

## CULTIVO *in vitro* DEL AGUACATERO (*Persea americana* Mill.)

N. N. Rodríguez; M. Capote; V. Zamora

Instituto de Investigaciones de Cítricos y otros Frutales, Cuba.

### RESUMEN

Se cultivaron embriones inmaduros y maduros de diferentes cultivares de aguacatero (*Persea americana* Mill.) en el medio mineral de Murashige y Skoog (1962) a la mitad de su concentración, con la adición de  $0.5 \text{ mg}\cdot\text{litro}^{-1}$  de BA (6-bencil aminopurina) en un caso y de  $0.5 \text{ mg}\cdot\text{litro}^{-1}$  de BA y de  $\text{GA}_3$  (ácido giberélico) en el otro. Los mejores resultados se obtuvieron en el medio que contenía  $\text{GA}_3$  donde se logró la formación de 3 a 10 brotes por embrión. El subcultivo en el mismo medio basal con  $2.0 \text{ mg}\cdot\text{litro}^{-1}$  de AIB (ácido indol-3-butírico) y 0.5% (p:v) de CA (carbón activado) provocó 30.0-40.0% de enraizamiento. El injerto de los brotes obtenidos *in vitro* en patrones previamente establecidos bajo condiciones de aislamiento fue también efectivo. Se obtuvieron plantas completamente conformadas cuando se extrajeron embriones maduros y se cultivaron en medio MS y DF (Dixon y Fuller, 1976) sin reguladores del crecimiento. La adición de CA (0.5%) garantizó un mejor crecimiento y un sistema radical bien conformado. Se lograron establecer microinjertos *in vitro*, utilizando como patrones las plantas obtenidas por cultivo de embriones. Se emplearon explantes nodales de plantas de vivero etioladas del cultivar 'Duke-7' para establecer la técnica de multiplicación *in vitro*. La emisión de brotes fue posible en el medio DF con  $2.0 \text{ mg}\cdot\text{litro}^{-1}$  de BA y de  $\text{GA}_3$ , respectivamente, pero no hubo formación de brotes múltiples en ninguna de las combinaciones de reguladores empleadas. Se logró el enraizamiento cuando al medio se incorporó  $2.0 \text{ mg}\cdot\text{litro}^{-1}$  de AIB y  $1.0 \text{ mg}\cdot\text{litro}^{-1}$  de  $\text{GA}_3$ , así como con  $5.0 \text{ mg}\cdot\text{litro}^{-1}$  de AIB y  $1.0 \text{ mg}\cdot\text{litro}^{-1}$  de  $\text{GA}_3$ , con porcentajes de éxito de 83.3 y 98.0%, respectivamente. La aclimatación de las plantas fue del 40.0%, y el crecimiento fue más lento comparado con el de las provenientes de semillas en los viveros comerciales.

**PALABRAS CLAVE:** Aguacate, cultivo de tejidos, reguladores de crecimiento.

### INTRODUCCIÓN

Dentro de los frutales tropicales, el aguacatero (*Persea americana* Mill.) presenta gran importancia en Cuba, por el amplio consumo de sus frutos y por las posibilidades de comercialización. El desarrollo de programas de mejoramiento en el país, impone la necesidad de establecer metodologías para la multiplicación vegetativa, para el cultivo de embriones maduros e inmaduros, y para el microinjerto *in vitro*, aspectos que constituyen objetivos del presente trabajo. Investigaciones en estas direcciones se están desarrollando en diferentes países a escala mundial (Skene y Barlass, 1983;

Pliago Alfaro *et al.*, 1986; Pliago y Murashige, 1987; Schall, 1987; Solorzano, 1989; González *et al.*, 1991 a; 1991 b; Mohamed-Yasen, 1993; Biasi *et al.*, 1994; Rodríguez *et al.*, 1992; 1993; 1995; 1997; 1998).

## MATERIALES Y MÉTODOS

Todos los experimentos se realizaron en el Departamento de Desarrollo y Extensión Agrícolas, del Instituto de Investigaciones de Cítricos y otros Frutales, en Alquizar, La Habana, Cuba.

El material vegetal estuvo constituido por frutos maduros e inmaduros de diferentes cultivares de aguacatero (*Persea americana* Mill.) procedentes de la colección, y por plantas jóvenes de semillas, e injertadas con los cultivares Suardía y Duke-7, que crecieron en invernaderos, bajo condiciones de humedad relativa y temperatura controladas.

A todos los medios de cultivo se le añadieron 30 g·litro<sup>-1</sup> de sacarosa (excepto en el experimento donde se siguió la técnica de microinjerto de González *et al.*, 1977, donde se utilizó 75 g·litro<sup>-1</sup>), y el pH se ajustó a  $5.7 \pm 0.1$ . Cuando se empleó medio sólido se agregaron 7 g·litro<sup>-1</sup> de agar-agar. En todos los casos la esterilización se realizó en autoclave a 121°C y a una presión de 1.2 kg·cm<sup>-2</sup> durante 15 minutos.

Los cultivos se mantuvieron a una temperatura de  $27 \pm 1^\circ\text{C}$  y a un fotoperíodo de 16 horas luz, con lámparas de luz blanca fluorescente, a una intensidad lumínica de 80 E·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup>.

