solidificaron con 4.5 g L⁻¹ de Phytigel™, se colocaron en recipientes de vidrio de 150 mL, y posteriormente se esterilizaron a 1.2 kg cm⁻² de presión a 121 °C durante 15 min.

Cuadro 3. Medios de cultivo utilizados para la etapa de enraizamiento.

Medio	AIB mg L ⁻¹	
	0.5	1.0
MS	M1	M2
DCR	M3	M4
Yasuda	M5	M6

3.7 Siembra *in vitro* de cultivares de aguacate

Las microestacas de los cultivares de aguacate, se sembraron en los medios de cultivo antes mencionados en condiciones asépticas, dentro de la campana de flujo laminar. Los explantes se incubaron a una temperatura de 26 ± 2 °C bajo un fotoperiodo de 16 h luz y 8 h oscuridad.

3.8 Diseño experimental

En la etapa de establecimiento aséptico se evaluaron las variables de contaminación, oxidación y viabilidad de los explantes a 7 y 14 días. Los resultados se evaluaron por medio de estadística no paramétrica mediante Tablas de Contingencia utilizando la prueba de Ji-cuadrada (X^2).

El modelo estadístico utilizado para la etapa de inducción de brotes, fue un diseño completamente al azar con un arreglo factorial 4 x 6, donde el factor A fueron los cultivares y el factor B los medios de inducción utilizados, obteniendo un total de 24 tratamientos con ocho repeticiones. Se realizó un análisis de varianza y las diferencias entre las medias de los tratamientos, se compararon mediante la prueba de Tukey a 5 % de probabilidad, las variables que se evaluaron fueron: número de brotes por explante, longitud de los brotes y número de hojas a 8, 12 y 16 semanas después del establecimiento.

En la etapa de inducción de raíces, se utilizó un diseño completamente al azar con arreglo factorial 4 x 6, donde el factor A fueron los cultivares y el factor B los medios de inducción de raíces, obteniendo un total de 24 tratamientos con cinco repeticiones. Se realizó un análisis de varianza y las diferencias entre las medias de los tratamientos, se evaluaron mediante la prueba de Tukey a 5 % de probabilidad. Las variables evaluadas fueron: número de raíces por explante y longitud de raíces a ocho semanas después de la siembra. Los resultados fueron analizados mediante el programa estadístico Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) versión 21.

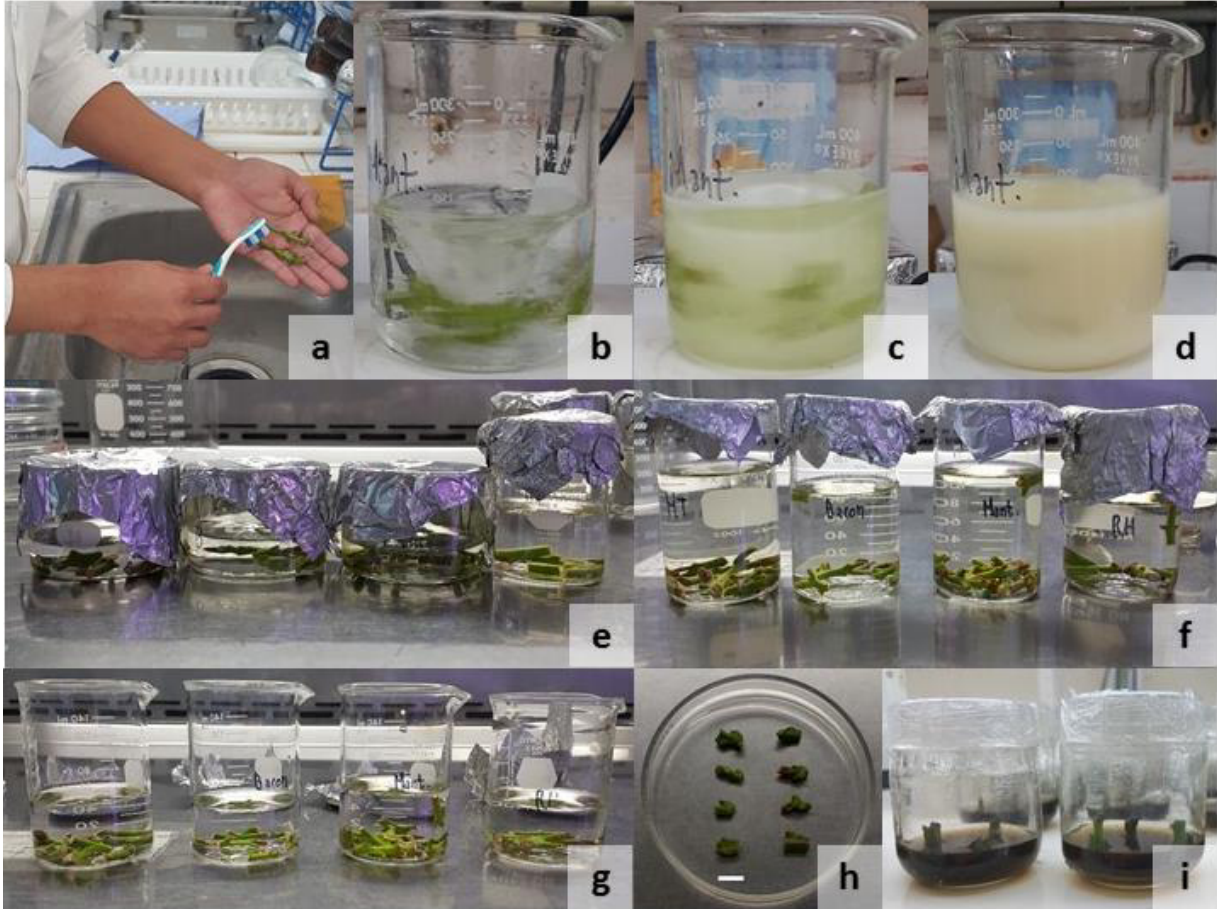


Figura 2. Pasos generales del establecimiento *in vitro* de explantes de aguacate, a) lavado superficial de varetas con jabón y agua potable, b) lavados con agua potable en agitación, c) solución bactericida + Cloralex[®], d) solución bactericida-fungicida, e) etanol absoluto, f) desinfección en campana, solución NaClO 2.7 %, g) permanencia en PVP, h) microestacas de aguacate antes de siembra, i) explantes en medio de cultivo.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Establecimiento aséptico

La contaminación microbiana y el oscurecimiento de explantes son las mayores dificultades para el establecimiento *in vitro* de cultivares de aguacate de la raza Mexicana (Cortés-Rodríguez *et al.*, 2011). El proceso de desinfección del material vegetal tuvo diversos efectos en las variables evaluadas.

4.1.1 Contaminación

La contaminación para los medios utilizados, en los cuatro cultivares a una semana de establecido el experimento, no rebasó el 42 %, con excepción del 62 % en el cultivar Mantequilla en el medio de cultivo DCR. A 14 días del establecimiento *in vitro*, los explantes presentaron mayor presencia de contaminación, inducida por hongos y bacterias. El medio de cultivo DCR en todos los cultivares, fue el que presentó los mayores índices de contaminación (< 60 %). Por el contrario, los explantes que se establecieron en el medio de cultivo Yasuda, tuvieron los menores porcentajes de esta variable (> 42 %) (Cuadro 4).

Resultados similares muestra Cooper (1987), con 70 % de contaminación en el cultivar Duke 7 en el medio WPM, reduciendo el efecto a 16 % con el uso de etanol 100 % por cinco segundos y una solución de NaClO 0.5 % durante 30 min. Por su parte Dalsaso y Guevara (1988), observaron el alto porcentaje de contaminación por bacterias en

microestacas del cultivar Fuerte, donde el uso de bactericida en la desinfección y tratamiento de la planta madre, no fueron efectivos para disminuir la contaminación, por lo que se sospecha que el patógeno se encuentra de forma endógena, situado posiblemente en los tejidos vasculares de la porción del tallo. En su investigación, Rodríguez *et al.*, (1999), obtuvieron porcentajes de contaminación por bacterias de hasta 47 %, utilizando embriones inmaduros de aguacate de los cultivares Hass, Suardía Estación, Catalina y Jaruco No. 1.

En contribución a lo anterior, Vidales-Fernández (2002), recomienda utilizar la combinación de Agrimycin y Benomilo en la pre-desinfección de los explantes, y una desinfección de hasta 40 % v/v de blanqueador comercial y sembrar los explantes en medio de cultivo adicionado con Benomilo hasta 2.0 g L⁻¹. Zulfiqar *et al.*, (2009), reportan hasta 72 % de contaminación por hongos y bacterias en microestacas del cultivar Fuerte, recomendando que 1.0 % de NaClO es suficiente para la desinfección del material sin dañar gravemente al explante. Sin embargo, las concentraciones de NaClO utilizadas en las investigaciones anteriores, son muy inferiores a la utilizada en la presente investigación (2.7 %, Cloralex® 50 % v/v), la cual en esa concentración y tiempo de permanencia de los explantes, fue efectiva para reducir los altos índices de contaminación. Cabe señalar que una concentración menor de los agentes desinfectantes (NaClO, bactericidas y fungicidas), utilizados en la etapa de establecimiento aséptico aumentan considerablemente la contaminación de las microestacas de los cultivares utilizados.

4.1.2 Oxidación

En el caso de la oxidación, se presentó a los 14 días del establecimiento *in vitro* de las microestacas, con resultados bajos en el medio MS (> 7 %) en los cultivares Huevo de Toro, Bacon y Mantequilla; resultados considerables (< 25 %) en los cuatro cultivares en el medio de cultivo B5; y resultados nulos en los medios DCR y Yasuda (Cuadro 4). El bajo porcentaje de oxidación en los explantes puede deberse al uso de los diferentes agentes antioxidantes en los procesos de desinfección, como el lavado del material vegetal con agua potable durante 30 min, reportado por Vidales-Fernández (2002), así como el uso de PVP reportado por Dalsaso y Guevara (1988). Investigaciones más recientes sugieren la adición de ácido ascórbico y carbón activado al medio de cultivo para reducir hasta un 70 % el proceso de oxidación (Cortés-Rodríguez *et al.*, 2011).

