

ESTABLECIMIENTO *in vitro* DE AGUACATE (*Persea americana* Mill.) VARIEDAD CRIOLLO

Blanco Anleu, José Andrés

Egresado de la Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano. Km 30 Carretera Tegucigalpa - Danli, San Antonio de Oriente, Francisco Morazan, Honduras. C.P. 93. Correo-e: joseanleu1@hotmail.com

Resumen

La propagación *in vitro* es una alternativa a la producción de plantas de forma masiva y libre de enfermedades y para conservar las características genéticas de la planta madre. El cultivo del aguacate (*Persea americana* Mill.) es de importancia económica para los países productores. Los injertos de patrones y de plantas productoras se seleccionan según atributos que cada variedad posee para la función específica que van a desarrollar en la producción. El objetivo de este estudio fue establecer aguacate criollo *in vitro* a partir de meristemos axilares. En el establecimiento se utilizaron meristemos axilares en el medio Murashige y Skoog modificado con la mitad de las sales minerales y suplementado con reguladores de crecimiento. Se utilizaron dos experimentos: El Experimento 1 constó de tres tratamientos: 0.5 mg L⁻¹ de bencilaminopurina (BAP), 0.5 mg L⁻¹ de BAP + 0.5 mg L⁻¹ de ácido giberélico (AG₃) y sin reguladores de crecimiento. El experimento 2 constó de cuatro tratamientos donde se combinó 0.5 mg L⁻¹ de ácido naftalenacético (ANA) con 0.5, 3 y 5 mg L⁻¹ de BAP y el testigo sin reguladores de crecimiento. Se evaluó el número de hojas y número de brotes por meristemo. En el experimento 1 para la variable de hojas y meristemos los mejores tratamientos fueron los suplementados con BAP. En el experimento 2 no se observó formación de brotes. Se logró establecer meristemos de aguacate criollo *in vitro* en el medio de cultivo suplementado con 0.5 mg L⁻¹ de BAP.

Palabras clave: Micropropagación, Palta, Reguladores de crecimiento.

In vitro ESTABLISHMENT OF AVOCADO (*Persea americana* Mill.) CRIOLLO VARIETY

Abstract

In vitro propagation is an alternative to mass production of plants free of diseases and to preserve the genetic characteristics of the mother plant. The cultivation of avocado (*Persea americana* Mill.) is of economic importance for the producing countries. The grafts of rootstock and production plants are selected according to attributes that each variety possesses for the specific function that they are going to develop in production. The objective of this study was to establish creole avocado *in vitro* from axillary meristems. In the establishment, axillary meristems were used in Murashige and Skoog medium modified with half of the mineral salts and supplemented with growth regulators. Two experiments were used: Experiment 1 consisted of three treatments: 0.5 mg L⁻¹ of benzylaminopurine (BAP), 0.5 mg L⁻¹ of BAP + 0.5 mg L⁻¹ of gibberellic acid (GA₃) and without growth regulators. Experiment 2 consisted of four treatments where 0.5 mg L⁻¹ of naphthaleneacetic acid (ANA) was combined with 0.5, 3 and 5 mg L⁻¹ of BAP and the control without growth regulators. The number of leaves and number of shoots per meristem were evaluated. In experiment 1 for the variables leaf and meristem, the best treatments were those supplemented with BAP. In experiment 2 no shoot formation was observed. Creole avocado meristems were established *in vitro* in the culture medium supplemented with 0.5 mg L⁻¹ of BAP.

Key words: Micropropagation, Palta, Growth regulators.

Introducción

La familia Lauraceae se compone principalmente de especies arbóreas, económicamente importantes, como el aguacate (*Persea americana* Mill.) la cual es una especie frutal única y con alta participación comercial (Garbanzo, 2011). En la actualidad el aguacate es un producto que tiene una fuerte influencia en las exportaciones de los países latinoamericanos. Es un fruto altamente nutritivo y de muy buena palatabilidad. También tiene una gran importancia en la dieta de las personas teniendo alto impacto en la gastronomía y en la economía (Garbanzo, 2011).