En todos los análisis de varianza que se detectaron diferencias significativas entre tratamientos, se realizó una prueba de comparación de medias para un nivel de significación del 5% (Duncan, 1960)

### **Cultivo *in vitro* de embriones**

Se colectaron frutos pequeños (1.0-24.0 g) de diferentes cultivares de aguacatero: 'Hass', 'Suardía', 'Catalina', y 'Jaruco N° 1', se lavaron con detergente y agua corriente, y se sumergieron en etanol al 96% para ser flameados en la cámara de flujo laminar previo a la extracción de embriones.

Se extrajeron los embriones adjunto a los cotiledones y se cultivaron en el medio de Murashige y Skoog (1962) diluido al 50% (MS<sup>1/2</sup>), líquido, suplementado con 0.5 mg·litro<sup>-1</sup> de 6-bencil aminopurina (BA), y con 0.5 mg·litro<sup>-1</sup> de BA y 0.5 mg·litro<sup>-1</sup> de ácido giberélico (GA<sub>3</sub>), respectivamente. Cuando comenzaron a separarse los cotiledones, se extrajeron, y la mitad que contenía el embrión se subcultivó en el mismo medio de cultivo, para facilitar la absorción de nutrientes.

Se evaluó el número de embriones contaminados, los muertos, los latentes y los que crecieron en cada caso. Donde se detectó crecimiento se determinaron el número y la longitud de los brotes emitidos.

A los 45 días de cultivo, los brotes se subcultivaron en el medio sólido de Murashige y Skoog (1962) (MS) con 2.0 mg·litro<sup>-1</sup> de ácido indol-3-butírico (AIB). Se consideró la adición o no de carbón activado al 0.5% (p:v). A los 45 días de cultivo se evaluó el número de brotes enraizados.

Además, se escindieron 10 brotes y se injertaron *in vivo* sobre patrones que crecieron bajo condiciones de aislamiento. Las plantas injertadas se mantuvieron a un régimen de alta humedad relativa y una temperatura de  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ . Se determinó el porcentaje de prendimiento.

Se tomaron semillas de frutos maduros y se sometieron al mismo método de desinfección superficial descrito anteriormente. Seguidamente se extrajeron los embriones con una porción pequeña de cotiledón y se cultivaron en los mismos medios de cultivo empleados para embriones inmaduros, pero en estado sólido. Después de 45 días, los brotes emitidos se subcultivaron en un medio MS con  $2.0 \text{ mg}\cdot\text{litro}^{-1}$  de AIB y con la adición o no de CA al 0.5% (p:v).

Se cultivaron embriones maduros en los medios MS y DF (Harty, 1985) sin reguladores del crecimiento y considerando la adición o no de carbón activado al 0.5% (p:v). A los 35 días de cultivo se evaluó el número de embriones que crecieron, y en cada tratamiento se determinó la altura de las plántulas (en mm), la longitud de la raíz principal (en mm), el diámetro a nivel del cuello (en mm), el número de hojas y el número de raíces secundarias. Los datos obtenidos se procesaron directamente, exceptuando las dos últimas variables que se transformaron a  $x^{1/2}$  y a  $(x + 0,5)^{1/2}$ , respectivamente, mediante un análisis de varianza simple, siguiendo un diseño de bloques al azar con 7 réplicas de cuatro embriones cada una.

### **Microinjertos *in vitro***

Se utilizaron como patrones plantas de 'Duke-7', etioladas o no, obtenidas a través de cultivo de embriones maduros. Como fuente de ápices se emplearon yemas terminales de plantas obtenidas de la misma manera que los patrones, pero del cultivar Suardía.

Los microinjertos se realizaron según la metodología descrita por González *et al.* (1977) empleada para cítricos, que consiste en un corte en forma de ventana triangular en el extremo del patrón decapitado, donde se implantó el ápice. Las plantas microinjertadas se cultivaron en medio MS líquido con las vitaminas de White y  $75 \text{ mg}\cdot\text{litro}^{-1}$  de sacarosa.

Patrones de 'Duke-7' obtenidos por la misma vía, se microinjertaron utilizando la técnica sugerida por Pliego-Alfaro *et al.* (1986), con yemas axilares provenientes de plantas jóvenes injertadas del cultivar Suardía. La misma consistió en el aislamiento de la yema practicando un corte en forma de cuña en el vástago previamente desinfectado, la cual se situó en una incisión vertical practicada en el extremo del patrón decapitado. Se utilizó medio MS sólido con  $1.0 \text{ mg}\cdot\text{litro}^{-1}$  de BA.

En ambas metodologías se determinaron los porcentajes de prendimiento.

### **Multiplicación *in vitro***

Se empleó como material vegetal plantas procedentes de semillas e injertadas de 'Duke', las cuales, después de podadas se colocaron en una cámara oscura para inducir la emisión de brotes etiolados. Posteriormente se asperjaron con fungicidas de contacto y sistémicos de forma alternada a intervalos semanales. A partir de los 30-45 días se tomaron secciones de ramas y se practicó la siguiente desinfección superficial: Lavado con agua continua por dos horas; agitación durante quince minutos en

hipoclorito de sodio (1.25% de cloro activo) con tres gotas de tween 80 por cada 100 ml de solución; tres enjuagues con solución acuosa de ácido cítrico (250 mg·litro<sup>-1</sup>) estéril.