4.1.3 Viabilidad

La supervivencia de los explantes de los diferentes cultivares utilizados, en todos los medios de cultivo, fue superior a 60 % durante los primeros días del establecimiento *in vitro*, sin embargo, en el transcurso de la siguiente semana esta variable se vio afectada por los procesos de oxidación y contaminación (Figura 3). Cabe señalar que la viabilidad de las microestacas de los cuatro cultivares, se mantuvo estable en el medio de cultivo Yasuda, aún durante la segunda semana. Estos resultados son similares a lo reportado por Rodríguez *et al.* (1999), utilizando embriones inmaduros de aguacate de los cultivares Hass, Suardía Estación, Catalina y Jaruco No. 1, obteniendo porcentajes de supervivencia mayores al 30 % (Cuadro 4).

Cuadro 4. Porcentajes de contaminación, oxidación y viabilidad de microestacas de cuatro cultivares en cuatro medios de cultivo a 7 y 14 días del establecimiento *in vitro*.

Cultivar/Medio	Contaminación		Oxidación	Viabilidad	
	7 días	14 días	14 días	7 días	14 días
Huevo de Toro					
MS	41.86	60.46	2.32	58.13	37.2
DCR	39.02	63.41	0	60.97	36.58
Yasuda	17.8	23.28	0	82.19	76.71
B5	28.3	41.5	15.09	71.69	43.39
Bacon					
MS	12.5	37.5	6.25	87.5	56.25
DCR	27.77	66.66	0	72.22	33.33
Yasuda	15.06	35.61	0	84.93	64.38
B5	18.18	18.18	27.27	81.81	54.54
Mantequilla					
MS	31.81	65.9	6.81	68.18	27.27
DCR	61.7	78.72	0	38.29	21.27
Yasuda	23.17	41.46	0	76.82	58.53
B5	35.29	61.76	23.52	64.7	14.7
R.H.					
MS	30	60	0	70	40
DCR	0	60	0	100	40
Yasuda	22.72	28.4	0	77.27	71.59
B5	37.2	37.2	27.9	62.79	34.88

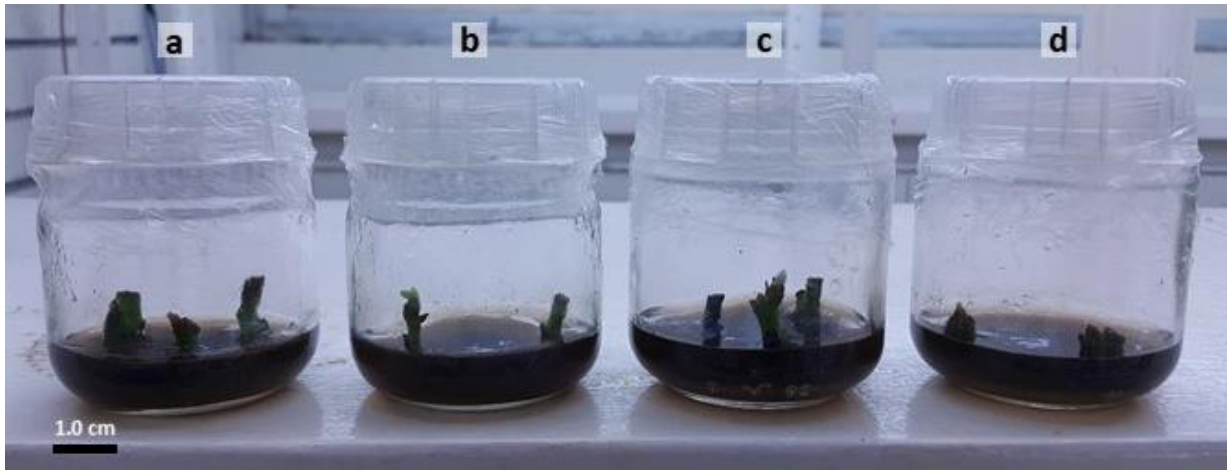


Figura 3. Explantes viables a 14 días del establecimiento *in vitro* sembrados en medio Yasuda a) cv. Huevo de Toro, b) Bacon, c) Mantequilla, d) R.H.

4.2 Tablas de contingencia

Las tablas de contingencia con pruebas de Ji-cuadrada (Cuadro 5), demostraron que en los medios de cultivo MS y DCR a los 7 días, las variables contaminación y viabilidad resultaron estar relacionadas a los cultivares utilizados, por lo que existe relación significativa entre las variables y los cultivares ($p \leq 0.05$), es decir, los porcentajes de contaminación y viabilidad en estos medios de cultivo en el tiempo evaluado, resultaron ser diferentes a lo obtenido en los otros medios. Lo contrario sucedió para las mismas variables en los medios Yasuda y B5, donde muestran independencia a los cultivares, por lo que no existe relación significativa entre la contaminación y viabilidad con los cultivares ($p \leq 0.05$), esto es, que los resultados obtenidos de ambas variables, fueron similares en estos medios de cultivo. A los 14 días del establecimiento *in vitro*, se demostró que los medios de cultivo MS, DCR y

Yasuda, en las variables contaminación, oxidación y viabilidad resultaron estar relacionadas con los cultivares de aguacate utilizados, por lo que los valores de estas variables resultaron ser distintos en los tres medios evaluados; mientras que el medio B5 muestra independencia a las mismas variables.

Cuadro 5. Significancia y prueba de Ji-cuadrada a 7 y 14 días del establecimiento *in vitro* en las variables contaminación, oxidación y viabilidad en los medios utilizados.

Medio de cultivo	Sig. $p \leq 0.05$		χ^2	
	7 días	14 días	7 días	14 días
MS	0.018	0.055	10.063	12.335
DCR	0	0.255	38.572	4.058
Yasuda	0.521	0.077	2.258	6.839
B5	0.286	0.006	3.781	18.124

4.3 Inducción de brotes

Explantos viables de los cuatro cultivares provenientes del establecimiento *in vitro*, se subcultivaron a los medios de inducción de brotes y se evaluaron las variables: número de brotes, longitud de brotes (en cm) y número de hojas a 8, 12 y 16 semanas del subcultivo.

4.3.1 Número de brotes

De acuerdo a la comparación de medias, se observa que el cultivar Bacon a 8 y 16 semanas, presenta los mayores valores de formación de brotes (1.31 y 2.22 brotes por

explante respectivamente, sig. $p \leq 0.05$). La cantidad de brotes para los cultivares Mantequilla y R.H. se encuentran entre 0.89 y 1.89. El cv. Huevo de Toro presentó una formación de brotes menor para 8 y 16 semanas (0.56 y 0.83). No se presentó diferencia significativa en la formación de brotes a 12 semanas para los cultivares utilizados (Cuadro 6).

En cambio, en el efecto de los medios de inducción en la formación de brotes, se tiene que el medio M3, es el más favorable a 8 y 12 semanas con valores de 1.53 y 2.68 brotes, sig. $p \leq 0.05$. Se presentaron valores intermedios en los medios M1, M2, M4 y M6, con promedios de brotes de 0.71 hasta 2.09 a 8 y 16 semanas, respectivamente. De igual forma no se presentó diferencia significativa en los medios de inducción a 12 semanas (Cuadro 7).

En el caso de la interacción cultivar por medio de inducción, el análisis de varianza demostró que existe diferencia significativa ($p \leq 0.05$) a 8, 12 y 16 semanas en la cantidad de brotes generados, sin embargo, la comparación de medias (Tukey 5 %), presentó grupos separados entre todos los cultivares y medios de inducción, resultando ser el cv. Mantequilla en el medio M3 (Yasuda + AC, BAP, AG₃ y AIA), con los valores más favorables en los tiempos evaluados, 2.5, 3.25 y 5.12 brotes en promedio por microestaca, respectivamente (Apéndice: Cuadros 14A, 16A y 18A).

Como se puede observar en las Figuras 4 y 5, la formación de brotes se presentó de manera uniforme, con el desarrollo de un brote principal y en algunos casos con la formación de brotes adventicios. En las Figuras 5 a y b, el cv. Mantequilla generó callo en la base de la microestaca en los medios M2 y M3, como respuesta a las concentraciones de los diferentes reguladores de crecimiento empleados, particularmente al agua de coco y AIA.

Resultados similares se han obtenido en el mismo tipo de explante, pero con modificaciones en la cantidad de reguladores de crecimiento utilizados, diferentes cultivares, época del año, así como el tipo y concentración de sales en el medio de cultivo, sin embargo, todos son constantes en el uso de BAP (0.1 hasta 5 mg L⁻¹) adicionado al medio de cultivo (Cooper, 1987; Dalsaso y Guevara, 1988; Zirari y Lionakis, 1994; Barceló-Muñoz *et al.*, 1999; Rodríguez *et al.*, 1999; Vidales-Fernández, 2002; Zulfiqar *et al.*, 2009; Cortés-Rodríguez *et al.*, 2011). Sandoval-Prando *et al.* (2014), mencionan que los reguladores de crecimiento desempeñan un papel clave en el desarrollo cualitativo y cuantitativo de los brotes. Estos resultados al igual que investigaciones previas, indican que el BAP, juega un importante papel en la inducción de brotes y su longitud en explantes de aguacate (Barceló-Muñoz y Pliego Alfaro, 2003; Zulfiqar *et al.*, 2009; Cortés-Rodríguez *et al.*, 2011); pero si se utilizan altas concentraciones de este regulador, no solo se reduce el número de brotes formados, sino que además se detiene el crecimiento de los mismos (Barceló-Muñoz y Pliego-Alfaro, 2003 y Cortés-Rodríguez *et al.* 2011). Sin embargo, en esta investigación no podemos atribuir los presentes resultados solo a la contribución de BAP, sino que también puede deberse a los diferentes reguladores de crecimiento y suplementos que se adicionaron a los medios de inducción, en este sentido, la adición de hidrolizados proteicos como la caseína hidrolizada, suministran a los medios de cultivo una fuente de calcio, fosfato, diferentes microelementos, vitaminas y una mezcla de alrededor de 18 aminoácidos (George *et al.*, 2008); en el caso del agua de coco, este suplemento es ampliamente utilizado en cultivo de tejidos vegetales, debido a sus propiedades reguladoras de crecimiento y actividad tipo citocinina, que promueve la división celular y un rápido crecimiento, complementando a los medios de cultivo como diferentes

aminoácidos, ácidos orgánicos, ácidos nucleicos, vitaminas, carbohidratos y altos contenidos de derivados de reguladores vegetales como zeatina y cinetina (Yong *et al.*, 2009). Por su parte, Sandoval-Prando *et al.*, 2014, indican que el uso de agua de coco en el medio de cultivo, normalmente no es suficiente para promover una multiplicación satisfactoria, por lo que sugieren su combinación con BAP y AG₃. Mientras que De la Viña *et al.* (2001), demostraron hasta 12.2 brotes por explante en el cv. RR-86, en medio MS sólido con 50 % de macronutrientes, 1.3 µM de BAP y una radiación lumínica de 60 µmol m⁻² s⁻¹. Al contrario, Nhut *et al.* (2008), sugieren que la formación de brotes en explantes de material juvenil de aguacate, se puede lograr solo con la adición de peptona al medio de cultivo, en concentraciones de 1.5, 2.0 y 3.0 %.