El género *Persea* posiblemente se originó en Sudamérica, África, Australia, Nueva Zelanda. Se extendió a Asia y América del Sur a través de la Antártida. Dentro del subgénero *Persea* se identificaron tres especies. Los cuales son: *Persea schiedeana* Nees, *Persea parviflora* Williams y *Persea americana* Mill (Pua y Davey, 2007).

La serie de problemas que crea la variabilidad genética en una plantación se ha venido estudiando para minimizar las pérdidas en la producción. Debido a la heterocigocidad en los patrones en las plantaciones, se tienen problemas de adaptabilidad a condiciones climáticas y del suelo. Esto se ve reflejado en comportamientos distintos de plantas dentro de la plantación (Gutiérrez et al., 2009).

El uso de patrones provenientes de semilla tiene problemas debido a la variabilidad genética en las poblaciones ya que esta semilla pasó por procesos de fecundación entre plantas con distintos genes. Cuando hay una gran variación en los genes existen plantas con facultades distintas. Por ejemplo: resistencia a enfermedades, distinta adaptabilidad a condiciones ambientales y a los tipos de suelo (Gutiérrez et al., 2009).

Actualmente la técnica de propagación propuesta por Frolich y Platt (1971) es la más usada y la última modificación fue hecha por Ernst (1999). Esta técnica tiene ventajas como la obtención de plantas clonales por medio de injertos y usando semillas para la obtención de raíces adventicias antes de hacer el injerto del patrón. Esta es la técnica más reconocida a nivel de producción en aguacate (Bernal y Díaz, 2008).

La micropropagación de aguacate se hace por medio de meristemas axilares con el fin de clonar plantas para tener producciones más homogéneas en producción, adaptación a condiciones climáticas y del suelo (Bernal y Díaz, 2008).

Para la producción comercial es indispensable tener uniformidad genética en los cultivos y es necesario investigar más a fondo el tema de propagación del aguacate con el fin de llegar a tener uniformidad genética en las plantaciones y así mismo acortar el tiempo de establecimiento de patrones comerciales propagándolos masivamente (Lavarie, 2013). El objetivo de este estudio fue establecer *in vitro* aguacate criollo a partir de meristemos axilares.

Metodología

Ubicación

El estudio se realizó en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales del Departamento de Ciencia y Producción Agropecuaria de la Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano, Honduras.

Fuente del explante

Como fuente de explante se usaron brotes jóvenes de plantas de aguacate criollo de la Unidad de Producción de Ornamentales de Zamorano de estos se extrajeron meristemos axilares (Figura 1).



Figura 1. Aguacate (*Persea americana* Mill.). A: Plantación de patrones de aguacate criollo en la Unidad de Propagación de Zamorano. B: Meristemos axilares de crecimiento.

Desinfección superficial del material vegetal

Los brotes traídos del vivero fueron lavados con agua y jabón. Se quitaron las hojas sin dañar los meristemos (Figura 2) y se separaron en segmentos nodales los que fueron desinfectados con etanol al 70 % por diez segundos, después se sumergieron con NaOCl al 20 % volumen:volumen (v:v) (4.72 % ingrediente activo) con dos gotas de Tween[®]80 por cada 100 mL de solución durante diez minutos. Por último, se lavaron tres veces con agua destilada estéril dentro de la cámara de flujo laminar.



Figura 1. Aguacate (*Persea americana* Mill.) variedad Criollo. A. Brotes jóvenes de la planta madre. B: Segmentos nodales listos para proceso de desinfección

Medio de cultivo

Se usó el medio de cultivo de Murashige y Skoog modificado con la mitad de la concentración de las sales y suplementado con fitohormonas según los tratamientos a evaluar. Se ajustó el pH de todos los medios a 5.8. Los medios fueron solidificados con Phytigel® 1.8 g L⁻¹ y esterilizados a 121 °C, 20 PSI por 20 minutos. Cada 21 días se hizo refrescamiento de los medios de cultivo.