Para el establecimiento *in vitro* se emplearon ápices caulinares (1.0 cm) y explantes nodales (0.6 cm) y se cultivaron en los medios MS<sub>M</sub> (Schall, 1987) y DF (Dixon y Fuller, 1976) suplementados con 2.0 mg·litro<sup>-1</sup> de BA (6-bencil aminopurina) y con 2.0 mg·litro<sup>-1</sup> de GA<sub>3</sub> (ácido giberélico), respectivamente. A los 45 días de cultivo se determinaron el porcentaje de brotación y la longitud de los brotes (cm). Los datos se evaluaron a través de análisis de varianza simple, previa transformación a  $\arcsen(x)^{1/2}$  en el primer caso y a  $x + 0.5$  en el segundo.

Brotos de aproximadamente 1.0 cm se subcultivaron en MS<sub>M</sub> y DF suplementados con 2.0 y con 5.0 mg·litro<sup>-1</sup> de BA. Se evaluó además el efecto de la adición de 40 mg·litro<sup>-1</sup> de L-arginina y L-glutamina. Se determinaron el número de brotes por explante y su crecimiento (cm), así como el grado de expansión del limbo foliar de forma cualitativa. Los datos del número de brotes por explante se transformaron a  $(x)^{1/2}$  y se evaluaron a través de análisis de varianza simple. Los brotes se clasificaron en dos categorías de acuerdo a su tamaño: (0.5-1.0 cm) y (1.1-2.0 cm) y se determinaron los porcentajes en cada caso. Los datos se evaluaron mediante análisis de varianza simple previa transformación a  $\arcsen(x)^{1/2}$ .

Para el enraizamiento *in vitro* se empleó el medio basal DF suplementado con 2.0 mg·litro<sup>-1</sup> de AIB (ácido indol-3-butírico); 2.0 mg·litro<sup>-1</sup> de AIB + 1.0 mg·litro<sup>-1</sup> de GA<sub>3</sub>; 5.0 mg·litro<sup>-1</sup> de AIB y 5.0 mg·litro<sup>-1</sup> de AIB + 1.0 mg·litro<sup>-1</sup> de GA<sub>3</sub>. En todos los casos se adicionó CA al 0.5% (p:v). A los 60 días se determinó el porcentaje de brotes enraizados y los datos se procesaron mediante análisis de varianza simple, previa transformación a  $\arcsen(x)^{1/2}$ .

Las plantas obtenidas se subcultivaron durante 15 días en medio líquido con las sales de DF reducidas al 50% sin reguladores del crecimiento y 15 g·litro<sup>-1</sup> de sacarosa, y se incorporó luz incandescente al sistema de iluminación antes de la aclimatación.

## RESULTADOS

### **Cultivo *in vitro* de embriones**

En el Cuadro 1, se exponen los resultados obtenidos con embriones inmaduros cultivados en ambos medios de cultivo. Se detectó que el porcentaje de contaminación fue relativamente alto, debido fundamentalmente a la presencia de bacterias en los frutos colectados.

Se observó que el porcentaje de embriones establecidos es bajo, si se toma en consideración el total cultivado *in vitro*; sin embargo, los que se mantuvieron latentes, y donde sólo se observó un engrosamiento de los cotiledones, son reducidos (Cuadro 1). La respuesta fue superior en el medio que contenía GA<sub>3</sub>, pero en ambos se detectó la emisión de 3 a 10 brotes por embrión, los cuales pueden llegar a tener entre 2.0 y 5.0 cm de altura, y con la presencia de gran número de hojas con la lámina foliar reducida. En embriones maduros hubo respuesta similar en el 60.0% de los cultivos.

**Cuadro 1.** Influencia del medio de cultivo sobre el comportamiento *in vitro* de embriones inmaduros de *Persea americana* Mill.

CULTIVAR	TOTAL DE EMBRIONES	CONTAMINADOS (%)		MUERTOS (%)	LATENTES (%)	CON BROTES (%)
		HONGOS	BACTERIAS			
Medio: MS <sup>1/2</sup> + 0.5 mg·litro <sup>-1</sup> BA						
Hass	161	4.34	16.14	47.00	1.97	30.55
Suardía	22	0.00	47.74	16.63	2.00	33.63
Catalina	25	0.00	48.00	32.00	0.00	20.00
Medio: MS <sup>1/2</sup> + 0,5 mg·litro <sup>-1</sup> BA + 0,5 mg·litro <sup>-1</sup> GA <sub>3</sub>						
Jaruco N° 1	25	0.00	23.33	28.20	1.80	46.67
Suardía	27	0.00	24.44	35.03	2.00	38.53
Catalina	27	3.00	26.00	29.62	2.86	38.51

MS<sup>1/2</sup> : Medio de Murashige y Skoog (1962) a la mitad de su concentración original.

Se pudo constatar que los embriones provenientes de frutos con una masa menor de 10.0 g, o lo que es equivalente, de una longitud de 30.0 – 40.0 mm, prácticamente no responden a ninguno de los medios empleados.

El subcultivo a un medio sólido con 2.0 mg·litro<sup>-1</sup> de AIB y 0.5% de CA provocó el 33.8% de enraizamiento en los brotes provenientes de embriones inmaduros. Cuando se emplearon brotes obtenidos a partir de embriones maduros se alcanzó el 40.15% de enraizamiento.

