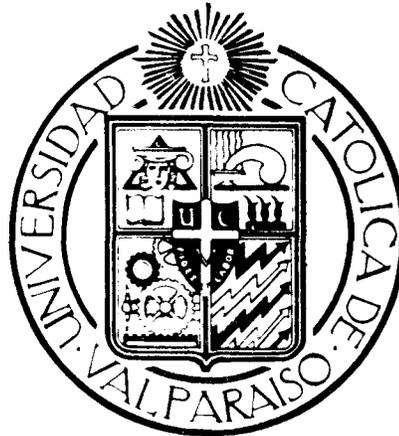


**UNIVERSIDAD CATOLICA DE VALPARAISO**  
**FACULTAD DE AGRONOMIA**

**AREA DE FRUTICULTURA**

---



**TALLER DE TITULACION**

**PROPAGACION *in vitro* DE PORTAINJERTOS DE PALTO (*Persea americana* Mill.)  
RESISTENTES A SALINIDAD, cv. VELVICK Y LULA**

**EDUARDO ANDRES OYANEDEL MOYA**

**QUILLOTA CHILE  
1995**

## ÍNDICE DE MATERIAS

1.	INTRODUCCIÓN	1
2.	REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	3
2.1.	Principios fisiológicos de la resistencia a sales	3
2.2.	Portainjertos resistentes a sales	5
2.2.1.	Lula	5
2.2.2.	Velvick	6
2.3.	Propagación clonal en palto	7
2.3.1.	Propagación por etiolación y acodo	7
2.3.2.	Propagación por acodo aéreo	8
2.3.2.	Propagación por estacas	8
2.4.	Micropropagación del palto	9
2.4.1.	Selección del explante	10
2.4.2.	Tratamientos de desinfección	12
2.4.3.	Pardeamiento y antioxidantes	12
2.4.4.	Medios de cultivo	14
2.4.5.	Organogénesis <u>in vitro</u>	15
2.4.5.1.	Emisión de brotes	15
2.4.5.2.	Rizogénesis	16
2.4.6.	Cultivo de embriones	17
2.4.7.	Aclimatación de plántulas	18
3.	MATERIAL Y METODO	19
4.	PRESENTACION Y DISCUSION DE RESULTADOS	40
5.	CONCLUSIONES	81

6.	RESUMEN	82
7.	LITERATURA CITADA	83

## ABREVIATURAS

<b>AIB:</b>	Acido indol butírico
<b>ANA:</b>	Acido naftalén acético
<b>BA:</b>	Benziladenina
<b>CA:</b>	Carbón activado
<b>CPPU:</b>	Forchlorfenuron (1-(2-cloro-4-piridil)-3-fenilurea)
<b>DIECA:</b>	Dietilditiocarbamato
<b>GA<sub>3</sub>:</b>	Acido giberélico
<b>N45K:</b>	Medio de cultivo MARGARA (1988)
<b>MS:</b>	Medio de cultivo MURASHIGE y SKOOG (1962)
<b>PAL:</b>	Enzima Fenilalanina amonio liasa
<b>PPO:</b>	Enzima Polifenol oxidasa
<b>PVP-360:</b>	Polivinil pirrolidona (PVP-360, Sigma)
<b>PVP:</b>	Polivinil pirrolidona (Polyclar AT, Serva)
<b>PVPP:</b>	Polivinil polipirrolidona (P-6755, Sigma)
<b>TDZ:</b>	Tidiazurón (1-fenil-3-(1,2,3-tiadiazol-5-yl) úrea)
<b>WPM:</b>	Medio de cultivo LLOYD y McCOWN (1981)

## 1. INTRODUCCIÓN

El palto (Persea americana Mill.) es uno de los frutales subtropicales más importantes que se cultivan en Chile. Se estima que en 1992 existían 9.376 ha con esta especie, lo que permitió exportar 1.3 millones de cajas, siendo el principal mercado de destino el estadounidense (CIREN-CORFO, 1993).

El aumento de la superficie cultivada con palto se limita por condiciones climáticas, edáficas y patológicas. Se trata de una especie sensible a las heladas, por lo cual no soporta temperaturas menores a  $-2^{\circ}\text{C}$ , dependiendo de la variedad. Por otra parte, es muy sensible a asfixia radical y salinidad, requiriendo suelos bien drenados, con más de 1 metro de profundidad efectiva, dependiendo de la pendiente.

La posibilidad de disponer de un número apreciable de plantas de palto sobre un portainjerto resistente a salinidad, abre la expectativa de aumentar la superficie plantada en zonas con climas cálidos (sin heladas), pero con problemas de suelo o agua de riego con altos niveles de salinidad.

Sin embargo, para establecer plantaciones sobre patrones clonales, es necesario desarrollar métodos de propagación vegetativa, ya que las características de resistencia pueden perderse al utilizar una propagación por semillas, ello sin contar con las ventajas de utilizar un pie clonal, como uniformidad, productividad conocida (predecible) y compatibilidad descrita.

El objetivo general de esta investigación es determinar la factibilidad de la propagación in vitro de dos portainjertos de Persea americana resistentes a salinidad.

Los objetivos específicos son establecer sistemas de desinfección para el material vegetal de campo, que permitan iniciar un cultivo aséptico; establecer los medios de cultivo y condiciones hormonales específicas para la fase de establecimiento; desarrollar métodos para el control del pardeamiento enzimático en los tejidos cultivados in vitro; y, finalmente, determinar las condiciones óptimas para lograr una proliferación de los explantes.

## 2. REVISION BIBLIOGRAFICA

### 2.1. Principios fisiológicos de la resistencia a sales:

LEVITT (1980) señala que existen dos formas mediante las cuales se produce un estrés salino: aumento del potencial osmótico, como resultado de la alta concentración de solutos, y un efecto tóxico debido a la alta concentración de iones. En consecuencia, existe un estrés salino, en el cual el potencial hídrico tiene valores de 0.05 a 0.1 MPa, y un estrés iónico, provocado por un ion específico en un medio con baja concentración de sales.

En la práctica, las condiciones limitantes se caracterizan por concentraciones mucho mayores que lo necesario para un potencial hídrico de 0.1 MPa y la concentración del ión que causa el estrés es mucho más baja.

La edad de la planta puede afectar la tolerancia a las sales, así como la evaluación de la resistencia. En las especies frutales, las plantas se hacen más sensibles conforme avanzan en edad. Los iones sodio y cloro se acumulan más rápidamente en hojas, observándose que las quemaduras de hojas se desarrollan más temprano durante la estación de crecimiento y con una mayor severidad en plantas más viejas. La causa de esta susceptibilidad con la edad estaría dada por la acumulación de sales en las raíces y en el tronco (QUAMME y STUSHNOFF, 1988).

Los mecanismos de tolerancia que se han descrito, son los siguientes (LEVITT, 1980):

- a. Suculencia, cuyo efecto es la dilución intracelular de sales.
- b. Glándulas excretoras de sal, que reducen la concentración de éstas en la planta.
- c. Aumento del potencial hídrico a valores de -2 a 4 MPa, lo que equivale a una concentración de iones de 400 a 700 mM.
- d. Alta absorción de iones, con una alta concentración interna de éstos para mantener el turgor.
- e. Síntesis y acumulación de solutos orgánicos (como carbohidratos, aminoácidos y ácidos orgánicos), para mantener el turgor.

Los síntomas de estrés salino en frutales son, principalmente, una reducción del tamaño del fruto y su calidad, quemaduras de hojas desde las puntas hacia los márgenes y hasta necrosis en estados avanzados de acumulación (QUAMME y STUSHNOFF, 1988). Según estos mismos autores, los mecanismos de resistencia al daño por sales no están aún bien definidos, pero en las especies glicófitas -que incluyen a la mayoría de los frutales- se ha advertido que resisten a la salinidad mediante la regulación del movimiento de las sales a la parte aérea y la absorción de los iones vía la membrana y el tonoplasto. Las halófitas (donde sólo hay pocas especies frutícolas) absorben sales, pero las eliminan mediante la excreción o compartimentación.

## 2.2. Portainjertos resistentes a sales:

### 2.2.1. Lula.

Es una variedad comercial, que ha sido utilizada como portainjerto a través de sus semillas. Híbrido Guatemalteco x Mexicano, obtenido hace 35 años como planta franca espontánea en Florida (BRINGHURST, 1988). Tipo polinizador A (IBAR, 1986).

Es un árbol alto, de rápido crecimiento y de gran capacidad de fructificación; es poco resistente a enfermedades cripto- gámicas y bastante a las heladas. Por su gran resistencia a la salinidad, se cultiva en el valle de Jordán (Israel).

Su fruto es piriforme, pesa entre 400 a 600 gr, de corteza verdosa salpicada de puntos amarillos, lisa o ligeramente arrugada. Posee una pulpa de excelente calidad y color amarillo verdoso, además de una semilla muy grande. Maduran en España a principios de invierno y en Israel en febrero-marzo (IBAR, 1986).

Una evaluación de la productividad y calidad de la fruta realizada por GREGORIOU y ECONOMIDES (1991) durante 12 años, ha determinado que este portainjerto confiere un mayor peso a la semilla y en algunos casos aumenta el contenido de aceite. La productividad acumulada no fue diferente entre Lula y otro portainjerto resistente a sales (West Indian). La resistencia a clorosis inducida por suelo limoso es menor en Lula que en West Indian,

coincidiendo con otros autores en esta característica.

### 2.2.2. Velvick.

De origen australiano, este portainjerto es un híbrido guatemalteco que sería resistente a salinidad y a Phytophthora. Dicha resistencia se transmitiría por semilla, por lo que se ha utilizado como portainjerto a través de sus hijos (YOUNG, 1992) y en forma clonal con el método de FROLICH y PLATT (1972).

Tiene un período juvenil corto, produciendo 200-300 frutos en el segundo y tercer año. Confiere características especiales a la variedad, modificando la época en que ocurren sus eventos fenológicos. YOUNG (1992) señala que puede retrasar la floración y madurez 2 a 3 meses con respecto al portainjerto Mexícola, en combinación con el cv. Hass, lo cual es positivo para la comercialización de la fruta. Para el cv. Fuerte, este portainjerto confiere una madurez más tardía y alarga el período de cosecha.

En Australia es una selección local, muy bien adaptada a las condiciones climáticas de la región sud-este (YOUNG, 1992).

FRANCIS (1992) señala que este portainjerto en California se comporta menos resistente a Phytophthora cinnamomi que bajo las condiciones de Australia, por lo que esta característica deberá ser registrada con mayor detalle.

### 2.3. Propagación clonal en palto:

La necesidad de una propagación clonal surge entre los viveristas hace más de 40 años al aparecer los primeros portainjertos resistentes a Phytophthora cinnamomi, en los cuales la característica de resistencia se mantenía sólo en un 25% de la progenie al utilizar reproducción sexual (BROKAW, 1987).

#### 2.3.1. Propagación por etiolación y acodo.

La técnica de propagación clonal mediante brotes etiolados, descrita por FROLICH y PLATT (1971), se utiliza a nivel comercial en los viveros de palto de Estados Unidos. Actualmente, existe una derivación del método, la cual ha sido patentada (BROKAW, 1987).

La metodología consiste básicamente en injertar el portainjerto resistente sobre patrón franco. Los brotes originados del portainjerto resistente, se etiolan y son forzados a enraizar con auxinas y un anillo metálico que estrangula la unión con el portainjerto de semilla. Al desarrollarse una parte aérea a partir del portainjerto clonal, éste es injertado con variedades comerciales. Entre las desventajas de este proceso se cuenta su elevado costo, porque supone un alto requerimiento de mano de obra especializada, infraestructura para la etiolación y un largo tiempo para producir una planta comercial (16 a 20 meses) (BROKAW, 1987).

GANDULFO (1983) determina la factibilidad de aplicar esta técnica en Chile,

al ensayar la propagación clonal del cultivar Mexícola. La mayor tasa de rizogénesis se lograría con anillado y aplicación de 3000 ppm de AIB, en los meses de abril y mayo.

### 2.3.2. Propagación por acodo aéreo.

Este método de propagación, denominado por sus autores como "franqueamiento", consiste en forzar la formación de raíces en la parte aérea mediante una lesión y auxinas (SALAZAR-GARCIA y BORYS, 1989).

Se realiza un corte a nivel de corteza, desde la zona proximal del cuello de la planta hacia la zona distal. Bajo la "lengüeta" que se forma, se introduce un trozo de madera de 10 x 10 x 1 mm, embebido en una solución de AIB 10.000 ppm y ANA 300 ppm; posteriormente se amarra para conservar la posición. El corte se cubre con tierra y se encierra con un tubo plástico. La formación de raíces permite obtener un portainjerto clonal, el cual será posteriormente injertado de forma tradicional. También se puede utilizar el método para obtener plantas autoenraizadas de la variedad comercial (SALAZAR-GARCIA y BORYS, 1989).

### 2.3.3. Propagación por estacas.

La propagación por estacas es una técnica que no ha podido ser aplicada a nivel comercial, debido a que los resultados de las investigaciones han sido erráticos, con éxito sólo en algunos cultivares. En Israel esta técnica se está

realizando en forma experimental en los viveros, con resultados cada vez más promisorios (BEN-JAACOV, 1994)<sup>1</sup>.