Experimento 1

Evaluación de la respuesta de los meristemos a 6-bencilaminopurina (BAP) y ácido giberélico (AG₃).

Los tratamientos evaluados en este experimento fueron:

1. Tratamiento suplementando con 0.5 mg L⁻¹ de BAP (Muñoz et al., 1999).
2. Tratamiento suplementado con 0.5 mg L⁻¹ de BA + 0.5 mg L⁻¹ de AG (Rodríguez et al., 1999)
3. Testigo. Este tratamiento no fue suplementado con reguladores de crecimiento.

Experimento 2

Evaluación de la respuesta de los meristemos a BAP y ácido naftalenacético (ANA).

Los tratamientos evaluados en este experimento fueron:

1. Tratamiento suplementado con 0.5 mg L⁻¹ de BAP y 0.5 mg L⁻¹ de ANA (Rodríguez et al., 1999).
2. Tratamiento suplementado con 3 mg L⁻¹ de BAP y 0.5 mg L⁻¹ de ANA (Rodríguez et al., 1999).
3. Tratamiento suplementado con 5 mg L⁻¹ de BAP y 0.5 mg L⁻¹ de ANA) (Rodríguez et al., 1999).
4. Tratamiento Testigo. Este Tratamiento no fue suplementado con reguladores de crecimiento.

VARIABLES MEDIDAS

Se evaluó el número de explantes establecidos al día 21. Se midió el número de brotes cada siete días a partir del día 60 hasta el día 72 y el número de hojas formadas cada siete días a partir del día 28 hasta el día 49.

Diseño experimental

En los dos experimentos se utilizó un diseño completo al azar. En el experimento uno se evaluaron tres tratamientos cada uno con 36 repeticiones. En el experimento dos se usaron cuatro tratamientos con 25 repeticiones por tratamiento.

Análisis estadístico

Se usó un análisis de varianza con separación de medias por el método Duncan $P \leq 0.5$. Se usó el programa “Statistical Analysis System” SAS versión 9.

Resultados y Discusión

Experimento 1

Evaluación de la respuesta de los meristemos a BAP y AG_3 .

A los 21 días de la etapa de establecimiento en el Experimento 1 se observó una mortalidad menor al 5 % en los tres tratamientos. Los meristemos axilares a los 30 días del establecimiento desarrollaron hojas (Figura 3).

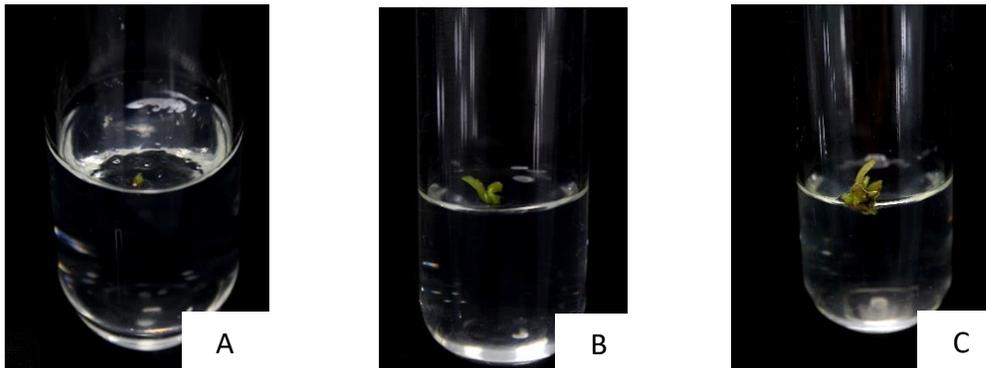


Figura 3. Meristemos de aguacate (*Persea americana* Mill.) establecidos *in vitro* en medio de cultivo MS modificado y suplementado con 0.5 mg L^{-1} de BAP. A: Meristemo axilar a siete días de establecido. B: Meristemo axilar a los 42 días de establecido. C: Meristemo axilar a los 49 días de establecido en el tratamiento.