Se pudo comprobar además, que el injerto *in vivo* de los brotes sobre patrones que crecieron bajo condiciones de aislamiento fue exitoso en el 70.0 % de los casos.

**Cuadro 2.** Influencia de los medios de cultivo sobre el crecimiento *in vitro* de embriones maduros de *Persea americana* Mill.

VARIABLES	TRATAMIENTOS				E.S.	C.V. (%)
	MS		DF			
	+CA	-CA	+CA	-CA		
Altura (mm)	42.4 a	31.5 c	40.7 a	37.2 b	4.1*	10.86
Diámetro a nivel del cuello (mm)	1.92	1.86	1.62	1.77	0.1	3.87
Número de hojas	12.3	11.6	12.6	11.4	0.2	5.53
Longitud de la raíz (mm)	103.1 b	128.9 a	131.7 a	105.0 b	8.4*	7.20
Número de raíces secundarias	1.7 b	0.0.d	3.4 a	0.4 c	0.1*	0.18

MS: Medio de Murashige y Skoog (1962), DF: Medio de Dixon y Fuller (1976), +CA: Con carbón activado (0.5 mg·litro<sup>-1</sup>), -CA: Sin carbón activado.

El cultivo de embriones maduros en los medios MS y DF, sin la adición de reguladores del crecimiento y con el suplemento o no de CA (0.5%), demostró resultados

alentadores. En todos los casos se formaron plántulas en más del 80.0 % de los cultivos.

En el Cuadro 2 se muestran los resultados obtenidos producto de las mediciones de las cinco variables evaluadas. En tres de ellas se detectaron diferencias significativas entre tratamientos: altura de los brotes, longitud de la raíz principal y el número de raíces secundarias. Los mejores resultados se obtuvieron en el medio DF suplementado con CA. También en el medio MS con CA se obtuvieron resultados alentadores, pero el desarrollo del sistema radical fue más pobre.

### Microinjertos *in vitro*

De los microinjertos realizados por el método de González *et al.* (1977), prendieron el 20.0 % cuando se utilizaron patrones sin etiolar, y crecieron sólo el 11.4%. La aclimatación de las plantas microinjertadas fue baja. El empleo de patrones etiolados fue totalmente inefectivo.

Cuando se empleó la técnica sugerida por Pliego-Alfaro *et al.* (1986) el prendimiento de los microinjertos fue sólo del 5.0 %. Se produjo oxidación de los tejidos tanto en las yemas como en el corte realizado al patrón. Al igual que en el caso anterior, la adaptación de las plantas en la fase de aclimatación fue baja.

**Cuadro 3.** Efecto del medio de cultivo y del tipo de explante sobre el establecimiento *in vitro* en *P. americana* Mill.

Tipo de explante	Medio Basal	Reguladores (mg·litro <sup>-1</sup> )		Altura del brote (cm)	Porcentaje de brotación
		BA	GA <sub>3</sub>		
N	MS <sub>M</sub>	2.0	-	0.33 cd <sup>z</sup>	28.5 c
N	MS <sub>M</sub>	2.0	2.0	0.80 b	46.5 b
N	DF	2.0	-	0.48 c	30.1 c
N	DF	2.0	2.0	2.33 a	97.0 a
A	MS <sub>M</sub>	2.0	-	0.15 a	4.8 c
A	MS <sub>M</sub>	2.0	2.0	0.46 c	12.8 d
A	DF	2.0	-	0.48 c	16.0 d
A	DF	2.0	2.0	0.53 c	19.5 cd
E.S.				0.07*	0.09*
C.V. (%)				6.39	8.33

<sup>z</sup>Letras iguales en una misma columna no difieren para un nivel de significación del 5%.

BA: 6 bencil aminopurina, GA<sub>3</sub>: ácido giberélico, N: explantes nodales, A: ápices caulinares, MS<sub>M</sub>: medio basal de Schall (1987), DF: medio basal de Dixon y Fuller (1976).

### Multiplicación *in vitro*

Plantas procedentes de semillas:

La brotación durante la fase de establecimiento *in vitro* estuvo influenciada por el tipo de explante y de medio basal, así como por la combinación de reguladores del crecimiento (Cuadro 3). Los mayores valores se alcanzaron en explantes nodales, los

que generalmente difirieron significativamente del resto, y hubo mayor efectividad cuando se empleó medio DF con la adición de 2.0 mg·litro<sup>-1</sup> de BA y 2.0 mg·litro<sup>-1</sup> de GA<sub>3</sub>, al considerar las dos variables evaluadas. El crecimiento en los ápices caulinares fue a partir del desarrollo de yemas laterales y no por la elongación de la apical.

Durante la fase de multiplicación *in vitro* se obtuvieron mejores resultados en los medios que contenían 2.0 mg·litro<sup>-1</sup> de BA, lo cual se puso de manifiesto a través de un mayor crecimiento de los brotes (Cuadro 4). La adición de 5.0 mg·litro<sup>-1</sup> del regulador tuvo un efecto negativo que provocó el deterioro y la muerte de algunos explantes. En casi todos los tratamientos no se detectaron la formación de brotes múltiples, solamente cuando al medio DF se adicionó 2.0 mg·litro<sup>-1</sup> de BA se obtuvieron 2 brotes de forma eventual. Cuando se incorporaron la L-arginina y la L-glutamina a razón de 40 mg·litro<sup>-1</sup> se vio favorecido el desarrollo de la lámina foliar.