La formación de raíces en propagación por estacas es altamente dependiente de la retención de hojas. El rol de éstas estaría dado por el aporte de carbohidratos y reguladores del crecimiento para la rizogénesis (RAVIV y REUVENI, 1984), así como de promotores del crecimiento no identificados (RAVIV y REUVENI, 1984a).

CUTTING y VAN VUUREN (1988) desarrollaron un método de propagación por estacas que consiste en asperjar a las plantas madre con ácido giberélico, para inducir un vigor "juvenil" en el siguiente "flush" de crecimiento. Las aplicaciones de GA<sub>3</sub> producen un crecimiento vegetativo vigoroso y una menor dominancia apical. Al tratar con 0.2-0.3 % de AIB se logra un 80% de iniciación radical, después de 120-150 días bajo neblina artificial con calefacción basal.

#### 2.4. Micropropagación del palto:

Los intentos de multiplicar esta especie mediante cultivo de tejidos han buscado acortar el período de propagación y masificar la producción de plantas sobre portainjertos clonales (SOLORZANO, 1989). Sin embargo, se ha logrado un éxito limitado en los ensayos, debido a que esta especie se

---

<sup>1</sup> BEN-JAACOV, B. B.S. Agric., M.S., Ph.D. 1994. Volcani Agricultural Center. Israel. Profesor Visitante, Universidad Católica de Valparaíso. Facultad de Agronomía. Comunicación personal.

comporta como recalcitrante en el cultivo in vitro (DALSASO y GUEVARA, 1989).

#### 2.4.1. Selección del explante.

KESTER (1978) señala que la selección de tejidos juveniles es importante para la organogénesis in vitro de las plantas leñosas. Este principio básico también es aplicable en palto, ya que un tejido obtenido de una planta adulta no regenera; sin embargo un tejido juvenil puede originar brotes y raíces (PLIEGO-ALFARO, ENCINA y BARCELO-MUÑOZ, 1987). No obstante, la selección ontogénica del explante no parece tan estricta, eso es, al menos, lo que demuestra el trabajo de DALSASO y GUEVARA (1989), el cual ha reportado respuestas regenerativas en tejidos adultos de palto.

Utilizando microinjertación in vitro, se ha podido revertir a la fase juvenil a tejidos adultos, posibilitando la organogénesis al sub-cultivar los brotes del injerto (PLIEGO-ALFARO y MURASHIGE, 1987). Este efecto de rejuvenecimiento se ha observado también in vivo, al realizar cinco injertaciones sucesivas. Este tejido revertido se podría utilizar para aumentar la eficiencia de métodos de propagación clonal (WHITSELL et al., 1989). Otra forma es utilizar plantas injertadas en el primer año de crecimiento (PLIEGO-ALFARO, ENCINA y BARCELO-MUÑOZ, 1987).

Otros autores han utilizado plántulas de semilla como plantas madre, con lo cual se pierden las características descritas para un portainjerto, debido a la

variabilidad genética que implica una reproducción sexual. Sin embargo, desde un punto de vista biológico, se ha logrado organogénesis al utilizar estos tejidos juveniles (SCHROEDER, 1980; GONZALEZ y SALAZAR, 1984; NEL y KOTZÉ, 1982).

Para obtener un tejido juvenil o en transición y conservar clonalmente una selección, es posible realizar una poda severa y tomar explantes de crecimientos de la temporada de alto vigor. Estos manejos no implican necesariamente que el tejido esté en una fase juvenil, pero sí deben presentar una alta actividad metabólica (KESTER, 1978).

DALSASO y GUEVARA (1989), al analizar la regeneración de explantes en diferentes fases del ciclo fenológico de las plantas madres, señalan que no existen mayores diferencias entre las fases, con excepción de la floración, porque los ápices están diferenciados a estructuras reproductivas.

Diversos autores han reportado que las respuestas organogénicas del palto en cultivo in vitro se puede mejorar al utilizar explantes de tejido etiolado (SCHROEDER, 1980, SOLORZANO, 1989), sobre la base de relaciones hormonales favorables a las auxinas. Sin embargo, GONZALEZ y SALAZAR (1984) señalan que el uso de tejidos etiolados es detrimental para la rizogénesis.

#### 2.4.2. Tratamientos de desinfección.

El uso de técnicas tradicionales de desinfección, con etanol e hipoclorito de sodio, produce pardeamiento y necrosis de tejidos en plantas leñosas (KURTZ y TOLLEY, 1990). Debido a esto se han desarrollado estrategias de desinfección con antibióticos y fungicidas (DALSASO y GUEVARA, 1989), requiriendo en algunos casos aplicaciones periódicas de antibióticos a la planta madre. Existen estudios del uso de antibióticos durante el desarrollo del cultivo (YOUNG, 1984) y también para desinfectar el material de campo previo a la inoculación (JORDAN y OYANEDEL, 1992).

El uso de detergentes permite reducir la contaminación (KURTZ y TOLLEY, 1990), mejorándose el efecto de desinfectantes como cloruro mercurico (DALSASO y GUEVARA, 1989) e hipoclorito de calcio (GONZALEZ y SALAZAR, 1984) al reducir la tensión superficial en la solución desinfectante.

#### 2.4.3. Pardeamiento y antioxidantes.

El pardeamiento de los órganos y tejidos cultivados *in vitro* se debe a la acción de la enzima polifenol oxidasa. Se trata de una enzima plastídica que cataliza la oxidación de *o*-difenoles a *o*-quinonas, así como la *o*-hidroxilación de monofenoles (VAUGHN y DUKE, 1984).

La funcionalidad de esta enzima no está clara aún. Sólo se sabe que sale del plastidio en la senescencia o frente a daño (VAUGHN y DUKE, 1984).

Entonces, queda en contacto con su sustrato fenólico contenido en la vacuola de la célula, produciendo quinonas que entran en la vía de los melanoides, originando pardeamiento y posterior necrosis de los tejidos (MAYER, 1987). El hecho de que participe en las etapas previas a la necrosis de los tejidos ha permitido relacionar esta enzima con los mecanismos de defensa de las plantas (VAUGHN *et al.*, 1988). El rol en defensa de esta enzima estaría en la compartimentalización de los tejidos atacados (MAYER, 1987).

VAUGHN *et al.* (1988) reportan que la PPO podría estar relacionada con una fotofosforilación no-cíclica en el fotosistema I, catalizando la reacción de Mehler y consumiendo el exceso de oxígeno. De todos modos es una función vital para la planta, pues cuando esta enzima se pierde completamente, la planta muere.

Existen varios sistemas de control físico y químico del pardeamiento enzimático, como por ejemplo:

- a. Descender la temperatura durante las fases de selección y desinfección, con lo cual se reduce la actividad de la enzima.
- b. Reducir al mínimo la iluminación (GEORGE y SHERRINGTON, 1984), puesto que la luz estimula la síntesis de la enzima PAL, la cual es clave en el metabolismo fenólico de la planta (DURZAN *et al.*, 1984).
- c. Preferir explantes de tejido juvenil (DURZAN *et al.*, 1984).
- d. Utilizar antioxidantes en pre-siembra, desinfección y en el medio de cultivo, como ácido ascórbico, ácido cítrico, cisteína, polivinilpirrolidona, DIECA y carbón activado.

En el caso del palto, se ha reportado que el pardeamiento se controla sin problemas al utilizar carbón activado en dosis de 1000 mg/l (MOONEY y VAN STADEN, 1987; PLIEGO-ALFARO, 1988). DALASO y GUEVARA (1989) utilizan PVP como antioxidante, señalando que su acción es positiva para el control del pardeamiento, pero podría estar reduciendo las cantidades disponibles de citoquininas por un efecto de adsorción.

SOLORZANO (1989) señala que al tratar previamente con una solución de metasulfato de potasio 5% se reduce a cero la oxidación (pardeamiento), debido al fuerte poder reductor de este compuesto químico, sin requerir de antioxidantes durante el cultivo.

En otras especies leñosas se ha utilizado un recambio del medio de cultivo, de manera que los inhibidores fenólicos que quedan en el medio no estén en contacto con el explante (GEORGE y SHERRINGTON, 1984).

#### 2.4.4. Medios de cultivo.

Los medios de cultivo utilizados en palto se basan en la solución mineral descrita por MURASHIGE y SKOOG (1962), la cual se ha utilizado reduciendo los macronutrientes a la mitad o un tercio (PLIEGO-ALFARO, 1988).

DALASO y GUEVARA (1989) señalan que un medio con menor contenido de amonio puede ser el adecuado para paltos, por lo cual utilizan el medio

N45K, que contiene menos nitrógeno y más potasio (MARGARA, 1988).

PLIEGO-ALFARO, ENCINA y BARCELO-MUÑOZ (1987) describen la técnica de medios de doble fase, utilizando un medio gelificado con agar más una delgada capa de medio líquido, con 0.65 y 0.1 mg/l de BA, respectivamente. Este método permitiría reducir la necrosis apical, pero favorece la vitrificación. Los medios en doble fase se han utilizado también en peral (RODRIGUEZ et al., 1991).

Se ha reportado también medios de dos fases gelificadas, en donde sólo la mitad superior contiene sacarosa (SOLORZANO, 1989).

Los gelificantes utilizados en palto son Gelrite (SOLORZANO, 1989; DALSAO y GUEVARA, 1989) y agar (PLIEGO-ALFARO, 1988). También se han utilizado medios líquidos con puente de papel en esta especie y en Persea indica (NEL y KOTZÉ, 1982).

#### 2.4.5. Organogénesis in vitro.

##### 2.4.5.1. Emisión de brotes.

En el cultivo de secciones nodales en un medio N45K con 0.3 mg/l de BA, PLIEGO-ALFARO, ENCINA y BARCELO-MUÑOZ (1987) obtuvieron formación de brotes a partir de yemas laterales del crecimiento principal. Dosis mayores de BA favorecieron la vitrificación y la necrosis apical.

DALSASO y GUEVARA (1989) señalan que las secciones nodales y ápices caulinares, cultivados en medio N45K con 2.0 mg/l de BA y 0.5 de AIB, forman una roseta con callo. A partir de la cual crecen brotes. En estos ensayos el GA<sub>3</sub> fue detrimental para el desarrollo. Otra respuesta muy positiva al cultivo in vitro de palto fue reportada por SOLORZANO (1989), quien logró la emisión de hasta 4 brotes por explante al cultivar yemas de brotes etiolados en un medio MS con BA 2 mg/l y GA<sub>3</sub> 2 mg/l.

NEL y KOTZÉ (1982) describen un método de proliferación sobre la base del uso del brote principal que se obtiene en el establecimiento. Cuando éste llega a una altura de 5-6 cm, se cortan secciones de un nudo, las cuales se pueden llevar a un medio de enraizamiento o nuevamente a uno de elongación de brotes.

#### 2.4.5.2. Rizogénesis.

Utilizando porciones apicales de tallo juvenil y "rejuvenecido", PLIEGO-ALFARO (1988) y PLIEGO-ALFARO y MURASHIGE (1987), consiguieron un enraizamiento eficiente (>90%) mediante una inducción en medio MS con 25 mg/l de AIB por 3 días, para posteriormente subcultivar en medio MS reducido a 1/3, sin hormonas por 8 semanas.

El rol de las auxinas exógenas en la formación de raíces sería a través del incremento de los niveles endógenos de ácido indol acético en el tejido (GARCIA-GOMEZ et al., 1994). Concentraciones de AIB entre 1 y 10 mg/l

permiten tasas de enraizamiento entre 35 y 40%, con raíces originadas desde el cambium.

En el cultivo de secciones nodales en un medio MS, GONZALEZ y SALAZAR (1984), obtienen el desarrollo de la yema del nudo y un posterior enraizamiento en dosis altas de AIB (7.5-10 mg/l).

SKENE y BARLASS (1983) señalan que al cultivar brotes juveniles de palto en un medio White con AIB 1 mg/l se obtiene más de un 50% de enraizamiento. En este ensayo, la aplicación de NaOH 1 N a la base del tallo en pre-cultivo no tuvo el efecto esperado de mejorar la tasa de enraizamiento.

#### 2.4.6 Cultivo de embriones.

En el cultivo de embriones de Persea americana se ha conseguido el desarrollo de plantas completas (SKENE y BARLASS, 1983) y la formación de embriones somáticos (MOONEY y VAN STADEN, 1987; PLIEGO-ALFARO y MURASHIGE, 1988).

SKENE y BARLASS (1983) plantean que la aplicación de esta técnica permitiría propagar germoplasma en programas de mejoramiento genético, ya que es posible regenerar plantas aún desde embriones inmaduros en frutos abscionados prematuramente.

Otra aplicación del cultivo de embriones es la obtención de patrones para

microinjertación in vitro (PLIEGO-ALFARO y MURASHIGE, 1987).

#### 2.4.7. Aclimatación de plántulas.

Las plantas micropropagadas de palto presentan una tasa de crecimiento muy lenta, lo cual podría deberse a la ausencia de micorrizas (VIDAL et al., 1992). Al inocular las plántulas con el hongo Glomus fasciculatum, se mejora la formación de un sistema radical bien desarrollado, el cual se origina del sistema micorrhítico. Además, se aumenta el crecimiento de los brotes y se incrementan los niveles endógenos de nitrógeno, fósforo y potasio.