Para la variable número de brotes el mejor tratamiento fue el suplementado con 0.5 mg L^{-1} BAP (Cuadro 1). Estos datos no concuerdan con el estudio que realizaron Muñoz et al. (1999) quienes observaron de 7 a 15 brotes por explante establecido como respuesta a las hormonas BAP y AG_3 .

Estos investigadores también obtuvieron alargamiento en los tallos y formación de hojas en porcentajes mayores al 50 % lo que nos indicó que estos reguladores de crecimiento son necesarias para la obtención de brotes.

Los datos de esta investigación coinciden con los estudios Rodríguez et al. (1999) y Peixoto et al. (2010) quienes obtienen brotes múltiples con la adición de BAP con un 85 % de supervivencia. La BAP induce la formación de callo en cítricos siendo probada a distintas concentraciones. Tanto la BAP como el AG₃ inducen el crecimiento de tejido vegetal en especies leñosas.

Cuadro 1. Número de brotes por meristemo de aguacate (*Persea americana* Mill.) criollo en etapa de establecimiento *in vitro* como respuesta a bencilaminopurina (BAP) y ácido giberélico (AG₃).

| Tratamiento | DÍAS | | |
|---|---------------------|--------|--------|
| | 60 | 67 | 74 |
| 0.5 mg L ⁻¹ BAP | 1.31 a ^z | 1.31 a | 1.47 a |
| 0.5 mg L ⁻¹ BAP+0.5 mg L ⁻¹ AG ₃ | 1.00 b | 1.00 b | 1.11 b |
| Testigo | 1.00 b | 1.00 b | 1.00 b |
| Coefficiente de Variación (%) | 2.71 | 43.64 | 43.64 |

^z Los tratamientos con distinta letra son significativamente diferentes según la prueba Duncan ($P \leq 0.05$).

Para la variable número de hojas los tratamientos no existieron diferencias significativas a los 28 días. Esto se puede atribuir al crecimiento lento que presentaron los meristemos establecidos. A partir del día 35 los tratamientos empezaron a mostrar diferencias significativas y los meristemos empezaron a desarrollar una mayor cantidad de hojas (Cuadro 2). Estos datos concuerdan con Rodríguez et al. (1999) quienes obtuvieron formación de hojas en los meristemos con la adición de BAP y AG₃ teniendo un desarrollo de la lámina foliar reducido en los meristemos establecidos a distintas concentraciones de fitohormonas. Peixoto et al. (2010) indicaron un promedio de cuatro hojas por meristemo establecido y variaciones durante el crecimiento por meristemo establecido de cítricos con el uso de distintas combinaciones de BAP y AG₃. Estos datos nos indicaron que tanto la BAP por si sola o en combinación con AG₃ es capaz de inducir la formación de hojas durante el crecimiento de los meristemos.

Las diferencias entre los dos experimentos nos indicaron que los meristemos de aguacate responden mejor al AG₃. Estas observaciones difieren del estudio hecho por Sotolongo et al. (2003) donde establecen *in vitro* *Psidium salutare* usando distintas combinaciones de BAP y ANA.

Según un estudio realizado por Gamboa y Abdelnour (1999) en la propagación de *Gmelina arborea* Roxb la BAP es un regulador de crecimiento muy utilizado para inducir la brotación en especies forestales siendo probablemente uno de los reguladores de crecimiento más potentes. Según un estudio en donde se establecieron *in vitro* yemas de teca (*Tectona grandis* L.) se obtuvieron el mayor número de brotes por meristemo establecido usando medio suplementado con BAP y ANA (Rojas y Abdelnour 2012).