Cuadro 6. Comparación de medias de la respuesta de los cultivares de aguacate en el número de brotes a 8, 12 y 16 semanas.

Cultivar	Número de brotes		
	8	12	16
Huevo de Toro	0.56 b	0.77 a	0.83 b
Bacon	1.31 a	1.68 a	2.22 a
Mantequilla	1.04 ab	1.37 a	1.89 ab
R.H.	0.89 ab	1.16 a	1.31 ab

†Medias con la misma letra en cada columna no muestran diferencia significativa, Tukey sig. $p \leq 0.05$.

Cuadro 7. Comparación de medias sobre el efecto de los medios de inducción, en el número de brotes a 8, 12 y 16 semanas.

Medio	Número de brotes		
	8	12	16
M1	1.03 ab	1.12 a	1.37 ab
M2	1.28 ab	1.9 a	2.09 ab
M3	1.53 a	1.71 a	2.68 a
M4	0.71 ab	0.78 a	0.87 b
M5	0.4 b	0.62 a	0.78 b
M6	0.75 ab	1.34 a	1.59 ab

†Medias con la misma letra en cada columna no muestran diferencia significativa, Tukey sig. $p \leq 0.05$.

4.3.2 Longitud de brotes

El cv. Bacon presentó la mayor longitud de brotes en los tiempos evaluados, con medias de 0.66, 0.86 y 1.19 cm, (8, 12 y 16 semanas respectivamente, sig. $p \leq 0.05$). Las medias de los cultivares de aguacate de la raza Mexicana, presentaron valores inferiores, de 0.24 hasta 0.58 cm (Cuadro 8).

En cuanto que el efecto de los medios de inducción en el tamaño de los brotes, destaca el medio M3 (Yasuda + AC + BAP + AG₃ + AIA), para 8, 12 y 16 semanas (0.57, 0.73 y 1.01 cm respectivamente, sig. $p \leq 0.05$). Sin embargo, los medios M1, M2, M4 y M6 presentaron valores muy similares al medio M3 en los tres tiempos evaluados, de 0.24 hasta 0.81 cm. En todos los casos, se observa que el medio M5 es el menos favorecedor en el crecimiento de los brotes formados (Cuadro 9).

En la interacción cultivar por medio de inducción, el análisis de varianza sólo presentó diferencia significativa ($p \leq 0.05$) a las 16 semanas en la longitud de los brotes, y de

acuerdo a la comparación de medias, se presentaron grupos separados en todos los cultivares y medios de inducción, destacando el cv. Bacon en el medio M3 con el valor más favorable, 1.98 cm de longitud de brotes; esto como se puede apreciar en Apéndice: Cuadro 19A.

Como se describe anteriormente, el crecimiento de los brotes en los diferentes cultivares fue bajo, sin embargo no se observaron anomalías en los brotes para generar su crecimiento (Figuras 4 y 5). En las figuras 5 c y d, se observan casos particulares, en donde la longitud del brote principal superó los 3.0 cm.

Estos resultados coinciden con otras investigaciones, donde se reporta un crecimiento de entre 0.89 hasta 2.5 cm en diferentes cultivares de aguacate, utilizando los medios de cultivo MS con macroelementos modificados y DF (Dixon y Fuller, 1976); ambos con la presencia de BAP en concentraciones de 0.5 a 5.0 mg L⁻¹ (Dalsaso y Guevara, 1988; Zirari y Lionakis, 1994; Rodríguez *et al.*, 1999; Zulfiqar *et al.*, 2009; Cortés-Rodríguez *et al.*, 2011). Vidales-Fernández (2002), menciona que la reducción de los macroelementos en el medio MS resulta benéfico para el desarrollo de brotes, pero induce una reducción de los mismos y por consecuencia una menor cantidad de yemas axilares. Mientras que Barceló-Muñoz y Pliego-Alfaro (2003), sugieren que los brotes de aguacate en presencia de BAP, puede contribuir a una miniaturización de los mismos. Lo anterior puede sugerir el bajo crecimiento de los brotes en los medios utilizados, ya que el medio MS se utilizó con macroelementos al 50 %, mientras que el medio Yasuda es una modificación del medio MS con macroelementos al 25 % y vitaminas de Gamborg; el medio DCR difiere en la cantidad de nitrato de amonio y nitrato de potasio y se complementa con nitrato de calcio, además si a todo esto agregamos que los brotes permanecieron durante 16 semanas, en estos medios de

cultivo y en presencia de los diferentes reguladores de crecimiento y suplementos adicionados a los mismos.

Al contrario, Barringer *et al.* (1996), utilizando diferentes cultivares de la raza Antillana, demostraron un bajo crecimiento de brotes cuando el medio se adicionó con TDZ, hasta 9.0 μM . En cambio, Premkumar *et al.* (2003), obtuvieron valores promedio de hasta 3.45 cm de longitud de brotes en el cv. Gvaram-13, atribuyendo estos resultados a la adición de hasta 50 g L⁻¹ de sacarosa en medio MS al 33 % de macroelementos sin la adición de ningún regulador de crecimiento vegetal. Ahora bien, De la Viña *et al.* (2001), reportan valores de hasta 4.7 cm de longitud del brote principal en el cv. RR-86, cuando se utiliza un medio de doble fase y diferentes radiaciones lumínicas, sin embargo, la posibilidad de producirse hiperhidricidad en los brotes es alta. Finalmente, Nhut *et al.* (2008), confirman un bajo crecimiento de brotes de aguacate (0.83 cm), pero solo utilizando peptona como suplemento al medio de cultivo.

Cuadro 8. Comparación de medias de la respuesta de los cultivares de aguacate en la longitud de brotes a 8, 12 y 16 semanas.

Cultivar	Longitud de brotes (cm)		
	8	12	16
Huevo de Toro	0.24 b	0.38 b	0.49 b
Bacon	0.66 a	0.86 a	1.19 a
Mantequilla	0.36 ab	0.46 b	0.58 b
R.H.	0.27 b	0.34 b	0.44 b

†Medias con la misma letra en cada columna no muestran diferencia significativa, Tukey sig. $p \leq 0.05$.

Cuadro 9. Comparación de medias sobre el efecto de los medios de inducción en la longitud de brotes a 8, 12 y 16 semanas.

Medio	Longitud de brotes (cm)		
	8	12	16
M1	0.51 ab	0.66 ab	0.81 ab
M2	0.46 ab	0.53 ab	0.7 ab
M3	0.57 a	0.73 a	1.01 a
M4	0.36 ab	0.54 ab	0.71 ab
M5	0.17 b	0.27 b	0.36 b
M6	0.24 ab	0.33 ab	0.46 ab

†Medias con la misma letra en cada columna no muestran diferencia significativa, Tukey sig. $p \leq 0.05$.

4.3.3 Número de hojas

De igual manera, se observa que el cv. Bacon responde de mejor manera en la formación de hojas, en los tres tiempos evaluados, con medias de 3.3, 4.15 y 5.92 hojas por brote, sig. $p \leq 0.05$. En el caso de los cultivares de aguacate raza Mexicana, no se presentó diferencia significativa y los valores de número de hojas, fueron de 0.62 hasta 2.29 hojas por brote (Cuadro 10).

Por su parte, en la relación de los medios de inducción sobre el número de hojas, se presentó diferencia significativa en el medio M3 a 12 y 16 semanas con medias de 3.46 y 4.5 hojas por brote, sig. $p \leq 0.05$. No obstante, el medio M2 mostró valores muy cercanos, con promedios de 2.93 y 3.61 hojas a 12 y 16 semanas. Fue evidente el bajo efecto del medio M5 en el desarrollo de hojas. Cabe señalar que no se presentó diferencia significativa entre los medios a 8 semanas, encontrándose valores de 0.81 a 2.61 hojas (Cuadro 11).

Finalmente en la interacción de los cultivares con los medios de inducción, de acuerdo al análisis de varianza, se presentó diferencia significativa ($p \leq 0.05$) a las 8, 12 y 16 semanas en el número de hojas por brote, y en relación con la comparación de medias (Tukey 5 %), se observaron grupos separados entre todos los cultivares y los medios, destacando a 8 y 12 semanas el cv. Bacon en el medio M2 (DCR + AC + BAP + AG₃ + AIA), con los mejores valores, 6.87 y 7.68 hojas por brote respectivamente; mientras que a las 16 semanas, se presentaron en promedio hasta 10 hojas por brote, en el cv. Bacon pero en el medio M3. Lo anterior se puede observar en Apéndice: Cuadros 15A, 17A y 20A.

Es importante señalar que la formación de hojas en los diferentes cultivares de aguacate utilizados, se presentó de manera normal en la mayoría de los casos, con una lámina foliar bien desarrollada y una coloración saludable (Figuras 4 y 5).