También es posible inocular a las plántulas ex vitro con G. mosseae junto con G. desertícola, en una mezcla de suelo con arena, lo que permite una alta sobrevivencia y un rápido crecimiento en contenedores (AZCÓN-AGUILAR et al., 1992).

### 3. MATERIAL Y MÉTODO

Los ensayos fueron realizados en el Laboratorio de Micropropagación de la Facultad de Agronomía, Universidad Católica de Valparaíso, entre enero y diciembre de 1994.

El material vegetal utilizado fue obtenido en una colección de germoplasma de la empresa Agrícola Huerto California Ltda., ubicado en el sector San Isidro, Comuna de Quillota, V Región de Valparaíso.

Fueron utilizadas púas provenientes de distintos flushes de crecimiento vegetativo, de los cultivares Lula y Velvick. Los árboles del cv. Lula eran de siete años de edad, en estado adulto, con presencia de fruta en sus ramas. En el cv. Velvick se utilizaron árboles de cuatro años de edad, que presentaron su primera floración al año tres, es decir, en estado de transición. Los árboles de ambos cultivares están injertados sobre patrón franco, de hijos del cv. Mexícola.

Se seleccionaron púas de 5-8 cm de largo, de vigor equivalente, a 1.5 m desde el suelo y en forma aleatoria de las cuatro caras del árbol. Estas púas se cortaron con una tijera de podar desinfectada con hipoclorito de sodio 1%, defoliándolas y sumergiéndolas en una solución de ácido ascórbico 500 mg/l

más ácido cítrico 500 mg/l, con hielo 50% v/v hasta el momento de sembrar, conservando el material en una caja de plumavit de 5 l. La temperatura en la caja se mantuvo entre 0 y 2°C.

Los medios de cultivo se prepararon mediante soluciones madre, de acuerdo a la técnica descrita por PIERIK (1987). Se utilizó agua bi-destilada para elaborar estas soluciones, así como en la dilución para formar los medios de cultivo.

La formulación mineral de los medios de cultivo fue la descrita por MURASHIGE y SKOOG (1962). En algunos ensayos también se utilizó el medio WPM (LLOYD y McCOWN, 1981).

Las sales minerales y compuestos orgánicos fueron pesados en una balanza "Sartorius", con una precisión de  $\pm 0.1$  mg. En la medición de líquidos se utilizaron pipetas graduadas, matraces de aforo y matraces Erlenmeyer.

El pH de los medios de cultivo se ajustó a 5.7, con alícuotas de ácido clorhídrico 0.1 N o hidróxido de potasio 0.1 N.

Se emplearon tubos de vidrio de 60 ml, disponiendo 10 ml de medio por unidad y cubriéndolos con un cuadrado de aluminio laminado de 25 cm<sup>2</sup>.

La esterilización se realizó en un autoclave de control manual, a 121°C y 1.1 bar de presión por 15 minutos.

La inoculación se realizó en una cámara de flujo laminar, con aire filtrado a 0.2 micras, disponiendo 1 explante por tubo.

Una vez inoculados, los tubos fueron mantenidos en oscuridad por diferentes períodos de tiempo, para posteriormente ser almacenados en una cámara de crecimiento a  $25\pm 5$  °C, con tubos de luz fluorescente (luz blanca fría), con una intensidad lumínica de 3500 lux. El fotoperíodo fue de 16 h luz/ 8 oscuridad.

Ensayo 1: Evaluación de cuatro protocolos de desinfección para el establecimiento de Persea americana en un medio aséptico.

El material vegetal del cv. Velvick utilizado, consistió en brotes apicales y laterales de más de 5 yemas, en crecimiento activo, del "flush" vegetativo de verano (Figura 1). En el cv. Lula se seleccionó brotes del crecimiento de primavera, con su yema apical inactiva, como el material utilizado para injertación (Figura 2).

Se utilizó un medio MS con macroelementos reducidos a la mitad, gelificado con gelrite 0.2% y agar-agar 0.2%, 100 mg/l de inositol, 1000 mg/l de PVP insoluble, 100 mg/l de CA y 3% de sacarosa (sin vitaminas).

Los tratamientos fueron los siguientes:

T0: (Control) agua destilada estéril, tween 0.1 ml/l

T1: etanol 95% por 5 segundos; hipoclorito de sodio 0.5% + tween 0.1 ml/l por 10 minutos (DALSASO y GUEVARA, 1989).

T2: etanol 95% por 5 segundos; hipoclorito de sodio 0.25% + tween 0.1 ml/l por 10 minutos.

T3: mancozeb 80% WP 2.4 gr/l + captan 80% WP 0.75 gr/l + fenaminosulf 70% WP + amoxicilina 1875 mg/l + agrimicina 3 gr/l + ácido ascórbico 500 mg/l + tween 0.1 ml/l por 2 horas (JORDAN y OYANEDEL, 1992).

T4: sulfato ferroso 4% p/v + captan 0.4% p/v + ácido ascórbico 500 mg/l + tween 20 0.1 ml/l por 2 minutos (RODRIGUEZ et al., 1991).

Una vez completado el tiempo de desinfección de cada tratamiento, los explantes fueron enjuagados 5 veces con agua destilada estéril y 3 veces con solución estéril de ácido ascórbico 500 mg/l más ácido cítrico 500 mg/l, de acuerdo a lo señalado por JORDAN y OYANEDEL (1992). Posteriormente se cortaron yemas axilares de 2-4 mm, bajo la solución de antioxidantes, sembrando inmediatamente. El tipo de explante utilizado se presenta en la Figura 3.

Para cada cultivar se utilizaron 20 réplicas por tratamiento. Los tubos fueron mantenidos en obscuridad por siete días, luz indirecta por 14 días e iluminación total desde el día 21.



FIGURA 1. Brote en activo crecimiento, del "flush" vegetativo de verano, utilizado como fuente de explantes en el cv. Velvick.

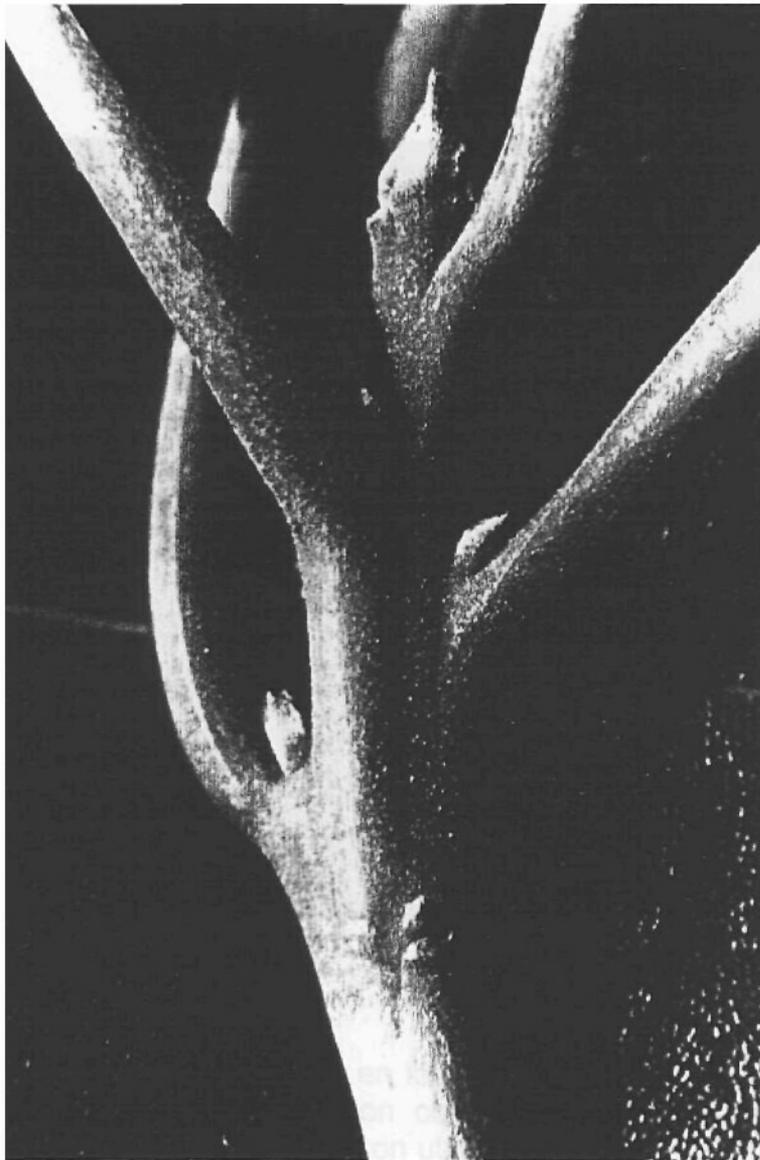


FIGURA 2. Brote terminal del "flush" vegetativo de primavera, utilizado como fuente de explantes en el cv. Lula.



FIGURA 3. Tipo de explante utilizado en los cvs. Velvick y Lula. Las yemas axilares se seccionaron con corte en doble bisel. Los ápices caulinares (derecha) no fueron utilizados.

Se evaluó la tasa de contaminación a los 7, 14 y 21 días de cultivo. La contaminación final se contrastó mediante el Test de Comparación de Proporciones con un  $P=0.05$ .

A los 60 días de cultivo se midió la cantidad de tubos en que se presentó brotación, por elongación de la yema pre-formada, calculando una tasa de brotación sobre la base del total de tubos inoculados en cada tratamiento.

Una vez evaluada la brotación, se procedió a incorporar a cada tubo una fase líquida, con un medio MS reducido a la mitad en sus macronutrientes, más 0.1 mg/l de BA, 100 mg/l de inositol, 0.4 mg/l de tiamina y 30 gr de sacarosa (PLIEGO-ALFARO, ENCINA y BARCELO-MUÑOZ, 1987). Esta segunda fase se incorporó en la mitad de los tubos que no presentaron contaminación, a razón de 1.5 ml por tubo, distribuyendo al azar las unidades experimentales de los distintos tratamientos.

Ensayo 2: Efecto de cinco combinaciones de reguladores del crecimiento sobre la organogénesis de los cultivares Lula y Velvick in vitro.

El material vegetal utilizado presentaba las mismas fenofases que en el Ensayo 1. La desinfección se hizo con el Tratamiento 1 del Ensayo 1. Después de los enjuagues de la solución desinfectante, se cortaron yemas axilares bajo una solución estéril de meta-bisulfito de sodio al 5%, dejando los explantes en ácido ascórbico 500 mg/l y ácido cítrico 500 mg/l. Las soluciones y sus recipientes fueron renovados cada 10 explantes, para disminuir el riesgo de contaminación.

Se utilizó un medio MS (MURASHIGE y SKOOG, 1962) con macronutrientes reducidos a la mitad, suplementado con hidrolizado de caseína 200 mg/l, glutamina 80 mg/l, PVP insoluble 500 mg/l, CA 500 mg/l, tiamina 0.4 mg/l y sacarosa 3%. Como gelificante se usó gelrite 0.1% además de agar agar 0.1%, formando un gel ligero.

Los tratamientos fueron los siguientes:

T0: Control

T1: BA 2.0 mg/L + AIB 0.5 mg/L (DALSASO y GUEVARA, 1989)

T2: BA 0.65 mg/L (PLIEGO-ALFARO et al., 1987)

T3: BA 2.0 mg/L + GA<sub>3</sub> 2 mg/L (SOLORZANO, 1989)

T4: CPPU 0.1 mg/L

T5: CPPU 0.01 mg/L fueron utilizadas 25 réplicas por tratamiento, inoculando al azar los tubos de los diferentes tratamientos.

Los tubos fueron mantenidos en oscuridad por 14 días, luz indirecta por 7 días e iluminación total a partir del día 21. El experimento se diseñó con un modelo DCA (diseño completamente al azar).

A los 90 días de cultivo se evaluó el número de brotes por explante, y la tasa de brotación. El porcentaje de brotación entre tratamientos se contrastó con el Test de Comparación de Proporciones ( $P=0.05$ ).

**Ensayo 3: Efecto de cuatro antioxidantes sobre el pardeamiento de yemas axilares de los cvs. Velvick y Lula**

Se utilizó material en crecimiento activo de ambos cultivares, del "flush" vegetativo de verano, seleccionando brotes apicales y laterales de más de 5 yemas. Las púas se manejaron igual que en el Ensayo 1.

La desinfección se hizo con el Tratamiento 1 del Ensayo 1. Las yemas axilares (2-4 mm) se cortaron bajo una solución estéril de ácido ascórbico 500 mg/l, ácido cítrico 500 mg/l y sacarosa 1.5%. Posteriormente se mantuvieron en otra solución sólo con los ácidos. Las soluciones y sus recipientes se renovaron cada 10 explantes, para disminuir el riesgo de contaminación.

El medio de cultivo fue MS con los macronutrientes reducidos a la mitad, con tiamina 0.4 mg/l, inositol 100 mg/l, hidrolizado de caseína 500 mg/l, 200 mg/l de glutamina, BA 1.0 mg/l, 0.15% agar y 0.15% de gelrite, y 3% de sacarosa.

Los tratamientos fueron los siguientes:

0: Control A: PVP 1000 mg/l

B: CA 1000 mg/l

C: DIECA 15 mg/l

D: Acido ascórbico 60 mg/l

E: Acido ascórbico 60 mg/l y ácido cítrico 30 mg/l

En cada tratamiento se emplearon 20 réplicas por variedad.