**Cuadro 4.** Efecto del medio de cultivo sobre la multiplicación *in vitro* en *Persea americana* Mill.

Medio Basal	Regulador BA (mg·litro <sup>-1</sup> )	Aminoácidos (mg/L)			Tasa de multiplicación	Crec. brotes (%)	
		L-glutamina + L-arginina				0.5-1.0 cm	1.1-2.5 cm
MS <sub>M</sub>	2.0	-	+	-	1.0	17.2 bc <sup>z</sup>	91.4 ab
MS <sub>M</sub>	5.0	-	+	-	1.0	94.0 a	16.0 c
DF	2.0	-	+	-	1.2	8.6 bc	91.4 ab
DF	5.0	-	+	-	1.0	84.0 a	16.0 c
MS <sub>M</sub>	2.0	40	+	40	1.0	20.0 b	80.0 b
MS <sub>M</sub>	5.0	40	+	40	1.0	86.0 a	14.0 c
DF	2.0	40	+	40	1.3	5.0 c	95.0 a
DF	5.0	40	+	40	1.0	88.0 a	12.0 c
E.S.					0.6 (NS)	0.13*	0.16*
C.V(%)					5.66	8.66	10.31

<sup>z</sup>Letras iguales en una misma columna no difieren a un nivel de significación del 5%.

BA: 6 bencil aminopurina, MS<sub>M</sub>: medio basal de Schall (1987), DF: medio basal de Dixon y Fuller (1976).

El Cuadro 5 muestra que los medios que contenían sólo AIB, fueron poco efectivos para inducir el enraizamiento *in vitro*, todos con porcentajes de éxito inferiores a 50%. Los mejores resultados se obtuvieron cuando se emplearon 2.0 ó 5.0 mg·litro<sup>-1</sup> de AIB combinados con 1.0 mg·litro<sup>-1</sup> de GA<sub>3</sub>. En ninguno de los tratamientos hubo desarrollo de raíces secundarias. La aclimatación fue superior al 70%, pero el crecimiento de las plantas fue lento.

Plantas injertadas etioladas:

El total de explantes nodales con brotación fue del 48% en el medio DF con 2.0 mg·litro<sup>-1</sup> de BA y 2.0 mg·litro<sup>-1</sup> de GA<sub>3</sub>, y la altura promedio de los brotes fue de 1.25 cm. Prácticamente no hubo respuesta positiva cuando se utilizaron brotes apicales. La tasa de multiplicación siempre fue de 1.0 y el crecimiento fue limitado en los brotes

subcultivados en el mismo medio basal con 2.0 mg·litro<sup>-1</sup> de BA, y hubo mayor desarrollo del limbo foliar cuando se adicionó 40.0 mg·litro<sup>-1</sup> de L-arginina y L-glutamina. El enraizamiento fue inferior al 30% en todos los medios utilizados. En DF suplementado con 2.0o con 5.0 mg·litro<sup>-1</sup> de AIB combinados con 1.0 mg·litro<sup>-1</sup> de GA<sub>3</sub> fue del 20.0y del 26.6%, respectivamente. La aclimatación fue exitosa en el 50% de las plantas, las cuales crecieron muy lentamente.

**Cuadro 5.** Influencia del medio de cultivo sobre el enraizamiento *in vitro* en *Persea americana* Mill.

Medio Basal	Reguladores (mg·litro <sup>-1</sup> )			Porcentaje de enraizamiento
	AIB	GA <sub>3</sub>	BA	
DF	2.0	-	-	43.3 c <sup>z</sup>
DF	5.0	-	-	25.0 d
DF	2.0	1.0	-	83.3 b
DF	5.0	1.0	-	98.0 a
E.S.				0.05*
C.V.(%)				3.01

<sup>z</sup>Letras iguales no difieren a un nivel de significación del 5 %.

AIB: ácido indol - 3 – butírico, GA<sub>3</sub>: ácido giberélico, BA: 6-bencil-adenina, DF: medio basal de Dixon y Fuller (1976).

## DISCUSIÓN

La implementación de la técnica de cultivo de embriones de aguacatero, responde a diferentes problemas de orden práctico que se presentan en el campo del mejoramiento genético de este frutal. La producción de híbridos a través de polinizaciones dirigidas se ve afectada por la gran cantidad de frutos que se pierde en la fase de cuajado, de ahí la importancia que presenta el cultivo de embriones inmaduros para salvar genotipos deseados. Los resultados obtenidos en este caso, coinciden con los de Skene y Barlass (1983) y Rodríguez *et al.* (1993, 1995), ya que se obtienen brotes múltiples con la adición de BA al medio de cultivo. Se comprobó que el GA<sub>3</sub> provoca además un efecto positivo en los primeros estadios del desarrollo de los mismos, resultados que coinciden con los de Nel y Kotze (1982).

Dos de los inconvenientes de esta técnica son la alta tasa de contaminación por bacterias que presentan los frutos pequeños que se desprenden de los árboles, y el hecho de que los frutos de dimensiones muy pequeñas no responden a ella. Skene y Barlass (1983), lograron el 60.0 % de los cultivos sólo en frutos de 100 días de formados, lo que confirma los resultados obtenidos.