Estos resultados son similares a lo reportado en otras investigaciones. Zirari y Lionakis (1994), utilizando los cultivares Topa-Topa, Fuerte, Hass y Duke obtuvieron valores de 3.9 hasta 8.25 hojas por explante, con material etiolado y no etiolado en medio MS de doble fase. De igual forma, De la Viña *et al.* (2001), obtuvieron valores de hasta 4.8 hojas por microestaca en el cv. RR-86, utilizando medio MS sólido o de doble fase y con diferentes radiaciones lumínicas (35, 60 y 85 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Por su parte, Premkumar *et al.* (2003), reportan en promedio hasta 12.8 hojas por brote del cv. Gvaram-13, utilizando diferentes concentraciones de sacarosa (5, 30 y 50 g L⁻¹), sin diferencia significativa entre las cantidades. Dalsaso y Guevara (1988), aportaron que las microestacas del cultivar Fuerte, presentan hojas muy desarrolladas de lámina totalmente extendida, a diferencia de utilizar yemas axilares, las cuales separadas de la porción del tallo, quedan libres de las correlaciones que estas tenían con el tejido e

inician un proceso morfogénico diferente, modulado por la capacidad interna y el medio de cultivo.

Cuadro 10. Comparación de medias de la respuesta de los cultivares de aguacate en el número de hojas a 8, 12 y 16 semanas.

Cultivar	Número de hojas		
	8	12	16
Huevo de Toro	0.62 b	1.21 b	1.66 b
Bacon	3.3 a	4.15 a	5.92 a
Mantequilla	1.87 b	2.1 b	2.29 b
R.H.	1.19 b	1.7 b	1.47 b

†Medias con la misma letra en cada columna no muestran diferencia significativa, Tukey sig. $p \leq 0.05$.

Cuadro 11. Comparación de medias sobre el efecto de los medios de inducción en el número de hojas a 8, 12 y 16 semanas.

Medio	Número de hojas		
	8	12	16
M1	2.16 a	2.85 ab	3.15 ab
M2	2.54 a	2.93 ab	3.61 ab
M3	2.61 a	3.46 a	4.5 a
M4	1.15 a	1.64 ab	2.34 ab
M5	0.81 a	1.09 b	1.43 b
M6	1.21 a	1.77 ab	2.0 b

†Medias con la misma letra en cada columna no muestran diferencia significativa, Tukey sig. $p \leq 0.05$.



Figura 4. Respuesta de los cultivares de aguacate utilizados en los medios de inducción de brotes a 12 semanas. a-c) cv. Huevo de Toro; d-f) cv. Bacon. a) M1, b) M2, c) M4, d) M1, e) M2, f) M3.



Figura 5. Respuesta de los cultivares de aguacate utilizados en los medios de inducción de brotes a 12 semanas. a-c) cv. Mantequilla; d-f) cv. R.H. a) M2, b) M3, c) M4, d) M1, e) M3, f) M4.

4.4 Inducción de raíces

Los brotes regenerados *in vitro* se mantuvieron durante dos semanas en el medio de cultivo Yasuda con 2.0 g L^{-1} de carbón activado, sin reguladores de crecimiento vegetal. Durante este tiempo, se observó la elongación y rejuvenecimiento de los brotes, la formación de nuevas hojas y la disminución de oxidación (Figura 6). Thomas (2008), menciona que el uso de carbón activado en cultivo de tejidos vegetales, promueve el crecimiento y desarrollo celular, jugando un papel crítico en la micropropagación, embriogénesis somática, enraizamiento, elongación de tallos, etc., ya que entre los efectos que produce, están la adsorción irreversible de compuestos inhibitorios en el medio de cultivo, y la disminución sustancial de metabolitos tóxicos, exudación fenólica y la acumulación de exudados que producen oscurecimiento. Vidales-Fernández (2002), menciona que se puede presentar enraizamiento en brotes de aguacate criollo, cuando en el medio de cultivo no se agregan reguladores de crecimiento vegetal, pero en baja proporción, uno de cada diez brotes, lo cual no coincide con lo establecido en la presente investigación, ya que los brotes no permanecieron durante un mayor tiempo en el medio de cultivo sin reguladores.

Después de la permanencia en el medio de cultivo anterior, los brotes se sumergieron en una solución de 3.0 g L^{-1} de AIB durante cinco segundos, en condiciones asépticas, para proceder a sembrarlos en los medios de enraizamiento como se puede observar en el Cuadro 3. En estos medios de cultivo, se presentó clorosis en el ápice de las hojas, lo que provocó su marchitamiento y finalmente una alta defoliación. De igual forma, particularmente en brotes de aguacate criollo, se presentó un necrosamiento apical, el cual en la mayoría de los casos terminó por intoxicar a los brotes y finalmente

la muerte de los mismos después de cuatro semanas de haber realizado la siembra, lo cual no se pudo evitar con la adición de carbón activado en los medios de cultivo (Figura 7). Estos efectos son similares a lo que reportan Zirari y Lionakis (1994), utilizando una concentración de 1.0 mg L^{-1} de AIB, en brotes de aguacate de los cultivares Topa-Topa, Hass y Fuerte, donde se presentó una alta tasa de necrosamiento, lo que contribuyó a la caída de las hojas y nulo crecimiento. Sin embargo, Cortés-Rodríguez *et al.* (2011), si lograron inducir la formación de raíces en cultivares de la raza Mexicana (*P. americana* var. *drymifolia*), con una concentración de 0.5 mg L^{-1} de AIB.



Figura 6. Efecto del carbón activado adicionado al medio de cultivo, en brotes de aguacate regenerados *in vitro* cv. Bacon.

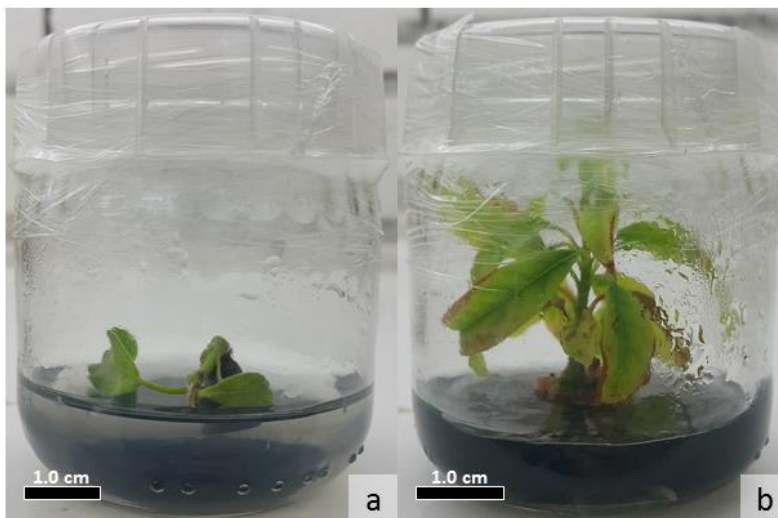


Figura 7. Efecto de los medios de enraizamiento durante las primeras cuatro semanas en brotes de aguacate. a) cv. Huevo de Toro en M2, b) cv. Bacon en M3.

El cultivar Bacon fue el único capaz de generar raíces (Figura 8). Los medios M2 y M3 resultaron efectivos para inducir la formación y crecimiento de raíces, además de promover la generación de callo (Cuadro 12). El análisis de varianza demostró diferencia significativa en los medios de enraizamiento utilizados, en las variables número y longitud de raíces a ocho semanas, resultado ser el medio M2, el más favorable para ambas variables con una media de 1.8 raíces por brote y 2.76 cm en cuanto a la longitud de las raíces (sig. $p \leq 0.05$). En significancia continua el medio M3 con 0.4 raíces por brote y 0.28 cm en longitud de raíces (sig. $p \leq 0.05$). Los medios M1, M4, M5 y M6 no favorecieron la formación y desarrollo de raíces en brotes regenerados *in vitro* del cv. Bacon (Cuadro 13).

Cuadro 12. Porcentajes de formación de raíces en brotes regenerados *in vitro* de aguacate del cultivar Bacon a ocho semanas.

Medio de enraizamiento					
M1	M2	M3	M4	M5	M6
0	60	40	0	0	0

Cuadro 13. Comparación de medias en las variables número y longitud de raíces en brotes de aguacate cv. Bacon en los medios de enraizamiento a ocho semanas.

Medio de enraizamiento	Número de raíces	Longitud de raíces
M1	0.0 b	0.0 b
M2	1.8 a	2.76 a
M3	0.4 ab	0.28 ab
M4	0.0 b	0.0 b
M5	0.0 b	0.0 b
M6	0.0 b	0.0 b

†Medias con la misma letra en cada columna no muestran diferencia significativa, Tukey sig. $p \leq 0.05$.



Figura 8. Formación de raíces en brotes del cultivar Bacon a 8 semanas. a) M2, b) M3.

Una de las dificultades fundamentales que tiene la micropropagación de especies leñosas es la inducción de enraizamiento (Rodríguez *et al.*, 1999), por lo que la dilución de sales en los medio de cultivo, mejora la capacidad de formación de raíces en brotes juveniles de aguacate (Pliego-Alfaro, 1981; Cooper, 1987; Pliego-Alfaro, 1988; Barceló-Muñoz *et al.*, 1990). La fase de inducción y elongación de raíces es muy sensible a la concentración de auxinas, y puede ser inhibido por una alta concentración (Ahmad *et al.*, 2003).

Con respecto al número y longitud de raíces, los resultados obtenidos son similares a lo que se reporta en otras investigaciones.

Cooper (1987), quien fue pionero en utilizar soluciones concentradas de AIB y ANA (1.0 o 3.0 g L⁻¹), confirma un enraizamiento normal en brotes de aguacate del cv. Hopkins, sin embargo la formación de callo es evidente. En tanto que, Campos y Pais (1996) con brotes de *Persea indica*, sugieren utilizar una solución de 3.0 g L⁻¹ de AIB y después sembrar en un medio MS al 50 % de concentración y sin reguladores.