Los tubos fueron mantenidos en obscuridad por 14 días, luz indirecta por siete días e iluminación total a partir del día 21.

El experimento se diseñó con un modelo DCA (diseño completamente al azar).

A los 60 días de cultivo, se evaluó la necrosis y el grado de pardeamiento, utilizando la Escala Relativa de Pardeamiento (ERP) descrita por ZIV y HALEVY (1983), la cual asigna un número a cada estado del explante:

- 1: Tejido con pardeamiento en la zona de corte.
- 2: Tejido con pardeamiento en zona de corte y necrosis apical
- 3: Necrosis total del explante.

Los valores de ERP se compararon con el Test no paramétrico de Kruskal-Wallis (CHOU, 1985), y se determinó un valor promedio de ERP para cada tratamiento.

Además, se evaluó la formación de brotes, calculando un porcentaje de brotación tomando en consideración el total de tubos inoculados.

A las 12 semanas de cultivo, se repicaron los brotes obtenidos a un medio WPM, con ácido ascórbico 60 mg/l y PVPP 1000 mg/l. Los brotes se seccionaron a un nudo, bajo una solución estéril de ácido ascórbico 500 mg/l y ácido cítrico 500 mg/l. Después del repique se utilizó el tratamiento de iluminación progresiva antes descrito.

En un conductímetro "Schot-Gerade" se midió la conductividad eléctrica en mmhos/cm, a un medio de cultivo WPM y a uno MS con los macronutrientes reducidos a la mitad, ambos sin reguladores del crecimiento, azúcar, ni suplementos orgánicos.

Fueron medidos los niveles de zinc, manganeso, fierro y cobre en un Espectrofotómetro de Absorción Atómica, con la metodología descrita por GONZALEZ et al. (1975), a los siguientes tubos:

- Medio de cultivo fresco (no inoculado)
- Medio de cultivo desgastado, después de subcultivar brotes a los 60 días desde la inoculación.
- Medio de cultivo en el cual se produjo necrosis y muerte de los tejidos, a los 60 días después de la inoculación.

**Ensayo 4: Cultivo de secciones nodales en los cvs. Velvick y Lula.**

Se diseñó este ensayo porque la literatura indica que una sección nodal es el mejor explante, y porque en los Ensayos 1 al 3 se observó una alta tasa de necrosis apical al cultivar yemas laterales, fenómeno que no se produciría al utilizar como explante secciones nodales (PLIEGO-ALFARO, ENCINA y BARCELO-MUÑOZ, 1987).

El material vegetal utilizado consistió en púas en activo crecimiento de ambos cultivares, del "flush" vegetativo de verano.

La desinfección se realizó con el Tratamiento 1 del Ensayo 1, manejando las púas con igual tratamiento de antioxidantes en pre-siembra que en el Ensayo 1.

Se utilizó el medio WPM, con tiamina 0.4 mg/l, inositol 100 mg/l, hidrolizado de caseína 500 mg/l, 200 mg/l de glutamina, PVP insoluble (Polyclar AT, Serva) 1500 mg/l, 0.15% agar y 0.15% de gelrite y 3% de sacarosa.

Los tratamientos fueron los siguientes:

C: Control

N: BA 2.0 mg/l + IBA 0.5 mg/l.

Se utilizó 50 réplicas por tratamiento. Los tubos fueron mantenidos en obscuridad por 14 días, luz indirecta por siete días e iluminación total a partir del día 21. El experimento no fue evaluado, ya que se presentó una necrosis total de los explantes a los 15 días de cultivo.

**Ensayo 5: Efecto del medio sólido y líquido sobre la organogénesis de yemas axilares cultivadas in vitro.**

Se seleccionó púas del cv. Velvick del término del crecimiento de verano (sin puntas rojas). En el cv. Lula se utilizó material en activo crecimiento (puntas rojas).

La desinfección se realizó con el Tratamiento 1 del Ensayo 1, manejando las púas con igual tratamiento de antioxidantes en pre-siembra que en el Ensayo 1.

Se utilizó un medio WPM con los compuestos orgánicos descritos por NEL y KOTZÉ (1982): adenina 80 mg/l, ácido ascórbico 25 mg/l, glicina 2 mg/l, piridoxina 1 mg/l, ácido nicotínico 1 mg/l, GA<sub>3</sub> 0.5 mg/l, BA 2 mg/l, inositol 100 mg/l y sacarosa 30.000 mg/l.

Los tratamientos fueron los siguientes:

L: Medio líquido con puente de papel

S: Medio gelificado con gelrite 0.2% y agar 0.2%

Se emplearon 25 réplicas por tratamiento, para cada cultivar. Los tubos fueron mantenidos en oscuridad por 21 días. Al día 22 se trasladaron a la cámara de crecimiento con iluminación máxima.

El experimento se diseñó con un modelo DCA (diseño completamente al azar).

Se evaluó la tasa de brotación, el número de brotes por explante y el largo promedio de los brotes.

A las 14 semanas de cultivo se repicó los brotes a el mismo medio de cultivo, modificado por gelrite 0.2%, agar 0.2 % y PVPP 1000 mg/l. Después del repique, se utilizó el tratamiento de iluminación progresiva descrito en el Ensayo 3.

Ensayo 6: Efecto de dos difenilureas y benciladenina sobre la formación de brotes a partir de yemas axilares.

Se seleccionaron brotes en activo crecimiento del "flush" vegetativo de primavera, en ambos cultivares. Los árboles del cv. Lula fueron tratados con Paclobutrazol, en dosis de 0.65 gr/m<sup>2</sup> de copa, 7 días antes de la inoculación, en estado de plena flor.

La desinfección se realizó con el Tratamiento 1 del Ensayo 1, pero utilizando una solución estéril de ácido ascórbico 500 mg/l y ácido cítrico 500 mg/l para diluir el hipoclorito de sodio al 0.5%.

Al momento de inocular, el explante fue tomado con una pinza estéril y desplazado por las paredes internas del tubo, de modo tal de eliminar el exceso de solución antioxidante que queda en contacto con éste, por efecto de la alta tensión superficial.

Se utilizó un medio WPM con los compuestos orgánicos descritos por NEL y KOTZÉ (1982): adenina 80 mg/l, ácido ascórbico 25 mg/l, glicina 2 mg/l, piridoxina 1 mg/l, ácido nicotínico 1 mg/l, tiamina 0.4 mg/l, inositol 100 mg/l y sacarosa 30 gr/l. Además se utilizó como antioxidante PVP-360 500 mg/l junto con PVP 6755 500 mg/l.

Para el cv. Lula los tratamientos fueron los siguientes:

T0: Control

T1: BA 0.65 mg/l

T2: CPPU 0.1 mg/l

T3: CPPU 0.5 mg/l

T4: TDZ 0.1 mg/l

T5: TDZ 0.01 mg/l

Los tratamientos para el cv. Lula se diseñaron considerando los resultados del Ensayo 2. El Tratamiento 1 (T1) se utilizó porque se obtuvo previamente el máximo porcentaje de brotación. Se utilizó el T2 porque antes el CPPU permitió el mayor número de brotes por explante.

Los tratamientos para el cv. Velvick fueron los siguientes:

T0: Control

T1: BA 2 mg/l + IBA 0.5 mg/l

T2: CPPU 0.1 mg/l

T3: CPPU 0.5 mg/l

T4: TDZ 0.1 mg/l

T5: TDZ 0.01 mg/l

T6: BA 2 mg/l

Se utilizó el T1 para este cultivar, porque esta combinación de reguladores permitió el mayor crecimiento promedio de brotes en el Ensayo 2. Para aislar el efecto de la citoquinina del efecto de la auxina, se incorporó en el ensayo el T6. El T2 corresponde al que permitió el mayor número promedio de brotes en el Ensayo 2.

En cada tratamiento fueron ocupadas 25 réplicas, para ambos cultivares.

Una vez inoculados, los tubos fueron sometidos al tratamiento de iluminación progresiva descrito en el Ensayo 3. El experimento se diseñó con un modelo DCA (diseño completamente al azar).

A los 21 días de cultivo se evaluó la tasa de necrosis y el porcentaje de brotación. Los resultados fueron contrastados mediante el Test de Comparación de Proporciones, con  $P=0.05$ .

#### 4. PRESENTACION Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Ensayo 1: Evaluación de cuatro protocolos de desinfección para el establecimiento de Persea americana en un medio aséptico.

Al analizar las tasas de contaminación en el cv. Velvick, es posible establecer que, bajo las condiciones experimentales descritas, existe una diferencia estadística entre los tratamientos (Cuadro 1). La menor tasa de contaminación se observó en el tratamiento con hipoclorito de sodio 0.25%, no existiendo diferencias significativas entre el tratamiento combinado de fungicidas y antibióticos, y las dos dosis de hipoclorito de sodio.

Desde una punto de vista práctico, el tratamiento con hipoclorito de sodio es el más rápido y sencillo, por lo cual se aplicó en los ensayos posteriores, con dosis de 0.5%. Además, al considerar la formación de brotes en los distintos tratamientos (Cuadro 3), el mejor resultado se obtuvo con esta concentración de hipoclorito de sodio.

En el cv. Lula también se advirtieron diferencias significativas entre los tratamientos (Cuadro 2). La menor tasa de contaminación se observó en los Tratamientos 1 y 2, ambos con 10% de pérdida.

En los tubos en que se encontró contaminación, los microorganismos más frecuentes fueron hongos. Sin embargo, en el Tratamiento 4 hubo sólo desarrollo de bacterias, lo que hace suponer que el sulfato ferroso no tuvo la actividad bactericida que reporta RODRIGUEZ et al. (1991).

CUADRO 1. Efecto de 4 soluciones desinfectantes sobre la tasa de contaminación de yemas axilares de palto cv. Velvick, cultivadas in vitro, después de 21 días desde la inoculación.

Tratamiento	Tasa de contaminación (%)
T0 Control	100 a
T1 Hipoclorito de sodio 0.5 %	15 c
T2 Hipoclorito de sodio 0.25%	0 c
T3 Fungicidas + antibióticos	10 c
T4 Sulfato ferroso + Captan	55 b

Letras iguales indican que no existe diferencia estadísticamente significativa entre tratamientos, según Test de Comparación de Proporciones (P=0.05)

**CUADRO 2.** Efecto de cuatro soluciones desinfectantes sobre la tasa de contaminación de yemas axilares de palto cv. Lula cultivadas in vitro, después de 21 días desde la inoculación.

Tratamiento	Tasa de contaminación (%)
T0 Control	100 a
T1 Hipoclorito de sodio 0.5 %	10 d
T2 Hipoclorito de sodio 0.25%	10 d
T3 Fungicidas + antibióticos	45 c
T4 Sulfato ferroso + Captan	80 b

Letras iguales indican que no existe diferencia estadísticamente significativa entre tratamientos, según Test de Comparación de Proporciones ( $P=0.05$ )

Diversos autores reportan pardeamiento y necrosis de explantes, inducidos por el hipoclorito de sodio (DALSASO y GUEVARA, 1989; RODRIGUEZ *et al.*, 1991; JORDAN y OYANEDEL, 1992). Sin embargo, en este ensayo la necrosis de los tejidos fue mínima, observándose sólo pardeamiento en las zonas de corte. Esto puede haberse producido por una respuesta efectiva a la solución de antioxidantes que se utilizó en pre-siembra.

También puede explicarse la baja tasa de necrosis por el uso de bajas temperaturas, lo cual disminuye el metabolismo general de las células, reduciendo la velocidad de muchas reacciones enzimáticas como la producida por la polifenol oxidasa.

Del mismo modo, puede haber tenido efecto sobre la reducción del pardeamiento el hecho de iluminar progresivamente a los explantes, lo cual ha sido efectivo en otras especies leñosas, como Phalaenopsis (GEORGE y SHERRINGTON, 1984) y el portainjerto de peral BP10030 (WANG, 1992).

La incorporación de una segunda fase de medio de cultivo líquido no tuvo efecto sobre la tasa de proliferación, ni sobre la necrosis apical de los explantes. El Cuadro 3 muestra el estado en que se encontraban los explantes antes de la incorporación de esta segunda fase, para el cv. Velvick. PLIEGO-ALFARO, ENCINA y BARCELO-MUÑOZ (1987) describen un incremento en la tasa de proliferación al utilizar el medio de doble fase, así como una reducción del desorden fisiológico de necrosis apical. En peral, el uso de medios de doble fase permite reducir la vitrificación y aumentar la formación de brotes (RODRIGUEZ et al., 1991).

Posiblemente no se observó un efecto de la segunda fase porque el sellado de los tubos no fue perfecto, observándose deshidratación de la capa líquida en un período menor a siete días. La respuesta del explante a la condición física del medio requiere de mayor tiempo de acción, más aún al tratarse de una especie leñosa.

**CUADRO 3. Efecto de la solución desinfectante sobre la formación de brotes a partir de yemas axilares de palto cv. Velvick, después de 90 días de cultivo.**

Tratamiento	Tasa de brotación (%)	Número promedio de brotes por explante
T0 Control	*	*
T1 Hipoclorito de sodio 0.5 %	25	1.0
T2 Hipoclorito de sodio 0.25%	15	1.7
T3 Fungicidas + antibióticos	*	*
T4 Sulfato ferroso + Captan	*	*

\*: indica sin respuesta.