El cultivo *in vitro* de embriones maduros se ha empleado para la selección de genotipos resistentes a la salinidad (González-Rosas *et al.*, 1991b), y para el rejuvenecimiento de cultivares como paso previo a la micropropagación (Pliego-Alfaro *et al.*, 1986; Pliego y Murashige, 1987). La obtención de patrones bien conformados se logró preferentemente en el medio DF sin suplemento de reguladores del crecimiento y la adición de carbón activado al 0.5%. Los microinjertos realizados, siguiendo las

técnicas de González *et al.* (1977) y de Pliego-Alfaro *et al.* (1986), tuvieron bajos prendimientos, debido posiblemente a problemas de manipulación y a la oxidación de los tejidos.

En especies leñosas la capacidad morfogenética bajo condiciones *in vitro* está ligada al empleo de materiales con características juveniles (Pliego-Alfaro, 1986;). Esto limita la propagación de individuos adultos seleccionados que puedan presentar resistencia a enfermedades y a estrés ambientales. Para el rejuvenecimiento del aguacatero se han usado con éxito los microinjertos sucesivos de yemas adultas en patrones juveniles (Pliego-Alfaro, *et al.*, 1986; 1990; Pliego-Alfaro y Murashige, 1987), las brotaciones jóvenes después de podas severas (Pliego-Alfaro, 1986; Biasi *et al.*, 1994) y los brotes etiolados (Schroeder, 1979; Cooper, 1987; Solorzano, 1989; Solorzano *et al.*, 1989; Capote *et al.*, 1995; Rodríguez *et al.*, 1998). Este último método, aunque resultó útil para las dos fuentes de explantes empleadas, los mejores resultados se obtuvieron cuando el material vegetal provenía de semillas. González y Salazar (1984) informaron que los explantes procedentes de plantas parcialmente etioladas fueron los de mejor comportamiento durante la multiplicación *in vitro* de esta especie.

Para la propagación *in vitro* de esta especie se han empleado diferentes medios minerales: MS (Mohamed-Yasseen, 1993); MS con los macroelementos diluidos al 50 % (Nel y Kotze, 1982; González y Salazar, 1985; Schall, 1987; Solorzano *et al.* 1989; Biasi *et al.*, 1994); DF (Harty, 1985; Capote *et al.*, 1995; Rodríguez *et al.*, 1998) y WPM (Cooper, 1987). Los resultados obtenidos demostraron que el medio basal de Dixon y Fuller (1976) resultó eficiente para las diferentes fases del cultivo.

La inducción de brotes durante el establecimiento *in vitro* fue superior cuando se adicionó BA y GA<sub>3</sub> a cada medio basal. Resultados similares fueron informados por Nel y Kotze (1983) y por Solorzano *et al.* (1989). Se sugiere que el ácido giberélico logra romper el letargo de las yemas axilares en el aguacatero (Young, 1983), aunque Biasi *et al.* (1994) detectaron un incremento significativo del porcentaje de brotaciones anormales, con hojas retorcidas y cloróticas, quebradizas, poco expandidas y de fácil abscisión cuando se adicionó este regulador del crecimiento al medio de cultivo. Las diferencias detectadas pueden deberse a que los explantes fueron tomados de distintos cultivares; sin embargo, las respuestas a 2.0 mg·litro<sup>-1</sup> de BA fueron efectivas en los aguacateros 'Fuerte' (Schall, 1987), 'Colin V-33' y una selección de la raza Antillana (Solorzano, 1989; Solorzano *et al.*, 1989) y 'Oro Verde' (Biasi *et al.*, 1994).

Prácticamente no se detectó la formación de brotes múltiples en casi ninguno de los medios empleados. De forma similar, Solorzano (1989) obtuvo una tasa de multiplicación de 1 si los reguladores del crecimiento eran añadidos antes de la esterilización de los medios, pero fue de 3 para el 'Colin -V-33' y de 4 para una selección de la raza Antillana cuando incorporaron 2.0 mg·litro<sup>-1</sup> de BA y GA<sub>3</sub>, respectivamente, con el auxilio de un filtro miliporo. También Pliego-Alfaro *et al.* (1987) lograron 2 ± 0.6 en el portainjerto 'GA-13' con 1.0 mg·litro<sup>-1</sup> de BA y de 2.2 ± 0.4 en el 'IV-8' con 0.65 mg·litro<sup>-1</sup> del regulador. Biasi *et al.* (1994) detectaron una respuesta lineal entre la concentración de citoquininas y la tasa de multiplicación del aguacatero 'Oro Verde', con máximos de 2.7 con 4.0 mg·litro<sup>-1</sup> de kinetina y 2.4 con BA a la misma concentración. Sin embargo, Harty (1985) logró 6.1 brotes por explantes con 10.0 mg·litro<sup>-1</sup> de kinetina en el portainjerto 'Duke-7', cuando empleó material juvenil

procedente de plántulas. Se ha informado que concentraciones iguales o superiores a 4.0 mg-litro<sup>-1</sup> de BA o de kinetina pueden provocar la vitrificación de los tejidos en este cultivo (Schall, 1987; Biasi *et al.*, 1994). Un efecto similar se detectó por Pliego-Alfaro *et al.* (1987), López-Encina y Barceló-Muñoz (1986) y por Barceló-Muñoz *et al.* (1995) cuando utilizaron medios de doble fase en la etapa de propagación de propágulos.