En cambio, si el enraizamiento se realiza con la permanencia de los brotes en un medio con auxina, Barringer *et al.* (1996), mencionan que concentraciones mayores de 9.8 µM de AIB, no favorecen el enraizamiento de los cultivares Cataloina, Choquette, Dade, Maxima y Tower-2. Por su parte, Zulfiqar *et al.* (2009) recomiendan que las concentraciones no deben rebasar 1.5 mg L⁻¹ de AIB para el cultivar Fuerte. Sin embargo, Rodríguez *et al.* (1999), han obtenido resultados favorables con 2.0 mg L⁻¹ de AIB en embriones maduros de los cultivares Hass, Suardía, Catalina y Jaruco No.1, y reportan hasta 98 % de enraizamiento con brotes del cv. Duke 7, utilizando 5.0 mg L⁻¹ de AIB y 1.0 mg L⁻¹ de AG₃ en medio DF. No obstante, con esta misma concentración de auxina, Campos y Pais (1996) reportan clorosis y generación de callo, sin formación de raíces en brotes de *P. indica*. Al contrario, Vidales-Fernández (2002), no reporta problemas de necrosis en brotes, ni clorosis en hojas en brotes de aguacate criollo, y recomienda 0.4 mg L⁻¹ de AIB para una adecuada formación y elongación de raíces, sin la presencia de callo. Cooper (1987) menciona que el porcentaje de enraizamiento, sí se utiliza material juvenil, puede ser alto, alrededor de 90 y 100 % cuando se utiliza una solución concentrada de auxinas y después sembrar en medio sin reguladores; por el contrario disminuye drásticamente (40-60 %), si los brotes permanecen en un medio con auxina, aún si es a una baja concentración. Por

lo anterior, la posible causa del necrosamiento y marchitamiento de las hojas en la presente investigación, puede deberse a que además de utilizar una solución concentrada de AIB, los brotes se transfirieron a medios con diferentes concentraciones de auxina.

Una de las maneras de evitar lo anterior, es con el procedimiento descrito por Barceló-Muñoz *et al.* (1990), donde los brotes de aguacate se colocan en un medio líquido con diferentes concentraciones de AIB durante tres días, y después se transfieren al mismo medio de cultivo con carbón activado, pero sin reguladores de crecimiento. Con esta metodología Barceló-Muñoz *et al.* (1999), Witjaksono *et al.* (1999) y De la Viña *et al.* (2001), obtuvieron resultados favorables para el porcentaje de enraizamiento, formación y longitud de raíces en diferentes cultivares de aguacate, ya que el medio líquido tiene un efecto significativo en la inducción de raíces, el cual aumenta la disponibilidad de agua, sin embargo, se debe considerar que este procedimiento puede generar hiperhidricidad en los brotes de aguacate.

Finalmente como recomendaciones, Nhut *et al.* (2008) sugieren utilizar peptona en el medio de cultivo y bajas concentraciones de auxina, para inducir enraizamiento en brotes de aguacate, ya que es posible que la peptona mantenga el crecimiento de los brotes, y la auxina promueva la generación de raíces. Mientras que Cooper (1987), propone que la inducción de raíces sea *in vivo*, colocando los brotes en una solución de 3.0 g L^{-1} de ANA durante un segundo y después sembrarlos en sustrato.

5. CONCLUSIONES

Las técnicas de pre-desinfección y desinfección fueron adecuadas para el establecimiento aséptico de los cultivares de aguacate utilizados.

Las sales minerales del medio de cultivo Yasuda, son óptimas para la etapa de establecimiento de microestacas en los cuatro cultivares de aguacate utilizados.

El cv. Bacon presentó los mayores valores en el número y longitud de brotes y número de hojas en los tiempos evaluados.

En la inducción de brotes, el M3 es adecuado para iniciar la presencia, proliferación, longitud de brotes, y número de hojas en los cultivares evaluados.

En el enraizamiento *in vitro*, el medio M2 permitió la formación y crecimiento de raíces en brotes del cv. Bacon.

6. LITERATURA CONSULTADA

- Acosta-Díaz, E., I. Hernández-Torres, I. H. Almeyda-León. 2012. Evaluación de aguacates criollos en Nuevo León, México: región sur. *Rev. Mex. Cienc. Agríc*, 3(2): 245-257.
- Ahmad, T., H. U. Rehman, C. M. S. Ahmed, M. H. Leghari. 2003. Effect of culture media and growth regulators on micropropagation of peach rootstock GF 677. *Pak. J. Bot.*, 35(3): 331-338.
- Ayala-Silva, T., N. Ledesma. 2014. Avocado History, Biodiversity and Production. En: Nandwani, D. (ed.). Sustainable Horticultural Systems, Sustainable Development and Biodiversity 2. *Springer International Publishing Switzerland*, pp. 157-205.
- Barceló-Muñoz, A., F. Pliego-Alfaro. 1987. Multiplicación *in vitro* de tallos adultos de aguacate (*Persea americana* Mill). *Actas II Congreso Nacional SECH*, 1986. Córdoba, España, 2: 915-918.
- Barceló-Muñoz, A., F. Pliego-Alfaro, J. M. Barea. 1990. Micropropagación de aguacate (*Persea americana* Mill.) en fase juvenil. *Actas de Horticultura*, 1, 503-506.

- Barceló-Muñoz, A., C. L. Encina, E. Simón-Pérez, F. Pliego-Alfaro. 1999. Micropropagation of adult avocado. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 58, 11-17.
- Barceló-Muñoz, A., F. Pliego-Alfaro. 2003. Micropropagation of avocado (*Persea americana* Mill.). En: Mohan-Jain, S., K. Ishii (eds.). Micropropagation of Woody Trees and Fruits, *Forestry Sciences*, 75, Springer, pp. 519-542.
- Barrientos-Priego, A. F., L. López-López. 2002. Historia y genética del aguacate. En: *Memoria de la Fundación Salvador Sánchez Colín*. Centro de Investigaciones Científicas y Tecnológicas del Aguacate en el Estado de México, Coatepec de Harinas, México, pp. 100-121.
- Barrientos-Priego, A. F., R. B. Muñoz, J. C. Reyes, M. W. Borys, M. T. Martínez. 2007. Taxonomía, cultivares y portainjertos. En: Téliz, D., A. Mora (eds.). El aguacate y su manejo integrado. 2da edición. Ediciones Mundi-Prensa México, S. A. de C. V., México, pp. 29-62.
- Barringer, S. A., Y. Mohamed-Yasseen, W. E. Splittstoesser. 1996. *In vitro* multiplication and plantlet establishment of avocado. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant*, 32, 119-121.
- Bender, G. S. 2012. Avocado production in California. A cultural handbook for growers. 2nd edition. *Univ Calif Exp Program*, Cap. 2, pp. 1-32.
- Ben-Ya'acov, A. 1987. Avocado rootstock-scion relationships. *South Afric. Avocado Growers Assoc. Yrbk.*, 10: 30-32.

- Ben-Ya'acov, A., E. Michelson. 1995. Avocado rootstocks. *Horticultural Reviews*. John Wiley & Sons, Inc., New York.
- Ben-Ya'acov, A., A. Solis, E. Peri. 1995. Progress of the study of avocado genetic resources in Costa Rica. *Program and Book of abstracts of the World Avocado Congress III*. October 22-27. Tel Aviv, Israel, p. 109.
- Bergh, B. O. 1969. Avocado (*Persea americana* Miller). En: Ferwerda, F. P., F. Wit (eds.). *Outlines of perennial crop breeding in the tropics*. Agricultural University Wageningen, The Netherlands, pp. 23-51.
- Bergh, B. O., N. Ellstrand. 1986. Taxonomy of the avocado. *California Avocado Society Yearbook*, 70, 135-146.
- Bergh, B. O. 1992. The origin, nature, and genetic improvement of the avocado. *Calif. Avocado Soc. Yearbook*, 76, 61-75.
- Bhojwani, S. S., M. K. Razdan. 1996. *Plant Tissue Culture: Theory and Practice*-a revised edition. Elsevier, Amsterdam.
- Bhojwani, S. S., P. K. Dantu. 2013. Micropropagation. *Plant Tissue Culture: An Introductory Text 17*: 245-274.
- Brokaw, W. H. 1987. Avocado clonal propagation. *Proc. Int. Plant Prop. Soc.*, 37: 97-103.
- Campbell, C. W., S. E. Malo. 1976. A survey of avocado cultivars. En: Sauls, J. W., Phillips, R. L., Jackson, L. K. (eds.). *The avocado. Proc. 1st Sub-Tropical Fruit Short Course*, Univ Florida Coop Ext Serv, pp. 20-24.

- Campos, P. S., M. S. S. Pais. 1996. *In vitro* micropropagation of the macarronesian evergreen tree *Persea indica* (L.) K. Spreng. *In Vitro Cell Dev. Biol.-Plant*, 32, 184-189.
- Cassells, A. C. 2012. Pathogen and biological contamination management in plant tissue culture: phytopathogens, *vitro* pathogens, and *vitro* pests. En: Loyola-Vargas, V. M., N. Ochoa-Alejo (eds.), *Plant Cell Culture Protocols, Methods in Molecular Biology*, 877: 57-80.
- Castro, M., E. Oyanedel, R. Cautin. 1995. *In vitro* shoot proliferation in avocado (*Persea americana* Mill) induced by CPPU. *Proceedings of the World Avocado Congress III*, pp. 223-226.
- Cob, J., A. M. Sabja, D. Ríos, A. Lara, P. J. Donoso, L. Arías, B. Escobar. 2010. Potencial de la organogénesis como estrategia para la masificación *in vitro* de *Persea lingue* en la zona centro-sur de Chile. *Bosque*, 31(3): 202-208.
- Cooper, P. A. 1987. Advances in the micropropagation of avocado (*Persea americana* Mill.). *Acta Horticulturae*, 212(2), 571-575.
- Cortés-Rodríguez, M. A., R. López-Gómez, M. M. Martínez-Pacheco, L. M. Suárez-Rodríguez, A. Hernández-García, R. Salgado-Garciglia. 2011. *In vitro* propagation of Mexican race avocado (*Persea americana* Mill var. *drymifolia*). *Acta Hort.*, 923: 47-52.
- Chanderbali, A. S., V. A. Albert, V. E. Ashworth, M. T. Clegg, R. E. Litz, D. E. Soltis, P. S. Soltis. 2008. *Persea americana* (avocado): bringing ancient flowers to fruit in the genomics era. *BioEssays*, 30: 386-389.