En el cv. Lula tampoco hubo efecto de la incorporación de la segunda fase. El Cuadro 4 muestra el estado de los explantes antes de incorporar ésta. La formación de brotes fue mayor en los tratamientos con hipoclorito de sodio, pero no hubo diferencias estadísticamente significativas para esta variable, ni para el número promedio de brotes por explante. En los ensayos posteriores se utilizó el T1, porque permitió un buen control de los contaminantes externos.

En algunos explantes se observó desarrollo de callo, lo cual sólo podría explicarse por la síntesis autónoma de hormonas vegetales, ya que en los casos en que se presentó el medio de cultivo no contenía reguladores del

crecimiento (Figura 4). En la mayoría de las especies vegetales, la formación de callo se obtiene al incorporar en el medio de cultivo auxinas y citoquininas, en una relación de concentraciones de 1:1 entre ambos reguladores (HARTMANN, KESTER y DAVIES, 1990; GEORGE y SHERRINGTON, 1984).

**CUADRO 4.** Efecto de la solución desinfectante sobre la formación de brotes a partir de yemas axilares de palto cv. Lula, después de 90 días de cultivo.

Tratamiento	Tasa de brotación (%)	Número promedio de brotes por explante
T0 Control	*	*
T1 Hipoclorito de sodio 0.5 %	25	2.0
T2 Hipoclorito de sodio 0.25%	25	1.0
T3 Fungicidas + antibióticos	15	1.7
T4 Sulfato ferroso + Captan	*	*

\*: indica sin respuesta

TAIZ y ZEIGER (1991) señalan que el vegetal puede responder a una lesión con síntesis de citoquininas. Ello podría explicar el hecho de que se obtuvo formación de brotes en este ensayo, ya que las citoquininas estimulan iniciación y el desarrollo de puntos de crecimiento. La lesión en este caso

corresponde al corte realizado para separar el explante de la planta madre. La respuesta morfogénica se caracterizó por formación de 1 a 3 brotes axilares a partir de puntos de crecimiento pre-formados, y brotes adventicios únicos a partir de callos (Cuadros 3 y 4).



FIGURA 4. Formación de callo y un brote a partir de yemas axilares del cv. Lula cultivadas in vitro, en medio 1/2 MS sin reguladores del crecimiento, a los 90 días de cultivo.

**Ensayo 2:** Efecto de cinco combinaciones de reguladores del crecimiento sobre la organogénesis in vitro de yemas axilares de palto, cvs. Lula y Velvick.

El efecto de los tratamientos sobre la respuesta organogénica en el cv. Velvick se presenta en el Cuadro 5.

La mayor tasa de brotación se obtuvo en el tratamiento con BA y AIB, lo cual coincide con lo reportado por DALASO y GUEVARA (1989), quienes obtuvieron un 17% de explantes verdes y organogénicos al utilizar esta combinación de reguladores del crecimiento.

Los tratamientos 1 y 4 permitieron un incremento en el número de brotes por explante, pero con diferentes tipos de organogénesis. En el tratamiento 4, la difenilurea CPPU permitió la formación de brotes adventicios originados de la epidermis y no a partir de un punto de crecimiento pre-formado. Este efecto incluso se produjo en los explantes que presentaron el desorden fisiológico de necrosis apical (Figura 5).

El CPPU ha sido evaluado en otras especies leñosas. En kaki, el efecto se caracteriza por un incremento en las tasas de brotación y proliferación, en relación a otras citoquininas y TDZ. El tipo de organogénesis es principalmente yemas adventicias, es decir, similar respuesta a la presentada en este ensayo (TAO y SUGIURA, 1992).

En azalea, el CPPU ha permitido estimular la proliferación de brotes, en reemplazo de reguladores de mayor costo como zeatina y 2iP (FELLMAN, READ y HOSIER, 1987). En este caso se considera un equilibrio entre costos y productividad, ya que CPPU en bajas dosis permite formar un promedio de cinco brotes por explante, mientras que altas dosis de zeatina y 2iP permiten hasta 20 y 8 brotes, respectivamente. En el presente ensayo también se produjo un efecto similar, ya que el CPPU permitió incrementar el número de brotes por explante en dosis 6 a 20 veces menores que las utilizadas en los tratamientos con BA (Cuadro 5).

En el caso de la benciladenina, el tipo de brotes formados es diferente, ya que se originan a partir de la yema principal y de puntos de crecimiento axilares pre-formados (Figura 6). Este tipo de organogénesis ha sido descrita en palto por DALSASO y GUEVARA (1989) y PLIEGO-ALFARO (1988).

Se puede distinguir un brote formado de novo de uno pre-formado por su morfología; el brote neo formado tiene hojas opuestas decruzadas y muy compactas, como un brote de conífera, mientras que un brote axilar tiene hojas en un arreglo helicoidal (Figuras 5 y 6).

La combinación de BA y GA<sub>3</sub> no permitió lograr organogénesis. Sin embargo, NEL y KOTZÉ (1982) reportan la formación de un brote por elongación de la yema principal pre-formada al utilizar esta combinación de reguladores. En el

Ensayo 5, igual condición hormonal, pero utilizando el medio WPM, tampoco permitió lograr una respuesta en el cv. Velvick.

**CUADRO 5.** Efecto de diferentes reguladores del crecimiento sobre la organogénesis de yemas axilares de palto cv. Velvick.

Tratamiento (1)	Tasa de brotación (%)	Número promedio de brotes por explante
T0 Control	*	*
T1 BA (2) + AIB (0.5)	25 a	1.4
T2 BA (0.65)	5 b	1.0
T3 BA (2) + GA <sub>3</sub> (2)	*	*
T4 CPPU (0.1)	10 b	1.5
T5 CPPU (0.01)	5 b	1.0

\*: indica sin respuesta

(1): Números entre paréntesis indican concentración en mg/l.

Letras iguales indican que no existe diferencia estadísticamente significativa entre tratamientos, según Test de Comparación de Proporciones (P=0.05)



FIGURA. 5. Formación de brotes adventicios a partir de una yema axilar con necrosis apical del cv. Velvick, cultivada en un medio con CPPU 0.1 mg/l por 90 días.

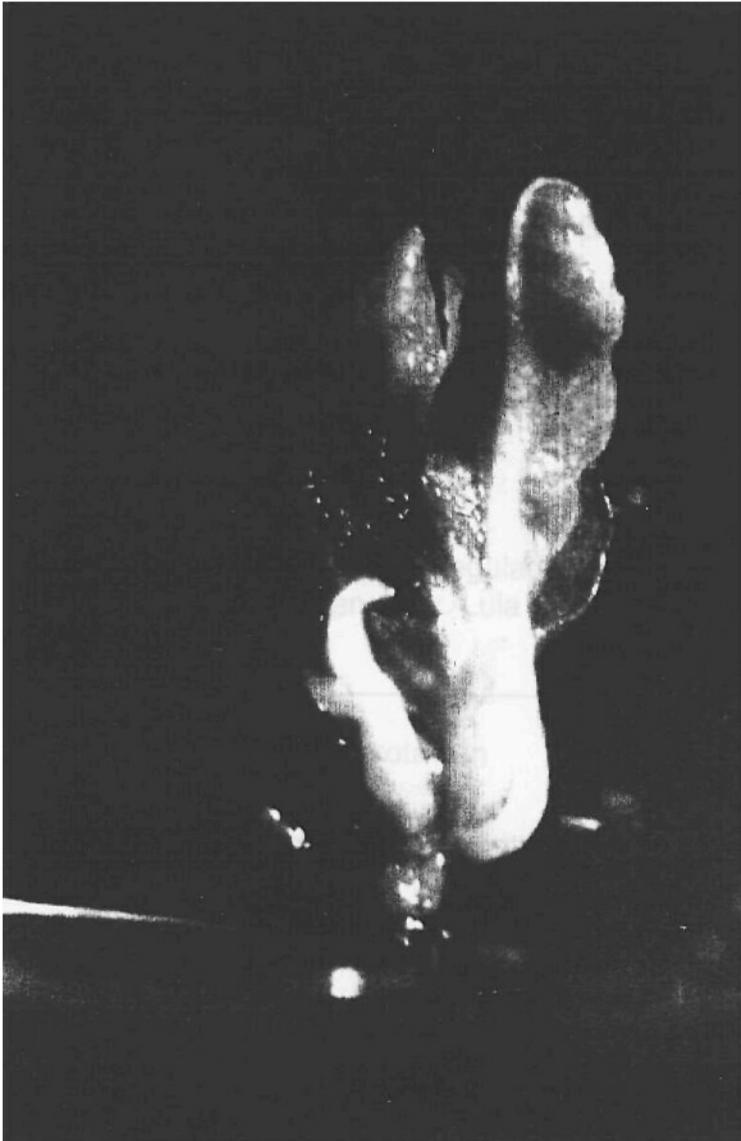


FIGURA. 6. Formación de brotes a partir de una yema principal y de una yema lateral (secundaria) pre-formada, en el cultivo *in vitro* de yemas axilares del cv. Velvick con BA 0.65 mg/l, después de 60 días de cultivo.

En el cv. Lula la mayor tasa de brotación se logró con 0.65 mg/l de BA, siendo mejor que el testigo y que los otros tratamientos (Cuadro 6). DALSASO y GUEVARA (1989) señalan que bajas dosis de BA, como las utilizadas en este tratamiento, podrían no ser del todo óptimas por un efecto de adsorción del regulador por parte del PVP. Ello podría implicar que este cultivar requiere de dosis bajas de BA, porque el testigo sin reguladores llevó a un 50% de brotación.

**CUADRO 6.** Efecto de diferentes reguladores del crecimiento sobre la organogénesis en el cv. Lula.

Tratamiento (1)	Tasa de brotación (%)	Número promedio de brotes por explante
T0 Control	50 b	1.0
T1 BA (2) + AIB (0.5)	10 c	1.0
T2 BA (0.65)	70 a	1.0
T3 BA (2) + GA <sub>3</sub> (2)	*	*
T4 CPPU (0.1)	10 c	1.5
T5 CPPU (0.01)	5 c	1.0

\*: indica sin respuesta

(1): Números entre paréntesis indican concentración en mg/l.

Letras iguales indican que no existe diferencia estadísticamente significativa entre tratamientos, según Test de Comparación de Proporciones (P=0.05)

El efecto del CPPU en dosis de 0.1 mg/l fue aún más claro en este cultivar, ya que fue el único tratamiento que permitió obtener más de un brote por explante.

Al igual que en el cv. Velvick, se observó un efecto detrimental de la combinación de BA y GA<sub>3</sub>.

**Ensayo 3:** Efecto de cuatro antioxidantes sobre el pardeamiento de yemas axilares de palto, cvs. Velvick y Lula.

Los estados en los cuales se definió un daño tipo 1 y 2, se presentan en las Figuras 7 y 8, respectivamente.

Al comparar el grado de pardeamiento entre los distintos tratamientos, con el Test no paramétrico de Kruskal-Wallis, no se advirtieron diferencias estadísticas, al nivel de significancia utilizado, para ambos cultivares. Los valores promedio de ERP se presentan en el Cuadro 7.

Otra forma de evaluar el efecto antioxidante de estos productos químicos, es mediante una medición de fenoles totales con espectrofotometría. Este método ha sido utilizado en otro frutal subtropical (Chirimoyo), relacionando la regeneración con los fenoles totales de explantes provenientes de diferentes tratamientos antioxidantes (JORDAN, ITURRIAGA y ROVERARO, 1991). En dicho ensayo se estableció que no hay formación de brotes sin un antioxidante en el medio de cultivo, a pesar de usar auxinas y citoquininas en dosis adecuadas.

La formación de brotes en el cv. Velvick fue considerablemente baja, obteniéndose sólo un 5% de brotación en los tratamientos con DIECA y ácido ascórbico más ácido cítrico (Cuadro 8). Esta baja tasa de sobrevivencia no permitiría iniciar una propagación en gran escala de este cultivar. El ácido

ascórbico fue utilizado por NEL y KOTZÉ (1982), logrando una inhibición del pardeamiento enzimático. Sin embargo, en este cultivar no se logró efecto sobre el control del pardeamiento. DALASO y GUEVARA (1989), utilizando PVP en concentraciones similares, consiguieron controlar el pardeamiento y obtener organogénesis.

CUADRO 7. Tasa relativa de pardeamiento en función del tipo de antioxidante en el medio de cultivo, para los cultivares Velvick y Lula.

Tratamiento (1)	Valor de ERP (2)	
	cv. Velvick	cv. Lula
Control	2.38 ± 0.57	2.26 ± 0.82
PVP (1000)	1.88 ± 0.45	2.05 ± 0.34
CA (1000)	1.89 ± 0.40	2.15 ± 0.86
DIECA (15)	1.55 ± 0.46	2.05 ± 0.54
Acido ascórbico (60)	1.47 ± 0.36	1.47 ± 0.63
Ac. ascórbico (60) + Ac. cítrico (30)	2.06 ± 0.68	1.90 ± 0.69

(1): Valores entre paréntesis indican concentración en mg/l.

(2): ERP (escala relativa de pardeamiento), expresada en promedio y desviación estándar.