Una de las dificultades fundamentales que tiene la micropropagación de especies leñosas es la inducción del enraizamiento. Los porcentajes de éxito fueron superiores cuando se partió de material vegetal obtenido de semillas y al medio DF se le adicionó BA y GA<sub>3</sub>. Con material juvenil se empleó 2.0 mg-litro<sup>-1</sup> de AIB (Mohamed-Yasseen (1993) con resultados parciales. También se logró un 60.0 % con 1.0 mg-litro<sup>-1</sup> de AIB a pH = 5-7 y un 40.0 % a pH = 9 (Cooper, 1987). Nel y Kotze (1982) no tuvieron éxito con concentraciones comprendidas entre 0 y 5.0 mg-litro<sup>-1</sup> del regulador. En material adulto, la exposición de brotes en medio salino MS a la tercera parte de su concentración original con 25.0 mg-litro<sup>-1</sup> de AIB durante tres días y el subcultivo al mismo medio basal sin reguladores permitió un 30.0- 40.0 % de enraizamiento en los portainjertos 'GA-13' y 'IV-8' cuando el material vegetal se rejuveneció a través del microinjerto y sólo de 0 - 5.0 % si no se empleaba esta técnica (Barceló-Muñoz *et al.*, 1988; Pliego-Alfaro *et al.*, 1990). Barceló-Muñoz *et al.* (1995) lograron 40.0- 50.0 % en el patrón 'RR-86' y lo incrementaron a 70.0- 80.0 % si permanecían tres días a la oscuridad. Aplicando esta metodología Biasi *et al.* (1994) obtuvieron un 40.0 % de enraizamiento en el aguacatero de 'Oro Verde'. Se comprobó que la adición de carbón activado a razón de 1 g-litro<sup>-1</sup> tuvo un efecto positivo en esta fase del cultivo *in vitro* (Pliego-Alfaro *et al.*, 1987, 1990; Barceló-Muñoz *et al.*, 1988, 1995). Tanto en la fase de multiplicación como de enraizamiento el desarrollo de la lámina foliar se vio favorecida con la adición de L-arginina y L-glutamina a razón de 40.0 mg-litro<sup>-1</sup>, resultados que confirman los obtenidos por Harty (1985).

El crecimiento lento que se apreció posterior a la adaptación *ex vitro* fue señalado también por Azcón-Aguilar *et al.* (1992) y por Vidal *et al.* (1992), y demostraron que la inoculación de sustratos con *Glomus* sp. favorece el desarrollo posterior de las plantas micropropagadas de aguacatero.

#### LITERATURA CITADA

- AZCÓN-AGUILAR, C.; BARCELÓ, A.; VIDAL, M.T.; DE LA VIÑA, G. 1992. Further studies on the influence and development of micropropagated avocado plants. *Agronomie* 12: 837-840.
- BARCELÓ-MUÑOZ, A.; PLIEGO-ALFARO, F.; BAREA, J.M. 1988. Micropropagación de aguacate (*Persea americana* Mill). Actas III Congreso, S.E. C.H. Puerto de la Cruz, Tenerife, Islas Canarias, pp. 293-296.
- BARCELÓ-MUÑOZ, A.; SIMÓN, E.; JURADO, I.; BARCELÓ-MUÑOZ, M.; LA VIÑA, G. ; PLIEGO-ALFARO, F. 1995. Micropropagación del portainjerto de aguacate RR-86. VI, Congreso S.E.C.H. Barcelona, España. 292 p.
- BIASI, L.A.; KOLLER, O.C.; KÄMPT, A.N. 1994. Micropropagação do abacateiro 'Ouro Verde' a partir de segmentos nodais. *Pesq. Agrop. Bras.* 29(7): 1051-1058.
- CAPOTE, M.; LIMA, H.; RODRÍGUEZ, N.N.; RODRÍGUEZ, O.L.; BLANCO, M. 1995. Primeros resultados en la micropropagación del aguacatero (*Persea americana* Mill) en Cuba. I Simposio Int. sobre Frut. Trop. y Subtrop. La Habana, Cuba. pp. 88-89.