- Chanderbali, A. S., D. E. Soltis, P. S. Soltis, B. N. Wolstenholme. 2013. Taxonomy and Botany. En: Schaffer, B., B. N. Wolstenholme, A. W. Whiley (eds) The avocado. Botany, production and uses. 2nd edition. CABI, pp. 31-50.
- Crane, J. H., C. F. Balerdi, I. Maguire. 2013a. Avocado growing in the Florida home landscape. <http://edis.ifas.ufl.edu/MG213> (citado: 12/02/2014).
- Crane, J. H., G. Douhan, B. A. Faber, M. L. Arpaia, G. S. Bender, C. F. Balerdi, A. F. Barrientos-Priego. 2013b. Cultivars and Rootstocks. En: Schaffer, B., B. N. Wolstenholme, A. W. Whiley (eds.) The avocado. Botany, production and uses. 2nd edition. CABI, pp. 200-233.
- Dalsaso, L., E. Guevara. 1988. Multiplicación clonal *in vitro* del aguacate (*Persea americana*) cv. "Fuerte". *Agronomía Costarricense*, 13(1): 61-71.
- De la Viña, G., A. Barceló-Muñoz, F. Pliego-Alfaro. 2001. Effect of culture media and irradiance level on growth and morphology of *Persea americana* Mill microcuttings. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 65, 229-237.
- De Filippis L. F. 2014. Crop improvement through tissue culture. *In*: Ahmad P., Wani, M. R., Azooz, M. M. and Tran, L. S. P. (eds.). Improvement of crops in the era of climatic changes. Springer New York, pp. 289-346.
- Ding, H., Y. W. Chin, A. D. Kinghorn, S. M. D'Ambrosio. 2007. Chemopreventive characteristics of avocado fruit. *Seminars in Cancer Biology*, 17: 386-394.
- Dixon, A., K. W. Fuller. 1976. Effect of syntetic auxin levels on *Phaseolus vulgaris* L. *Physiological Plant Pathology*, 11: 287-292.

- Eyres, L., N. Sherpa, G. Hendricks. 2001. Avocado oil: a new edible oil from Australia. *J. of Lipid Tech.*, 84-88.
- FAO. 2013. FAOSTAT database. <http://faostat.fao.org/site/291/default.aspx> (citado: 24/05/2015).
- Galindo-Tovar, M. E., A. M. Arzate-Fernández, N. Ogata-Aguilar, I. Landero-Torres. 2007. The avocado (*Persea americana*, Lauraceae) crop in Mesoamerica: 10,000 years of history. *Harvard Papers in Botany*, 12(2), 325-334.
- Galindo-Tovar, M. E., N. Ogata-Aguilar, A. M. Arzate-Fernández. 2008. Some aspects of avocado (*Persea americana* Mill.) diversity and domestication in Mesoamerica. *Genet Resour Crop Evol*, 55, 441-450.
- Gamborg, O., R. Miller, K. Ojima. 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp. Cell Res*, 50, 151-158.
- George, E. F., M. A. Hall, G. J. De Klerk. 2008. Chapter 3: The components of plant tissue culture media I: macro- and micro-nutrients. En: Plant propagation by tissue culture. 3rd edition, XII, pp. 65-113.
- Gupta, P. K., D. J. Durzan 1985. Shoot multiplication from mature trees of Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*) and sugar pine (*Pinus lambertiana*). *Plant Cell Reports*, 4: 177-179.
- Gutiérrez-Díez, A., J. Martínez-de la Cerda, E. A. García-Zambrano, L. Iracheta-Donjuan, J. D. Morales-Ocampo, I. M. Cerda-Hurtado. 2009. Estudio de diversidad genética del aguacate nativo en Nuevo León, México. *Rev. Fitotec. Mex.*, 32(1): 9-18.

- Hartmann, H. T., D. E. Kester, F. T. Davies, R. L. Geneve. 2002. Hartmann and Kester's Plant Propagation. Seventh edition. Prentice Hall. New Jersey, USA, pp. 880.
- Harty, P. A. 1985. Propagation of avocados by tissue culture: development of a culture medium for multiplication of shoots. *South African Avocado Growers' Association, Yearbook, 8*: 70-74.
- Knight, R. J. Jr. 1999. Genetic diversity in avocado. En: Arpaia, M. L., R. Hofshi (eds.). *Proceedings of avocado brainstorming '99*, University of Florida, Homestead, 27-29 october.
- Knight, R. J. Jr. 2002. History, distribution and uses. En: Whiley, A. W., B. Schaffer, B. N. Wolstenholme (eds.). *The avocado: botany, production and uses*. CABI, Wallingford, pp. 1-14.
- Köhne, J. S. 1992. Field evaluation of "Hass" avocado grown on Duke-7, G6 and G755C rootstocks. En: Lovatt, C., P. A. Holthe, M. L. Arpaia (eds.). *Proceedings of the Second World Avocado Congress, 1*, University of California, Riverside, California, pp. 301-303.
- Kumar, P. P., C. S. Loh. 2012. Plant tissue culture for biotechnology. En: Altman, A., P. M. Hasegawa (eds.). *Plant Biotechnology and Agriculture. Prospects for the 21st Century*. Elsevier, pp. 131-138.
- Kyte, L., J. Kleyn. 1996. *Plants from test tubes, an introduction to micropropagation*. Third edition. Timber Press. Portland, Oregon, USA, pp. 60-75.

- Litz, R. E., S. H. T. Raharjo, M. A. Gómez-Lim. 2007. Avocado. En: Pua, E. C., M. R. Davey (eds.). *Transgenic crops V. Biotechnology in agriculture and forestry*. Springer, Berlin, pp. 167-187.
- Lloyd, G. B., B. H. McCown. 1980. Commercially feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. *Int. Plant Prop. Soc. Com. Proc.*, 30: 421-427.
- Lyle, S. 2006. *Fruit and nuts*. Timber Press, Portland, Oregon.
- Margara, J. 1984. Bases de la multiplicación vegetativa. INRA. Versailles, Paris. p. 262.
- Márquez-Martín, B., A. Barceló-Muñoz, F. Pliego-Alfaro, C. Sánchez-Romero. 2012. Somatic embryogenesis and plant regeneration in avocado (*Persea americana* Mill.): influence of embryogenic culture type. *J. Plant Biochem. Biotechnol*, 21 (2), 180-188.
- Mohamed-Yasseen, Y. 1993. *In vitro* propagation of avocado (*Persea americana* Mill). *California Avocado Society, Yearbook*, 77: 107-111.
- Moreno-Limón, S., A. Rocha-Estrada, M. A. Alvarado-Vázquez, M. Salgado-Mora, E. P. Pinson-Rincón. 2010. *Aguacate. Variedades, cultivo y producción en Nuevo León*. 1° edición. Universidad Autónoma de Nuevo León, pp. 1-148.
- Murashige, T., F. Skoog. 1962. A revised médium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiology Plantarum*, 15: 473-497.

- Nhut, D. T., N. N. Thi, B. L. T. Khiet, V. Q. Luan. 2008. Peptone stimulates *in vitro* shoot and root regeneration of avocado (*Persea americana* Mill). *Scientia Horticulturae*, 115: 124-128.
- Ospina, J. A. (2002). *Persea americana* Mill. Lauraceae (Laurel Family). En: Vozzo, J. A. (ed.). Tropical tree seed manual. USDA, Forest Service, *South For. Exp. Stat. Bot. Gard.*, 14:1-120.
- Pérez-Rosales, R., S. Villanueva-Rodríguez, R. Cosío-Ramírez. 2005. El aceite de aguacate y sus propiedades nutricionales. *e-Gnosis* 3(10): 1-11.
- Pliego-Alfaro, F. 1981. A morphogenetic study of the avocado (*Persea americana* Mill) *in vitro*. I. Development of a rooting bioassay and its application to studying restoration by grafting of rooting competence in adults shoots. II. Somatic embryogenesis in callus. PhD thesis, University of California, Riverside, USA.
- Pliego-Alfaro, F., T. Murashige. 1987. Possible rejuvenation of adult avocado by graftage onto juvenile rootstocks *in vitro*. *Hort. Science*, 22: 1321-1324.
- Pliego-Alfaro, F. 1988. Development of an *in vitro* rooting bioassay using juvenile-phase stem cuttings of *Persea americana* Mill. *Journal of Horticultural Science*, 63(2): 295-301.
- Pliego-Alfaro, F., B. O. Bergh. 1992. Avocado. En: Hammerschlag, F. A., R. E. Litz (eds.). *Biotechnology of perennial fruit crops*. CAB International, Wallingford, pp. 323-333.
- Pliego-Alfaro, F., A. Barceló-Muñoz, R. López-Gómez, E. Ibarra-Laclette, L. Herrera-Estrella, E. Palomo-Ríos, J. A. Mercado, R. E. Litz. 2013. *Biotechnology*. En:

- Schaffer, B., B. N. Wolstenholme, A. W. Whiley (eds) The avocado. Botany, production and uses. 2nd edition. CABI, pp. 268-300.
- Premkumar, A., A. Barceló-Muñoz, F. Pliego-Alfaro, M. A. Quesada, J. A. Mercado. 2002. Influences of exogenous sucrose on juvenile avocado during *in vitro* cultivation and subsequent *ex vitro* acclimatization. *Trees*, 16, 569-575.
- Premkumar, A., F. Pliego-Alfaro, M. A. Quesada, J. F. Mercado, M. A. Barceló-Muñoz. 2003. Influence of sucrose concentrations on *in vitro* rooting, growth, endogenous sugars and *ex vitro* survival of juvenile avocado. *J. Hort. Sci. Biotechnol.*, 78(1): 46-50.
- PRN (Plan Rector Nacional). Sistema producto aguacate. 2009-2012. Comité Nacional del Sistema Producto Aguacate A. C., p. 52. (citado: 05/06/2015).
- Raharjo, S. T., Y. Witjaksono, M. Gómez-Lim, G. Padilla, R. Litz. 2008. Recovery of avocado (*Persea americana* Mill) plants transformed with the antifungal plant defensin gene PDF1.2. *In vitro Cell. Dev. Biol. Plant*, 44: 254-262.
- Read, P. E., C. M. Bavougian. 2013. *In vitro* rejuvenation of woody species. En: Lambardi, M., E. A. Ozudogru, S. M. Jain (eds.). Protocols for micropropagation of selected economically-important horticultural plants. *Methods in molecular biology*, Springer, New York, 994: 383-395.
- Rodríguez, N. N., M. Capote, V. Zamora. 1999. Cultivo *in vitro* del aguacatero (*Persea americana* Mill). *Revista Chapingo Serie Horticultura Número Especial*, pp. 231-237.
- SAGARPA. 2011. Monografía de cultivos: aguacate. Gobierno Federal.