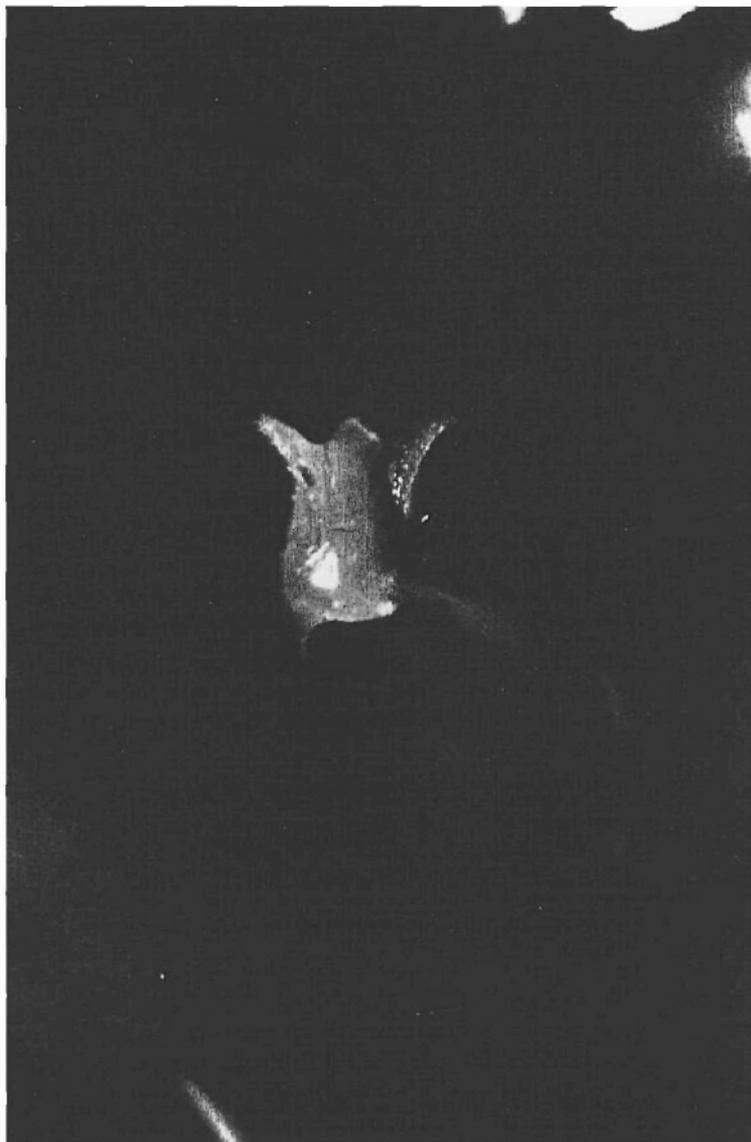


FIGURA 7. Estado tipo 1 de la escala relativa de pardeamiento (ERP) utilizada para evaluar el grado de control de oxidación logrado con cada tratamiento. El explante presenta pardeamiento en la zona de corte.

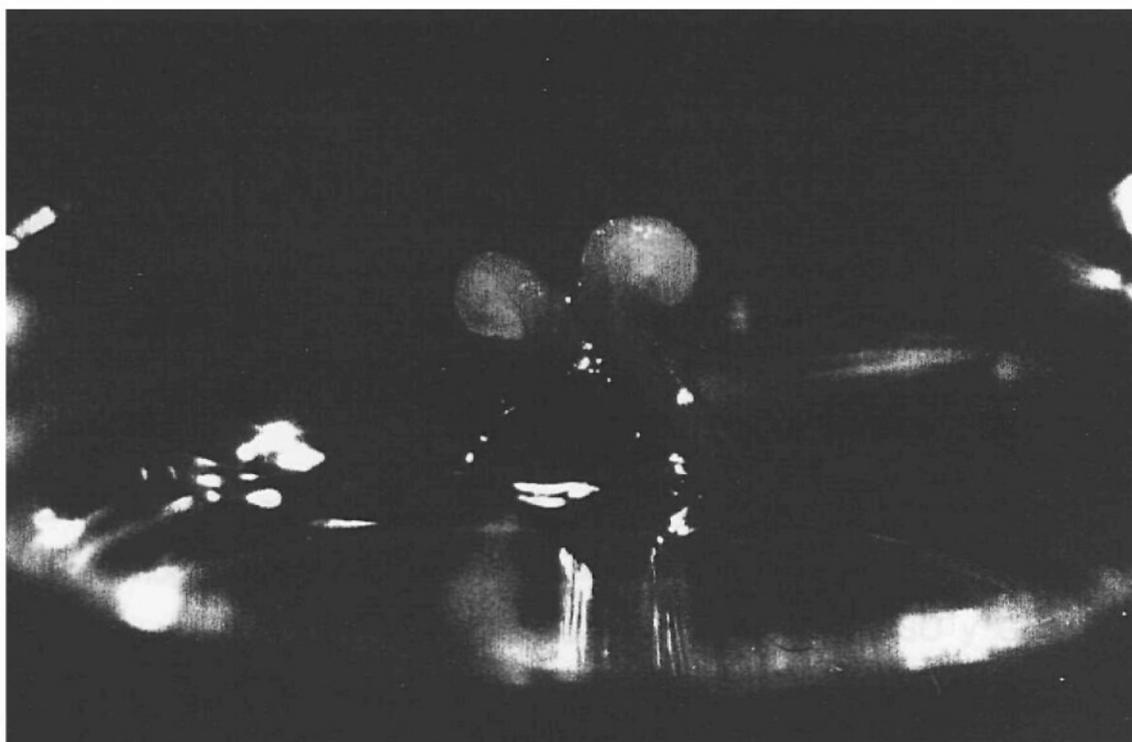


FIGURA 8. Estado tipo 2 de la escala relativa de pardeamiento (ERP) utilizada para evaluar el grado de control de oxidación logrado con cada tratamiento. El explante presenta necrosis apical y pardeamiento en la zona de corte.

**CUADRO 8: Formación de brotes en función del tipo de antioxidante, en el cv. Velvick.**

Tratamiento	Tasa de brotación (%)
Control	*
PVP (1000)	*
CA (1000)	*
DIECA (15)	5
Acido ascórbico (60)	*
Ac. ascórbico (60) + Ac. cítrico (30)	5

\*: indica sin respuesta.

En el cv. Lula se observó un efecto positivo del ácido ascórbico, favoreciendo la organogénesis (Cuadro 9). El tipo de estructura que se formó corresponde a una roseta, como la descrita previamente por DALSASO y GUEVARA (1989). Consiste en un conjunto de brotes de 2 a 7 nudos, sin brotes dominantes, con pequeñas hojas que se renuevan constantemente (Figura 9).

A partir de las estructuras de roseta, se logró separar entre 2 y 7 secciones nodales (microestacas). La sobrevivencia al subcultivar en medios frescos WPM, con ácido ascórbico más PVPP e igual concentración de reguladores del crecimiento, se vio condicionada por la calidad de la yema. Logran

establecerse sólo aquellas microestacas que mantenían una hoja activa (Figura 10).

El hecho de que sólo las microestacas con hojas puedan establecerse en el sub-cultivo, sería un efecto de la inhibición en el desarrollo de la yema axilar, producto de la abscisión de la hoja (THORP, ASPINALL y SEDGELY, 1994). En la propagación por estacas de palto, también se ha determinado que la hoja debe permanecer para que se logre sobrevivencia y la posterior rizogénesis (RAVIV y REUVENI, 1984).

CUADRO 9. Formación de brotes en función del tipo de antioxidante, en el cv. Lula.

Tratamiento	Tasa de brotación (%)
Control	*
PVP (1000)	*
CA (1000)	*
DIECA (15)	*
Acido ascórbico (60)	35
Ac. ascórbico (60) + Ac. cítrico (30)	*

\*: indica sin respuesta.

La hoja aportaría fotosintatos y hormonas para la rizogénesis (HARTMANN, KESTER y DAVIES, 1990), así como promotores o co-factores específicos de esta especie, los cuales aún no han sido identificados químicamente (RAVIV y REUVENI, 1984a).

En las microestacas subcultivadas (Figura 10), la defoliación puede haber sido producida por un incremento en los niveles de etileno dentro del tubo de cultivo, ya que en este caso se utilizó plástico adherente para sellar las tapas. PLIEGO-ALFARO y MURASHIGE (1987) señalan que es importante mantener las hojas para lograr sobrevivencia y rizogénesis *in vitro* de las microestacas de palto, lo cual se puede realizar con aspersiones foliares de BA, manteniendo la capacidad "sink".



FIGURA 9. Formación de estructura de roseta a partir de una yema axilar de palto cv. Lula, en un medio 1/2MS con BA 1 mg/l y ácido ascórbico 60 mg/l.



FIGURA 10. Microestaca subcultivada, obtenida mediante el corte del brote original en secciones de un nudo, formando un nuevo brote con activa renovación de hojas en un medio WPM con BA 1 mg/l, ácido ascórbico 60 mg/l y PVPP 1000 mg/l.

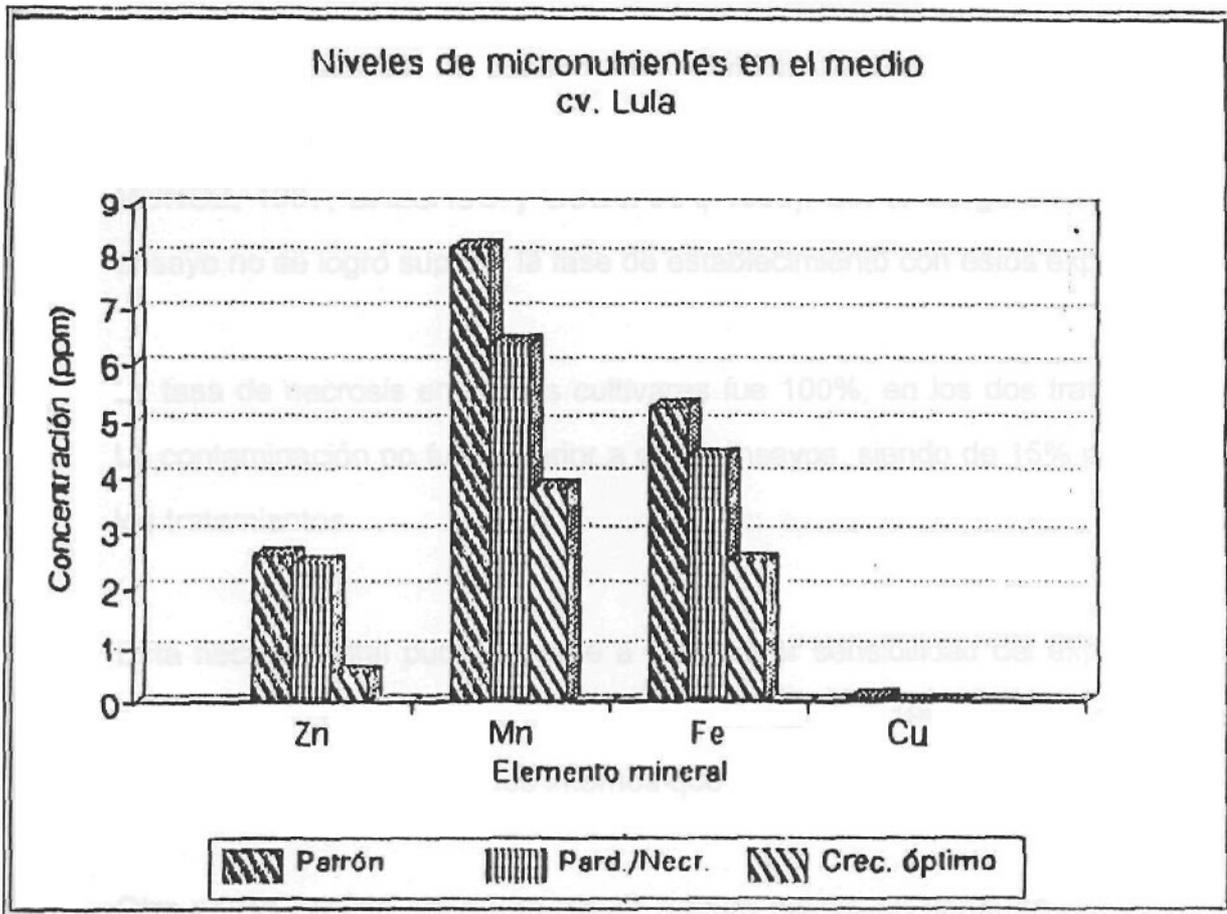
La baja tasa de proliferación que se obtuvo en ambos cultivares pudo estar asociada a la solución mineral que se utilizó en este ensayo (MS). Para verificar si era el medio de cultivo lo que estaba deteniendo el desarrollo de las plantas, se midió la conductividad eléctrica en una solución de MS reducida a la mitad, comparándola con un medio WPM. El medio 1/2 MS presentó un valor de CE de 3.5 mmhos/cm, mientras que en el WPM fue de 2.8 mmhos/cm. Ambos valores son considerablemente altos para la especie, si se comparan con los estándares de campo para CE del agua de riego o del suelo. GARDIAZABAL y ROSENBERG (1991) señalan que una CE mayor a 1.0 mmhos/cm es restrictiva para esta especie frutal. Un valor elevado de CE indica que el medio de cultivo presenta un exceso de sales, un elevado potencial osmótico y, por ende, mayor dificultad del explante para extraer agua del sustrato.