Cuadro 2. Número de hojas por meristemo de aguacate (*Persea americana* Mill.) criollo en etapa de establecimiento *in vitro* como respuesta a bencilaminopurina (BAP) y ácido giberélico (AG₃).

| Tratamiento | DÍAS | | |
|---|---------------------|--------|--------|
| | 35 | 42 | 49 |
| 0.5 mg L ⁻¹ BAP | 2.35 a ^z | 2.58 a | 3.05 a |
| 0.5 mg L ⁻¹ BAP+0.5 mg L ⁻¹ AG ₃ | 3.03 b | 3.11 b | 3.50 b |
| Testigo | 1.68 b | 1.68 b | 1.72 b |
| Coefficiente de Variación (%) | 0.84 | 2.97 | 52.38 |

^z Los tratamientos con distinta letra son significativamente diferentes según la prueba Duncan ($P \leq 0.05$).

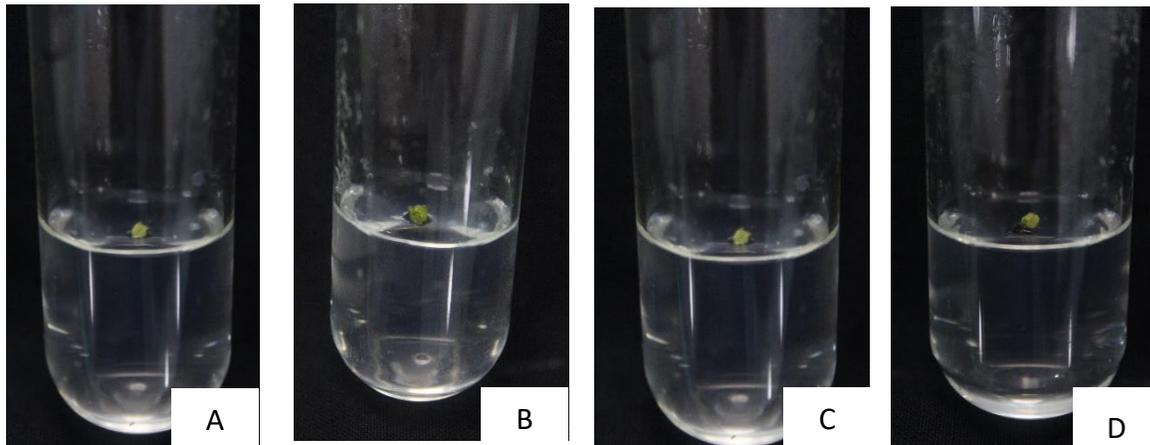


Figura 2. Meristemos de aguacate (*Persea americana* Mill.) establecidos *in vitro* en medio de cultivo MS modificado y suplementado con BAP y ANA a los 21 días de establecidos. A: Meristemo axilar en medio 0.5 mg L⁻¹ BAP + 0.5 mg L⁻¹ ANA. B: Meristemo axilar en medio 0.5 mg L⁻¹ BAP + 0.5 mg L⁻¹ ANA. C: Meristemo axilar en el medio 5 mg L⁻¹ BAP + 0.5 mg L⁻¹ ANA. D: Meristemo axilar a los 21 días Testigo.

El crecimiento de los meristemos en este experimento fue lento y esto difiere del crecimiento que obtuvieron Cantillo et al. (2011) para la propagación *in vitro* de *Pinus cubensis* Griseb quienes lograron un incremento en el número de brotes establecidos y en el alargamiento de estos usando 5.4 mg L⁻¹ de ANA. Se cree que la diferencia puede radicar en la concentración de ANA que se

usó en el establecimiento de aguacate la cual fue menor y por lo cual se obtuvo un crecimiento moderado, por ende, no se vieron indicios de formación de brotes o de hojas.