- Sánchez-Romero, C., R. Perán-Quesada, B. Márquez-Martín, A. Barceló-Muñoz, F. Pliego-Alfaro. 2007. *In vitro* rescue of immature avocado (*Persea americana* Mill) embryos. *Scientia Horticulturae*, 111: 365-370.
- Sandoval-Prando, M. A., P. Chiavazza, A. Faggio, C. Contessa. 2014. Effect of coconut water and growth regulator supplements on *in vitro* propagation of *Corylus avellana* L. *Scientia Horticulturae*, 171: 91-94.
- SIAP (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera). 2013. <http://www.siap.gob.mx/cierre-de-la-produccion-agricola-por-estado/> (citado: 06/06/2015).
- Smith, C. E. Jr. 1966. Archeological evidence for selection in avocado. *Economic Botany*, 5, pp. 169-175.
- Smith, C. E. Jr. 1969. Additional notes on Pre-Conquest avocados in Mexico. *Economic Botany*, pp. 135-140.
- Smith, R. H. 2013. Plant tissue culture. Techniques and experiments. 3rd edition. Elsevier, pp. 45-62.
- Téliz, D., A. Mora. 2007. El aguacate y su manejo integrado. 2da edición. Ediciones Mundi-Prensa México, S. A. de C. V., México.
- Thomas, T. D. 2008. The role of activated charcoal in plant tissue culture. *Biotechnology Advances*, 26: 618-631.
- Van der Werff, H., F. Lorea. 1997. Lauraceae. Flora del Bajío y de regiones adyacentes. *Fascículo 56*: 42-56.

- Vidales-Fernández, I. 2002. Efecto de los reguladores de crecimiento en los procesos de organogénesis y embriogénesis somática de aguacate (*Persea americana* Mill). Tesis. Universidad de Colima, Tecomán, Colima, México.
- Vidales-Fernández, I., A. Larios-Guzmán, L. M. Tapia-Vargas, H. Guillén-Andrade, F. Villaseñor-Ramírez. 2011. Criopreservación de germoplasma de aguacate. *Proceedings VII World Avocado Congress*, Cairns, Australia.
- Williams, L. O. 1976. The botany of the avocado and its relatives. *Proc. 1st International Tropical Fruit Short Course: The Avocado*, pp. 9-15.
- Williams, L. O. 1977. The avocados, a synopsis of the genus *Persea*, subg. *Persea*. *Economic Botany*, 31, 315-320.
- Witjaksono, B. A. Schaffer, A. M. Colls, R. E. Litz, P. A. Moon. 1999. Avocado shoot culture, plantlet development and net CO₂ assimilation in an ambient and CO₂ enhanced environment. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant*, 35, 238-244.
- Yasuda, T., Y. Fujii, T. Yamaguchi. 1985. Embryogenic callus induction from *Coffea arabica* leaf explants by benzyladenine. *Plant Cell Physiol.*, 26(3): 595-597.
- Yong, J. W. H., L. Ge, Y. F. Ng, S. N. Tan. 2009. The chemical composition and biological properties of coconut (*Cocos nucifera* L.) water. *Molecules*, 14(12): 5144-5164.
- Zirari, A., S. M. Lionakis. 1994. Effect of cultivar, explant type, etiolation pretreatment and the age of plant material on the *in vitro* regeneration ability of avocado (*Persea americana*). *Acta Horticulturae*, 365: 69-76.

Zulfiqar, B., N. A. Abbasi, T. Ahmad, I. A. Hafiz. 2009. Effect of explant sources and different concentrations of plant growth regulators on *in vitro* shoot proliferation and rooting of avocado (*Persea americana* Mill) cv. "Fuerte". *Pak. J. Bot.*, 41(5): 2333-2346.

7. APÉNDICE

Cuadro 1A. Componentes del medio de cultivo MS* (Murashige y Skoog, 1962).

Componentes	Cantidad (mg L⁻¹)
MACROELEMENTOS	
NH ₄ NO ₃	825.000
KNO ₃	950.000
CaCl ₂ ·2H ₂ O	220.000
MgSO ₄ ·7H ₂ O	185.000
KH ₂ PO ₄	85.000
MICROELEMENTOS	
H ₃ BO ₃	6.200
MnSO ₄ ·4H ₂ O	22.300
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8.600
KI	0.830
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.250
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.025
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.025
SOLUCIÓN NaFeEDTA	
Na ₂ EDTA	37.300
FeSO ₄ ·7H ₂ O	27.800
ORGÁNICOS	
Myo-inositol	100.000
Glicina	2.000
Ácido nicotínico	0.500
Piridoxina·HCl	0.500
Tiamina·HCl	0.100
Sacarosa	30000.000

*MS modificado al 50 % de macroelementos.

Cuadro 2A. Componentes del medio de cultivo DCR (Gupta y Durzan, 1985).

Componentes	Cantidad (mg L⁻¹)
MACROELEMENTOS	
NH ₄ NO ₃	400.000
KNO ₃	340.000
Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	556.000
CaCl ₂ ·2H ₂ O	85.000
MgSO ₄ ·7H ₂ O	370.000
KH ₂ PO ₄	170.000
MICROELEMENTOS	
H ₃ BO ₃	6.200
MnSO ₄ ·H ₂ O	22.300
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8.600
KI	0.830
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.250
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.250
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.025
NiCl ₂	0.025
SOLUCIÓN NaFeEDTA	
Na ₂ EDTA	37.300
FeSO ₄ ·7H ₂ O	27.800
ORGÁNICOS	
Myo-inositol	200.000
Glicina	2.000
Ácido nicotínico	0.500
Piridoxina·HCl	0.500
Tiamina·HCl	1.000
Sacarosa	30000.000

Cuadro 3A. Componentes del medio de cultivo Yasuda (Yasuda *et al.*, 1985).

Componentes	Cantidad (mg L⁻¹)
MACROELEMENTOS	
NH ₄ NO ₃	412.500
KNO ₃	475.000
CaCl ₂ ·2H ₂ O	110.000
MgSO ₄ ·7H ₂ O	92.500
KH ₂ PO ₄	85.000
MICROELEMENTOS	
H ₃ BO ₃	3.100
MnSO ₄ ·7H ₂ O	11.200
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	4.300
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.125
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.050
SOLUCIÓN NaFeEDTA	
Na ₂ EDTA	21.000
FeSO ₄ ·7H ₂ O	21.000
ORGÁNICOS	
Myo-inositol	100.000
Ácido nicotínico	1.000
Piridoxina·HCl	1.000
Tiamina·HCl	10.000
Sacarosa	30000.000

Cuadro 4A. Componentes del medio de cultivo B5 (Gamborg *et al.*, 1968).

Componentes	Cantidad (mg L⁻¹)
MACROELEMENTOS	
KNO ₃	2500.000
CaCl ₂ ·2H ₂ O	150.000
MgSO ₄ ·7H ₂ O	250.000
(NH ₄) ₂ SO ₄	134.000
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	150.000
MICROELEMENTOS	
H ₃ BO ₃	3.000
MnSO ₄ ·H ₂ O	10.000
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	2.000
KI	0.750
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.250
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.025
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.025
SOLUCIÓN NaFeEDTA	
Na ₂ EDTA	37.300
FeSO ₄ ·7H ₂ O	27.800
ORGÁNICOS	
Myo-inositol	100.000
Ácido nicotínico	1.000
Piridoxina·HCl	1.000
Tiamina·HCl	10.000
Sacarosa	20000.000

Cuadro 5A. Tabla de contingencia de respuesta de microestacas en medio MS y prueba de Ji-cuadrada a 7 días del establecimiento.

Cultivar	Contaminado	Viable	Total
Huevo de Toro	18	25	43
Bacon	6	42	48
Mantequilla	14	30	44
R.H.	12	28	40
Prueba de Ji-cuadrada			
Ji-cuadrada	10.063	Variables relacionadas	
Sig.	0.018		

Cuadro 6A. Tabla de contingencia de respuesta de microestacas en medio MS y prueba de Ji-cuadrada a 14 días del establecimiento.

Cultivar	Contaminado	Oxidado	Viable	Total
Huevo de Toro	26	1	16	43
Bacon	18	3	27	48
Mantequilla	29	3	12	44
R.H.	24	0	16	40
Prueba de Ji-cuadrada				
Ji-cuadrada	12.335	Variables independientes		
Sig.	0.055			

Cuadro 7A. Tabla de contingencia de respuesta de microestacas en medio DCR y prueba de Ji-cuadrada a 7 días del establecimiento.

Cultivar	Contaminado	Viable	Total
Huevo de Toro	16	25	41
Bacon	15	39	54
Mantequilla	29	18	47
R.H.	0	40	40
Prueba de Ji-cuadrada			
Ji-cuadrada	38.572	Variables relacionadas	
Sig.	0		

Cuadro 8A. Tabla de contingencia de respuesta de microestacas en medio DCR y prueba de Ji-cuadrada a 14 días del establecimiento.

Cultivar	Contaminado	Viable	Total
Huevo de Toro	26	15	41
Bacon	36	18	54
Mantequilla	37	10	47
R.H.	24	16	40
Prueba de Ji-cuadrada			
Ji-cuadrada	4.058	Variables independientes	
Sig.	0.255		

Cuadro 9A. Tabla de contingencia de respuesta de microestacas en medio Yasuda y prueba de Ji-cuadrada a 7 días del establecimiento.