En el gel de uno de los tubos en que se logró formar una roseta, fueron medidos los niveles disponibles de algunos micronutrientes al término del cultivo, para comparar con un tubo de medio fresco (no inoculado) y uno en el cual se produjo pardeamiento del explante y posterior necrosis. El resultado de esta medición indica que se reducen los niveles de todos los elementos estudiados, siendo el zinc el que se consume en mayor proporción, situación que puede explicarse por la importancia de este nutriente en la síntesis de clorofila (TAIZ y ZEIGER, 1991). La coloración verde de la clorofila se presentó en los tejidos en activo crecimiento (Figura 9 y 11).

Los niveles de cobre también disminuyen, siendo menores que la precisión del equipo. En el tubo en que se presentó necrosis y pardeamiento, también hubo consumo de nutrientes, pero en menor proporción.

El consumo de manganeso puede haber sido producto de la alta actividad metabólica del tejido, ya que este elemento está involucrado con las síntesis de enzimas del ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TAIZ y ZEIGER, 1991). Los tejidos vegetales in vitro tienen un metabolismo principalmente heterotrófico, por lo cual los hidratos de carbono del medio de cultivo son ingresados al ciclo de Krebs. La disminución en los niveles de fierro y cobre, así como de los otros nutrientes estudiados, estaría dada por el incremento en la biomasa de los tejidos, parámetro que no fue medido.

Los estudios de nutrición in vitro generalmente son realizados considerando mediciones de crecimiento y desarrollo y, en algunos casos, con mediciones de nutrientes en tejidos (GEORGE y SHERRINGTON, 1984). Métodos no destructivos e indirectos, como el presentado en este ensayo, no han sido reportados. El fundamento de este sistema de evaluación indirecto es que en cada tubo crece una sola planta, y no hay drenaje ni volatilización de los elementos estudiados. Por ello, la diferencia entre los contenidos de nutrientes entre un medio de cultivo fresco y uno desgastado, sólo se pueden explicar por el consumo por parte de la planta.



**FIGURA 11.** Representación gráfica de los contenidos de micronutrientes en el sustrato, medidos en partes por millón (ppm). Los niveles de uso son: crecimiento óptimo por 60 días, sin respuesta (pardeamiento y necrosis) y como patrón un medio fresco, no inoculado.

Ensayo 4: Cultivo de secciones nodales de los cvs. Velvick y Lula.

Diversos autores han reportado que el mejor explante son las secciones nodales (NEL y KOTZÉ, 1982; PLIEGO-ALFARO, ENCINA y BARCELO-MUÑOZ, 1987; DALSAO y GUEVARA, 1989). Sin embargo en el presente ensayo no se logró superar la fase de establecimiento con estos explantes.

La tasa de necrosis en ambos cultivares fue 100%, en los dos tratamientos. La contaminación no fue superior a otros ensayos, siendo de 15% para todos los tratamientos.

Esta necrosis total pudo deberse a una mayor sensibilidad del explante a la desinfección con hipoclorito de sodio (SOLORZANO, 1989), posiblemente por la mayor superficie de tejidos internos que queda expuesta al desinfectante.

Otra causa posible sería una mayor ruptura celular en comparación con una yema axilar, en la que la relación entre zona de corte y tejido intacto es favorable a la segunda. La acumulación de derivados fenólicos en el medio de cultivo y en la zona que rodea al explante estarían inhibiendo su crecimiento y desarrollo (GEORGE y SHERRINGTON, 1984).

Al liberarse los compuestos fenólicos que están contenidos en la vacuola, queda en contacto la enzima con su sustrato. De este modo, comienza una reacción autocatalítica que puede llevar a necrosar completamente un tejido

pardeado. Esto permitiría explicar la razón por la cual la muerte del explante no se produce al momento de la inoculación, sino que presenta un desfase de tiempo cercano a dos semanas. Es en este período en el cual se podría mejorar la tasa de establecimiento en un próximo ensayo, mediante subcultivos frecuentes y renovación de los cortes bajo una solución antioxidante.

GEORGE y SHERRINGTON (1984) señalan que en algunas especies en que se presenta pardeamiento, la única forma de control es mediante el uso combinado de dos o más antioxidantes. En Anigozanthus y Eucalyptus se ha utilizado cafeína, DIECA y PVP juntos, en tratamientos de pre-siembra. El concepto en este caso es detener la reacción mediante inhibición de la PPO y al mismo tiempo disminuir la disponibilidad del sustrato de la enzima con adsorción por PVP. Es por ello que en el Ensayo 6 se utilizó una combinación de 2 antioxidantes en el medio de cultivo.

**Ensayo 5:** Efecto del medio sólido y líquido sobre la organogénesis *in vitro* de yemas axilares de los cvs. Velvick y Lula.

Los resultados de este ensayo demuestran la efectividad del medio sólido para condicionar una respuesta organogénica en el cv. Lula (Cuadro 11). Los explantes del cv. Velvick no superaron la etapa de establecimiento, presentando una tasa de necrosis de 100% en ambos tratamientos.

**CUADRO 11.** Efecto de la condición física del medio de cultivo sobre la organogénesis de yemas axilares en el cv. Lula, a los 60 días de cultivo.

Tratamiento	Tasa de brotación (%)	Número brotes por explante (promedio)	Largo promedio de brotes (cm)
Medio sólido	48	2.4	2.2
Medio líquido	12	1.0	0.5

El medio sólido permitió incrementar la tasa de proliferación, así como el largo promedio de los brotes (Figura 12). NEL y KOTZÉ (1982), utilizando igual combinación de reguladores del crecimiento, pero con medio líquido, consiguieron un efecto sólo de elongación de un brote a partir de la yema principal pre-formada. La mayor parte de la investigación desarrollada en esta

especie, hace referencia al uso de medios gelificados con agar-agar (PLIEGO-ALFARO, ENCINA y BARCELO-MUÑOZ, 1987; DALSAO y GUEVARA; 1989 SOLORZANO, 1989).

El efecto detrimental del medio líquido con puente de papel pudo deberse al limitado contacto del explante con el sustrato (Figura 13). Esto puede favorecer el pardeamiento, porque el explante no recibe el antioxidante, comenzando el proceso autocatalítico que lleva a la necrosis del explante. Además, si el explante no tiene un contacto adecuado con el sustrato, puede producirse deshidratación, así como presentarse problemas nutricionales que limiten el potencial organogénico de la especie.

Se observó un efecto positivo de la solución mineral utilizada, al comparar el resultado de este ensayo con el tratamiento 1 del Ensayo 2, en el cual se utilizaron iguales reguladores del crecimiento, pero la solución mineral de MS. Este efecto se debería a la menor concentración de amonio que contiene el medio WPM en relación al MS, el cual sería detrimental para la expresión del potencial regenerativo de las especies leñosas (LLOYD y McCOWN, 1981).

Esta solución mineral (WPM) no ha sido reportada en el cultivo in vitro de esta especie. Sin embargo, se ha utilizado en otras especies leñosas como lúcumo (JORDAN y OYANEDEL, 1992), rosa y eucalyptus (HARTMANN, KESTER y DAVIES, 1990). En algunos casos no se ha encontrado una

diferencia sustancial en comparación con un medio estándar como MS (PALMA, 1990).

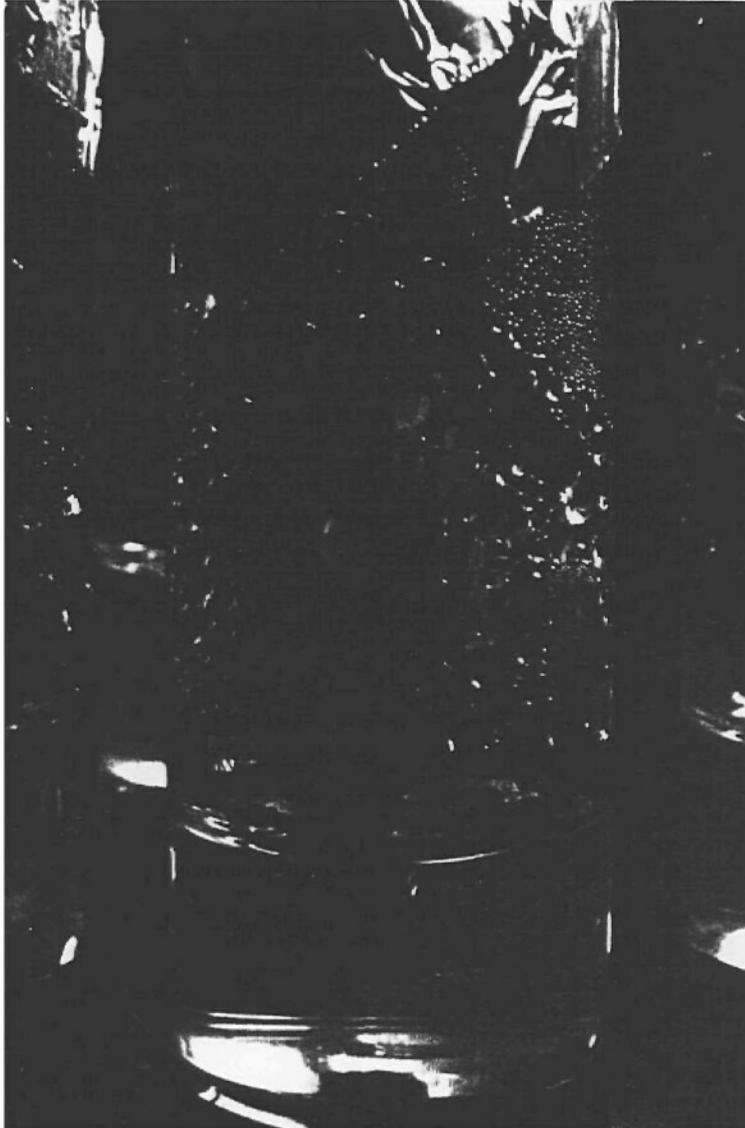


FIGURA 12. Formación de brotes múltiples a partir de yemas axilares del cv. Lula, cultivadas en un medio WPM con BA 2 mg/l y GA<sub>3</sub> 0.5 mg/l por 60 días.



FIGURA 13. Yema axilar del cv. Lula cultivada en un medio líquido con puente de papel. Se observa que el contacto del explante con el sustrato es sólo a través de dos puntos.

Ensayo 6: Efecto de dos difenilureas y benciladenina sobre la formación de brotes en los cvs. Velvick y Lula.

La respuesta del cv. Velvick a los distintos tratamientos se presenta en el Cuadro 12.

Las menores tasas de necrosis estuvieron asociadas a TDZ y BA junto con AIB. Estos tratamientos permiten una tasa de establecimiento de 80%, lo cual sería muy favorable para iniciar una propagación en mayor escala de este portainjerto. Con respecto a la brotación, la mayor efectividad se logró con CPPU en la misma dosis en que tuvo un efecto positivo en el Ensayo 2. La dosis mayor de CPPU fue detrimental, posiblemente produciendo un efecto fitotóxico al reducir la brotación a un nivel similar al testigo.

Se logró aislar el efecto de BA sobre la brotación, ya que estadísticamente fue diferente al tratamiento con BA y AIB, por lo que se puede afirmar que es la citoquinina por sí sola la que permite obtener una alta brotación. Esto coincide con los resultados de PLIEGO-ALFARO (1988), quien logra un efecto similar al utilizar sólo BA.

El TDZ no permitió incrementar la brotación, siendo equivalente al testigo en las dos concentraciones utilizadas. Este regulador se ha utilizado en otras especies leñosas, favoreciendo la organogénesis (JORDAN y OYANEDEL,

1992) e incrementando las tasas de proliferación (HARTMANN, KESTER y DAVIES, 1990).

**CUADRO 12.** Efecto de dos difenilureas y benciladenina sobre la tasa de necrosis y la tasa de brotación en el cv. Velvick.

Tratamiento (1)	Tasa de necrosis (%)	Tasa de brotación (%)
V0 Control	48 a	48 c
V1 BA (2) + AIB (0.5)	20 c	92 a b
V2 CPPU (0.1)	28 b c	96 a
V3 CPPU (0.5)	40 b	44 c
V4 TDZ (0.1)	44 b	44 c
V5 TDZ (0.01)	20 c	60 c
V6 BA (2)	48 a b	88 a b

(1): Números entre paréntesis indican concentración en mg/l.  
 Letras iguales indican que no existe diferencia estadísticamente significativa entre tratamientos, según Test de Comparación de Proporciones (P=0.05)

Las difenilureas utilizadas en este ensayo (CPPU y TDZ) tienen efectos citoquinínicos, sin ser estrictamente citoquininas (HARTMANN, KESTER y DAVIES, 1990). La diferencia estaría dada por la respuesta a nivel bioquímico que producen en el vegetal, en relación a una citoquinina propiamente tal.

MOK et al. (1987) describen una respuesta diferenciada a la expresión de isozimas de la fosfatasa ácida en presencia de zeatina o TDZ.

Por otro lado, otros autores han descrito que el TDZ estaría induciendo la biosíntesis endógena de citoquininas, mientras que el BA participaría promoviendo la síntesis de zeatina y ribosil-zeatina (FELLMAN, READ y HOSIER, 1987).