- COOPER, P. 1987. Advances in the micropropagation of avocado (*Persea americana* Mill). Acta Horticulturae 212: 571-575.
- DIXON, A.; FULLER, K.W. 1976. Effect of synthetic auxin levels on *Phaseolus vulgaris* L. Physiol. Plant Pathol. 11: 287-292.
- DUNCAN, D. 1960. Critical values for Duncan's new multiple range test. Biometrics pp. 677-678.
- GONZÁLEZ, H.; SALAZAR, S. 1984. Root induction and vegetative development from avocado plantules. Calif. Avoc. Soc. Yearbook 68: 167-171.
- GONZÁLEZ, M.; PEÑA, I.; GONZÁLEZ, J.; ZAMORA, V.; RODRÍGUEZ, I. 1977. Introducción en Cuba del microinjerto *in vitro* de ápices de brotes en el género *Citrus* y géneros afines como una forma de obtener plantas libres de virus. Agrotecnia de Cuba 9(2): 61-71.
- GONZÁLEZ-ROSAS, H.; LLANO, B. E.; SALAZAR, S. 1991a. Effect of IBA, kinetin and benzyl amino purine on the germination, shoot development, and root formation in avocado embryos cultivated *in vitro*. World Avocado Congress II. University of California. California Avocado Society. p. 139.
- GONZÁLEZ-ROSAS, H.; RAMÍREZ, G.; RODRÍGUEZ, J.L., SALAZAR, S. 1991b. Preliminary results on *in vitro* selection for tolerance to chloride excess in avocado. World Avocado Congress II. University of California. California Avocado Society. p. 140.
- HARTY, P.A. 1985. Propagation of avocados by tissue culture: development of culture medium for multiplication of shoots. South African Avocado Growers' Association Yearbook 8: 70-71.
- LÓPEZ-ENCINA, C.; BARCELÓ-MUÑOZ, A.. 1986. Selección de patrones de aguacate. Uso de la técnica de doble fase para multiplicación *in vitro* del material seleccionado. Actas II Congreso, S.E.C.H. Cordova, España, pp. 905-909.
- MOHAMED-YASSEEN, Y. 1993. *In vitro* propagation of avocado (*Persea americana* Mill). Calif. Avoc. Soc. Yearbook 77: 107-111.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15: 473-497.
- NEL, D.; KOTZÉ, J.M. 1982. Tissue culture of avocado. South Africa Avocado Growers' Association Yearbook 5: 68-70.
- PLIEGO-ALFARO, F.; BARCELÓ-MUÑOZ, A.; LÓPEZ-ENCINA, C. 1986. Rejuvenecimiento de una planta leñosa frutal, aguacate, y su propagación por cultivo de tejidos. Expociencia pp. 97-103.
- PLIEGO-ALFARO, F.; MURASHIGE, T. 1987. Possible rejuvenation of avocado by graftage onto juvenile rootstocks *in vitro*. HortScience 22(6): 1321-1324.
- PLIEGO-ALFARO, F.; LÓPEZ-ENCINA, C.; BARCELÓ-MUÑOZ, A. 1987. Propagation of avocado rootstocks by tissue culture. South Africa Avocado Growers' Association Yearbook 10: 36-39.
- PLIEGO-ALFARO, F.; BARCELÓ-MUÑOZ, A.; HERRERO, A.; LÓPEZ-ENCINA, C. 1990. Micropropagación de especies subtropicales. Hortifruticultura 8: 47-50.
- RODRÍGUEZ, N. N.; RODRÍGUEZ, O.L.; ALVAREZ, M. 1992. Cultivo de embriones maduros e inmaduros de *Persea americana* Mill. VIII Seminario INCA. I Taller Internacional sobre Biofertilización en los Trópicos. La Habana, Cuba. p. 81.

- RODRÍGUEZ, N. N.; RODRÍGUEZ, O.L.; ALVAREZ, M. 1993. Cultivo *in vitro* de embriones maduros e inmaduros como vía para el mejoramiento genético del aguacatero (*Persea americana* Mill.). IV Simposio de Botánica. La Habana, Cuba. p. 314.
- RODRÍGUEZ, N. N.; RODRÍGUEZ, O.L.; ALVAREZ, M.; CAPOTE, M. 1995. Aplicación del cultivo *in vitro* de embriones maduros e inmaduros de aguacatero en programas de cuarentena y de mejoramiento genético. Primer Simposio Internacional sobre Fruticultura Tropical y Subtropical. La Habana, Cuba. p. 92.
- RODRÍGUEZ, N.N.; FUENTES, V.; RODRÍGUEZ, O.L.; ALVAREZ, M. 1997. Cultivo *in vitro* de embriones maduros e inmaduros de aguacatero (*Persea americana* Mill). Agricultura Técnica (Chile) 57 (2): 154-158.
- RODRÍGUEZ, N.N.; MAS, O.; CAPOTE, M. 1998. Avances en la propagación *in vitro* de frutales cultivados bajo condiciones tropicales. III Encuentro Lationamericano de Biotecnología Vegetal. La Habana, Cuba. pp. 107-108.
- SCHALL, S. 1987. La multiplicación de avocatero (*Persea americana* Mill. Cv. Fuerte) por microboutarage *in vitro*. Fruits 42(3): 171-176.
- SCHROEDER, C. A. 1979. Etiolation and avocado bud elongation *in vitro*. Calif. Avoc. Soc. Yearbook 63: 86-89.
- SKENE, K. G. M.; BASLASS, M. 1983. *In vitro* culture of abscised immature avocado embryos. Annals of Botany 52: 667-672.
- SOLORZANO, D.E. 1989. Propagation *in vitro* of rootstocks of avocado. Calif. Avocado Soc. Yearbook 73: 149-151.
- SOLORZANO, D.E.; LÓPEZ, A.; CAPOTE, M. 1989. La propagación *in vitro* de dos portainjertos de aguacate. Ciencia y Técnica en la Agricultura. Cítricos y Otros Frutales 12(3): 17-23.
- VIDAL, M.T.; AZCÓN-AGUILAR, C.; BAREA, J.M. 1992. Mycorrhizal inoculation enhances growth and development of micropropagated plants of avocado. HortScience 27 (7): 785-787.
- YOUNG, M.J. 1983. Avocado callus and bud cultured. Proceedings of the Florida State Horticultural Society Tallahassee 96: 181-182.