Cultivar	Contaminado	Viable	Total
Huevo de Toro	13	60	73
Bacon	11	62	73
Mantequilla	19	63	82
R.H.	20	68	88
Prueba de Ji-cuadrada			
Ji-cuadrada	2.258	Variables independientes	
Sig.	0.521		

Cuadro 10A. Tabla de contingencia de respuesta de microestacas en medio Yasuda y prueba de Ji-cuadrada a 14 días del establecimiento.

Cultivar	Contaminado	Viable	Total
Huevo de Toro	17	56	73
Bacon	26	47	73
Mantequilla	34	48	82
R.H.	25	63	88
Prueba de Ji-cuadrada			
Ji-cuadrada	6.839	Variables independientes	
Sig.	0.077		

Cuadro 11A. Tabla de contingencia de respuesta de microestacas en medio B5 y prueba de Ji-cuadrada a 7 días del establecimiento.

Cultivar	Contaminado	Viable	Total
Huevo de Toro	15	38	53
Bacon	6	27	33
Mantequilla	12	22	34
R.H.	16	27	43
Prueba de Ji-cuadrada			
Ji-cuadrada	3.781	Variables independientes	
Sig.	0.286		

Cuadro 12A. Tabla de contingencia de respuesta de microestacas en medio B5 y prueba de Ji-cuadrada a 14 días del establecimiento.

Cultivar	Contaminado	Oxidado	Viable	Total
Huevo de Toro	22	8	23	53
Bacon	6	9	18	33
Mantequilla	21	8	5	34
R.H.	16	12	15	43
Prueba de Ji-cuadrada				
Ji-cuadrada	18.124	Variables relacionadas		
Sig.	0.006			

Cuadro 13A. Análisis de varianza de la interacción cultivar por medio de inducción, en las variables número y longitud de brotes y número de hojas a 8, 12 y 16 semanas.

	FV	SC	GL	CM	F	Sig.
Cultivar	B8	14.057	3	4.686	2.997	.032*
	L8	5.358	3	1.786	5.442	.001**
	H8	192.583	3	64.194	10.271	.000**
	B12	21.292	3	7.097	1.985	.118
	L12	8.161	3	2.72	6.181	.001**
	H12	240.113	3	80.038	9.272	.000**
	B16	55.182	3	18.394	3.861	.011**
	L16	17.431	3	5.81	9.933	.000**
	H16	626.65	3	208.883	19.359	.000**
Medio de inducción	B8	26.984	5	5.397	3.452	.005**
	L8	3.963	5	0.793	2.415	.038*
	H8	98.04	5	19.608	3.137	.010**
	B12	41.125	5	8.225	2.3	.047*
	L12	5.189	5	1.038	2.358	.042*
	H12	134.889	5	26.978	3.125	.010**
	B16	85.339	5	17.068	3.583	.004**
	L16	8.817	5	1.763	3.014	.012**
	H16	204.003	5	40.801	3.781	.003**
Cultivar* Medio de inducción	B8	56.911	15	3.794	2.427	.003**
	L8	5.867	15	0.391	1.192	.282
	H8	184.338	15	12.289	1.966	.020**
	B12	98.833	15	6.589	1.843	.033*
	L12	10.518	15	0.701	1.593	.080
	H12	241.451	15	16.097	1.865	.030*
	B16	138.224	15	9.215	1.934	.023*

	L16	19.113	15	1.274	2.178	.009**
	H16	427.854	15	28.524	2.644	.001**
Error	B8	262.625	168	1.563		
	L8	55.135	168	0.323		
	H8	1050.028	168	6.25		
	B12	600.75	168	3.576		
	L12	73.933	168	0.440		
	H12	1450.233	168	8.632		
	B16	800.375	168	4.764		
	L16	98.274	168	0.585		
	H16	1812.707	168	10.79		
Total	B8	360.578	191			
corregido	L8	70.323	191			
	H8	1524.989	191			
	B12	762.0	191			
	L12	97.8	191			
	H12	2066.685	191			
	B16	1079.12	191			
	L16	143.635	191			
	H16	3071.214	191			

†B8, 12, 16: Número de brotes a 8, 12 y 16 semanas; L8, 12, 16: Longitud de brotes a 8, 12 y 16 semanas; H8, 12, 16: Número de hojas a 8, 12 y 16 semanas.

Cuadro 14A. Comparación de medias de la interacción cultivar por medio de inducción, en el número de brotes a 8 semanas.

Medio de inducción	Cultivar			
	Huevo de Toro	Bacon	Mantequilla	R.H.
M1	1.25 i	1.12 j	0.25 u	1.5 e
M2	0.62 m	2.0 c	2.5 b	0.0 x
M3	0.37 p	1.37 g	2.5 a	1.87 d
M4	0.5 o	1.25 h	0.37 r	0.75 l
M5	0.37 q	0.62 n	0.25 v	0.37 t
M6	0.25 w	1.5 f	0.37 s	0.87 k

†Medias con la misma letra en cada columna no muestran diferencia significativa, Tukey sig. $p \leq 0.05$.

Cuadro 15A. Comparación de medias de la interacción cultivar por medio de inducción, en el número de hojas a 8 semanas.

Medio de inducción	Cultivar			
	Huevo de Toro	Bacon	Mantequilla	R.H.
M1	1.87 j	2.54 g	0.87 o	3.37 d
M2	0.62 q	6.87 a	2.67 f	0.0 x
M3	0.75 p	3.75 c	3.85 b	2.09 i
M4	0.12 w	2.5 h	1.37 l	0.62 r
M5	0.25 u	1.37 m	1.0 n	0.62 s
M6	0.12 v	2.79 e	1.5 k	0.43 t

†Medias con la misma letra en cada columna no muestran diferencia significativa, Tukey sig. $p \leq 0.05$.

Cuadro 16A. Comparación de medias de la interacción cultivar por medio de inducción, en el número de brotes a 12 semanas.

Medio de inducción	Cultivar			
	Huevo de Toro	Bacon	Mantequilla	R.H.
M1	1.25 l	1.12 m	0.37 s	1.75 h
M2	1.87 g	2.75 c	3.0 b	0.0 x
M3	0.37 q	1.37 k	3.25 a	1.87 e
M4	0.5 p	1.5 i	0.37 t	0.75 o
M5	0.37 r	1.5 j	0.25 v	0.37 u
M6	0.25 w	1.87 f	1.0 n	2.25 d

†Medias con la misma letra en cada columna no muestran diferencia significativa, Tukey sig. $p \leq 0.05$.

Cuadro 17A. Comparación de medias de la interacción cultivar por medio de inducción, en el número de hojas a 12 semanas.

Medio de inducción	Cultivar			
	Huevo de Toro	Bacon	Mantequilla	R.H.
M1	2.53 j	3.12 g	1.25 p	4.5 c
M2	1.0 s	7.68 a	3.04 h	0.0 x
M3	1.5 k	5.29 b	4.31 d	2.75 i
M4	0.75 v	3.59 f	1.5 m	0.75 t
M5	1.0 r	1.5 l	1.12 q	0.75 u
M6	0.5 w	3.71 e	1.37 o	1.5 n

†Medias con la misma letra en cada columna no muestran diferencia significativa, Tukey sig. $p \leq 0.05$.

Cuadro 18A. Comparación de medias de la interacción cultivar por medio de inducción, en el número de brotes a 16 semanas.

Medio de inducción	Cultivar			
	Huevo de Toro	Bacon	Mantequilla	R.H.
M1	1.37 n	1.87 i	0.5 r	1.75 l
M2	1.87 h	3.37 b	3.12 c	0.0 x
M3	0.37 v	2.62 d	5.12 a	2.62 e
M4	0.5 q	1.75 k	0.37 t	0.87 o
M5	0.62 p	1.62 m	0.37 u	0.5 s
M6	0.25 w	2.12 g	1.87 j	2.12 f

†Medias con la misma letra en cada columna no muestran diferencia significativa, Tukey sig. $p \leq 0.05$.

Cuadro 19A. Comparación de medias de la interacción cultivar por medio de inducción, en la longitud de brotes a 16 semanas.

Medio de inducción	Cultivar			
	Huevo de Toro	Bacon	Mantequilla	R.H.
M1	0.89 f	0.81 g	0.35 r	1.18 d
M2	0.4 q	1.68 b	0.71 h	0.0 x
M3	0.62 k	1.98 a	0.91 e	0.52 l
M4	0.31 t	1.63 c	0.63 j	0.26 w
M5	0.41 p	0.33 s	0.42 n	0.28 v
M6	0.3 u	0.7 i	0.43 m	0.41 o

†Medias con la misma letra en cada columna no muestran diferencia significativa, Tukey sig. $p \leq 0.05$.

Cuadro 20A. Comparación de medias de la interacción cultivar por medio de inducción, en el número de hojas a 16 semanas.

Medio de inducción	Cultivar			
	Huevo de Toro	Bacon	Mantequilla	R.H.
M1	3.62 g	3.5 h	1.37 o	4.12 f
M2	1.25 q	9.81 b	3.39 i	0.0 x
M3	2.0 j	10.0 a	4.5 e	1.5 m
M4	1.12 u	5.5 c	1.87 l	0.87 v
M5	1.37 p	2.0 k	1.12 t	1.25 r
M6	0.62 w	4.75 d	1.5 n	1.12 s

†Medias con la misma letra en cada columna no muestran diferencia significativa, Tukey sig. $p \leq 0.05$.

Cuadro 21A. Análisis de varianza del efecto de los medios de enraizamiento en brotes de aguacate cv. Bacon en el número de raíces a 8 semanas.

FV	SC	GL	CM	F	Sig.
Medio	12.967	5	2.593	3.112	.026**
Error	20.000	24	0.833		
Total	32.967	29			

Cuadro 22A. Análisis de varianza del efecto de los medios de enraizamiento en brotes de aguacate cv. Bacon en la longitud de raíces a 8 semanas.

FV	SC	GL	CM	F	Sig.
Medio	30.779	5	6.156	3.558	.015**
Error	41.520	24	1.730		
Total	72.299	29			