En el medio 5 mg L⁻¹ BAP+0.5 mg L⁻¹ ANA el día 14 se observó muerte en los explantes. Esta puede deberse a la concentración de 5 mg L⁻¹ de BAP fue muy elevada para los tejidos. Estos datos concuerdan con el estudio realizado por Rodríguez et al. (1999) quienes tuvieron deterioro y muerte en los explantes establecidos con medios de cultivo a concentraciones de 5 mg L⁻¹ de BAP.

Conclusión

Se logró establecer el cultivo *in vitro* de aguacate (*Persea americana* Mill.) criollo en medio de cultivo suplementado con 0.5 mg L⁻¹ de BAP.

Recomendación

Realizar pruebas con otros reguladores de crecimiento para lograr crecimiento en los explantes y la formación de brotes múltiples.

Literatura Citada

- Bernal E., J. A., y C. A. Díaz D. 2008. Tecnología para el Cultivo del Aguacate. Manual Técnico 5, Corporación Colombiana de investigación Agropecuaria (Corpoica). Rionegro, Colombia. 241 p.
- Cantillo Ardebol, R., J. Igarza Castro, and A. M. Ochoa. 2011. Propagación *in vitro* de plantas de *Pinus cubensis* Griseb. Biotecnol. Veg. 11(1):3-13.
- Ernst, A. A., 1999. Micro cloning: a multiple cloning technique for avocados using micro containers. Rev. Chapingo Ser. Hort. 5:217-220.
- Frolich, E. F., and R. G. Platt. 1971. Use of the etiolation technique in rooting avocado cuttings. Cali. Avocado Soc. Yearb. 55:97-109.
- Gamboa, J., y A. Abdelnour. 1999. Micropropagación de melina (*Gmelina arborea*). Agron. Costarric. 23(1):69-76.
- Garbanzo Solís, M. 2011. Manual del Cultivo: Buenas Prácticas de Cultivo Variedad Hass. Agencia de Servicios Agropecuarios de Frailes y Ministerio de Agricultura y Ganadería. San José Costa Rica. 96 p.
- Gutiérrez-Díez, A., J. Martínez-de la Cerda, E. A. García-Zambrano, L. Iracheta-Donjuan, J. D. Ocampo-Morales, y I. M. Cerda-Hurtado. M. 2009. Estudio de diversidad genética del aguacate nativo en Nuevo León, México. Fitotec. Mex. 32(1):9-18.



- Lavarie E. L. 2013. Manual Técnico del Cultivo de Aguacate en Honduras. Programa Nacional de Desarrollo Agroalimentario (PRONAGRO) de la Secretaría de Agricultura y Ganadería (SAG). Tegucigalpa, Honduras. 50 p.
- Barceló-Muñoz, A., C. L. Encina, E. Simón-Pérez, E., & Pliego-Alfaro, F. (1999). Micropropagation of adult avocado. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 58(1):11-17.
- Peixoto, M., M. Cardoso, C. Silva, and W. Campos. 2010. Growth regulators, culture media and antibiotics in the *in vitro* shoot regeneration from mature tissue of citrus cultivars. *Pesq. Agropec. Bras.* 5(7):654-660.
- Pua, E. C., and M. Davey. (Eds). 2007. *Transgenic Crops V. Biotechnology in Agriculture and Forestry*, vol 60. Springer. Berlin, Germany.
- Rodríguez, N. N., M. Capote, and V. Zamora. 1999. Cultivo *in vitro* del aguacatero (*Persea americana* Mill.). *Rev. Chapingo Ser. Hort.* 5:231-237.
- Rojas, F., and A. Abdelnour. 2012. Brotación *in vitro* de yemas de teca (*Tectona grandis* L.f.). *Tecnol. Marcha* 25(5):67-72. revistas.tec.ac.cr/index.php/tec_marcha/article/download/475/403
- Sotolongo, R., M. García, L. Junco, G. Gaeda, and E. García. 2003. Micropropagación de *Psidium salutare* (Myrtaceae). *Jard. Bot. Nac. Univ. Habana* 24(1/2):245-250.