La respuesta del cv. Lula a los diferentes tratamientos se presenta en el Cuadro 13. En este cultivar se observó un marcado efecto de los reguladores del crecimiento en el control de la necrosis de los tejidos. Los tratamientos con BA, CPPU y TDZ en su concentración más baja, permitieron tasas de mortalidad menores al 8%, sin diferencias significativas entre ellos. Este resultado estaría siendo producido por una mayor actividad metabólica en las células, ya que las citoquininas estimulan la síntesis de RNAm y ayudan a mantener a los tejidos activos, aún en condiciones de explantación (TAIZ y ZEIGER, 1991).

El TDZ en concentración 0.1 mg/l tuvo un efecto detrimental sobre los tejidos, aumentando la necrosis a niveles similares a los que se obtuvieron en el testigo.

CUADRO 13. Efecto de dos difenilureas y benciladenina sobre la tasa de necrosis y la tasa de brotación en el cv. Lula.

Tratamiento (1)	Tasa de necrosis (%)	Tasa de brotación (%)
V0 Control	32 a b	32 c
V1 BA (0.65)	8 c	36 c
V2 CPPU (0.1)	8 c	72 a b
V3 CPPU (0.5)	4 c	92 a
V4 TDZ (0.1)	48 a	32 c
V5 TDZ (0.01)	12 b c	56 b c

(1): Números entre paréntesis indican concentración en mg/l.  
 Letras iguales indican que no existe diferencia estadísticamente significativa entre tratamientos, según Test de Comparación de Proporciones (P=0.05)

La brotación fue significativamente mejor en los tratamientos con CPPU, siendo mayor en el tratamiento con concentración de 0.5 mg/l.

Las tasas de necrosis y la brotación no están correlacionadas en ambos cultivares, producto de que en algunos explantes se produjo un crecimiento inicial acelerado, seguido por una muerte del tejido. Este fenómeno ha sido reportado en el cultivo *in vitro* de otras especies de frutales sub-tropicales (JORDAN y OYANEDEL, 1992). En todos los ensayos se observó una respuesta diferenciada de los cultivares Velvick y Lula a los distintos tratamientos. La principal causa de ello sería el origen genético de ambos cultivares, ya que el cv. Lula es un híbrido de las razas Guatemateca y

Mexicana, mientras que el cv. Velvick es de la raza Guatemalteca. Respuestas diferenciadas por cultivares y razas ya han sido reportadas por otros autores (DALZASO y GUEVARA, 1989; SOLORZANO, 1989; PLIEGO-ALFARO et al., 1990). También es posible que la respuesta diferenciada de los cultivares a los tratamientos en común se haya producido por el hecho de que los árboles del cv. Lula fueron asperjados con paclobutrazol. Este producto, que es un inhibidor de la síntesis de giberelinas, podría haber reducido los niveles endógenos de esta hormona (TAIZ y ZEIGER, 1991).

Se han utilizado aspersiones con paclobutrazol para pre-acondicionar a las plantas madre en otras especies leñosas como duraznero y Hedera helix, antes de extraer las estacas. El efecto de este regulador consiste en un incremento en las tasas de enraizamiento. En estos ensayos, los autores utilizaron como condición estándar una aplicación de auxinas a la base de las estacas (WIESMAN, RIOV y EPSTEIN, 1989; GENEVE, 1990).

También es posible que la ontogenia de las plantas madre haya influenciado la respuesta diferenciada de los cultivares. PLIEGO-ALFARO et al. (1990) señalan que sólo a partir de material juvenil es posible lograr organogénesis in vitro. En estos ensayos, el material del cv. Velvick se puede considerar en transición entre la fase juvenil y la fase adulta, ya que presentaron su primera floración en la primavera de 1994. Los árboles del cv. Lula estaban en su fase adulta propiamente tal, con presencia de frutos y flores.

La presencia de fruta en el árbol puede haber alterado los equilibrios nutricionales y hormonales del árbol, ya que los embriones sintetizan reguladores del grupo de las giberelinas (TAIZ y ZEIGER, 1991). Niveles endógenos de giberelinas en el árbol relativamente altos pueden favorecer el crecimiento vegetativo de los explantes *in vitro*, pero podrían también ser contrarios a la formación de raíces. Es por ello que es importante en esta especie realizar una fase de establecimiento y proliferación con citoquininas, para posteriormente inducir la rizogénesis en un medio sólo con auxinas (GARCIA-GOMEZ *et al*, 1994). De este modo se puede equilibrar los niveles endógenos de reguladores en el explante *in vitro*, e independizarse de la situación puntual que presenta el órgano al momento de la explantación.

En general, al utilizar como fuente de explantes material vegetativo en activo crecimiento, se obtienen tasas de sobrevivencia más altas que las que se logran empleando púas con el crecimiento determinado. Ello estaría dado por la fuerte capacidad "sink" que presenta un brote en crecimiento activo, recibiendo los fotoasimilados que producen las hojas maduras. La selección del momento óptimo de recolección de explantes en terreno, debiera basarse en los días posteriores al inicio de la brotación (DDIB). WHILEY y SCHAFFER (1993) han demostrado que la capacidad sink de las raíces supera a la de los brotes nuevos a los 34 DDIB, produciéndose un mayor flujo basipétalo de los fotosintatos a partir de ese momento. A los 18 DDIB el brote vegetativo presenta su máxima capacidad de "sink", por lo que en ensayos

futuros se debiera considerar esta fecha de referencia como el momento ideal de explantación.

## 5. CONCLUSIONES

Se demostró la factibilidad de desarrollar las fases de establecimiento y proliferación bajo condiciones de cultivo in vitro de yemas axilares de palto, cvs. Lula y Velvick.

Los tejidos de palto de los cvs. Velvick y Lula pueden ser desinfectados en forma eficiente con hipoclorito de sodio 0.25 - 0.5%, con tasas de contaminación menores al 10%.

Es necesario utilizar antioxidantes para la etapa de pre-cultivo y en el establecimiento in vitro de ambos cultivares, para controlar el pardeamiento enzimático.

En la fase de proliferación en el cv. Velvick, las mayores tasas de sobrevivencia y multiplicación se obtienen al utilizar BA o CPPU, en concentraciones de 1.0 y 0.1 mg/l, respectivamente.

Las fases de establecimiento y proliferación en el cv. Lula, pueden ser llevadas a cabo en un medio de cultivo con CPPU en concentración de 0.5 mg/l.

## 6. RESUMEN

En el Laboratorio de Micropropagación de la Facultad de Agronomía, Universidad Católica de Valparaíso, se realizó un ensayo para determinar la factibilidad de propagar in vitro dos portainjertos de palto (Persea americana Mill.) resistentes a salinidad, cvs. Velvick y Lula.

Los medios de cultivo utilizados fueron MS y WPM, suplementados con inositol 100 mg/l, hidrolizado de caseína 500 mg/l, glutamina 200 mg/l, tiamina 0.4 mg/l, sacarosa 3% y gelificados con una mezcla de agar-agar 0.2% y gelrite 0.2%

Se utilizaron brotes en activo crecimiento, de los "flushes" vegetativos de primavera, verano y otoño. En terreno se cortaron púas de 5-8, defoliándolas y sumergiéndolas en una solución de 500 mg/l de ácido ascórbico y ácido cítrico, y hielo 50% v/v. Estos antioxidantes también se utilizaron en pre-siembra en una solución estéril.

Se evaluó el efecto desinfectante del hipoclorito de sodio, fungicidas más antibióticos y sulfato ferroso más captan 80% WP. Los mejores resultados se obtuvieron con hipoclorito 0.25-0.5% más tween 20 0.1 ml/l.

Se comparó el efecto antioxidante de PVP, CA, DIECA, ácido ascórbico y ácido cítrico. Sólo en el cv. Lula se observó un efecto significativo de ácido ascórbico 60 mg/l.

Se contrastó la organogénesis en función del tipo de medio físico, comparando un medio gelificado con uno líquido y puente de papel. El medio gelificado permitió aumentar la tasa de proliferación en el cv. Lula.

En una serie de dos ensayos consecutivos, se comparó la proliferación inducida por diferentes concentraciones y combinaciones de CPPU, TDZ, BA, GA<sub>3</sub>, AIB. Se determinó que la condición adecuada para lograr proliferación en el cv. Velvick es en base a CPPU 0.1 mg/l o BA 1.0 mg/l. En el cv. Lula la mayor brotación se obtuvo con CPPU 0.5 mg/l.

## 7. LITERATURA CITADA

- AZCON-AGUILAR, C.; BARCELO, A.; VIDAL, M.T. and DE LA VIÑA, G. 1992. Further studies on the influence of mycorrhizae on growth and development of micropropagated avocado plants. *Agronomie* 12: 837-840.
- BINNS, A.N. 1994. Cytokinin accumulation and action: biochemical, genetic, and molecular approaches. *Ann. Rev. Plant Physiol. Mol. Biol.* 45: 173-196.
- BRINGHURST, R.S. 1988. Estrategia genotécnica. In: Moore, J.N. y Janick, J. ed. *Métodos genotécnicos en frutales*. Ciudad de México, AGT Editor. pp. 197-205.
- BROKAW, W.H. 1987. Avocado clonal rootstock propagation. *Proc. Intern. Plant Prop. Soc.* 37: 97-103.
- CIREN-CORFO (CHILE). 1993. Catastro frutícola de la V Región. Santiago, CORFO. 247 p.
- CHOU, Y. 1985. *Análisis estadístico*. Ciudad de México, Editorial Interamericana. 808 p.
- CUTTING, J.G.M. and VAN VUUREN, S.P. 1988. Rooting leafy non-etiolated avocado cuttings from gibberelin-injected trees. *Scientia Horticulturae* 37: 171-176.
- DALSASO, L. y GUEVARA, E. 1989. Multiplicación clonal *in vitro* del aguacate (*Persea americana*) cv. Fuerte. *Agronomía Costarricense* 13(1): 61-71.

- DURZAN, D., JORDAN, M y GOREUX, A. 1984. Efecto de antioxidante sobre el empardecimiento de segmentos nodales de plantas leñosas. P. Universidad Católica de Chile. Curso Expresión de la Totipotencialidad de los Tejidos Vegetales in vitro. Santiago, Julio y Agosto 1984. s.p.
- FELLMAN, C.D.; READ, P.E.; HOSIER, M.A. 1987. Effects of thidiazuron and CPPU on meristem formation and shoot proliferation. HortScience 22(6): 1197-1200.
- FRANCIS, H.L. 1992. Australian avocado research and management programs. Calif. Avocado Society Yearbook 76: 29-38.
- FROLICH, E.F. and PLATT, R.G. 1971. Use of the etiolation technique in rooting avocado cuttings. Calif. Avocado Society Yearbook 55: 97-109.
- GANDULFO, L. 1983. Efecto del anillado y la aplicación de ácido indol butírico en el enraizamiento de brotes etiolados de palto (Persea americana) cv. Mexícola. Tesis Ing. Agr. Quillota, Universidad Católica de Valparaíso. Facultad de Agronomía. 52 p.
- GARCIA-GOMEZ, M.L.; SANCHEZ-ROMERO, C.; BARCELO-MUÑOZ, A.; HEREDIA, A. and PLIEGO-ALFARO, F. 1994. Levels of endogenous indole-3-acetic acid and indole-3-acetyl-aspartic acid during adventitious rooting in avocado microcuttings. Journal of Experimental Botany 45(257): 865-870.
- GARDIAZABAL, F. y ROSENBERG, G. 1991. Cultivo del Palto. Quillota, Universidad Católica de Valparaíso, Facultad de Agronomía. 201 p.
- GENEVE. R.L. 1990. Root formation in cuttings of English Ivy treated with paclobutrazol or uniconazole. HortScience 25(6): 709.

- GEORGE, E. and SHERRINGTON, P. 1984. Plant propagation by tissue culture. Eversley-London, England Exergetic. 709 p.
- GONZALEZ, H. and SALAZAR, S. 1984. Root induction and vegetative development from avocado plantules (Persea americana Mill.) Calif. Avocado Society Yearbook 68: 167-171.
- \_\_\_\_\_, RAMIREZ, G., RODRIGUEZ, J. and SALAZAR, S. 1992. Preliminary results in vitro selection for tolerance to chloride excess in avocado. Proc. of Second World Avocado Congress pp. 149-154.
- GONZALEZ, R.; RODRIGUEZ, M.; BAEZ, M.; WYLIE, A. y SOLE, J. 1975. La nutrición mineral de los vegetales. Santiago, Universidad de Chile. 124 p.
- GREGORIOU, C. and ECONOMIDES, C.V. 1991. Performance of Ettinger, Fuerte, and Hass cultivars of avocado on two rootstocks in Cyprus. Calif. Avocado Society Yearbook 75: 87-92.
- GRIBAUDO, I. and FRONDA, A. 1991. Effects of thidiazuron on grapevine axillary buds cultivated in vitro. HortScience 26(8): 1083.
- HARTMANN, H.T.; KESTER, D.E. and DAVIES, F.T. 1990. Plant Propagation - Principles and Practices. 5th. De. Englewood Cliffs, Prentice Hall Career & Technology. 647 p.
- HENNY, R.J. and FOOSHEE, W.C. 1990. Thidiazuron stimulates basal bud formation in Alocasia X Chantrieri André. HortScience 25(1): 124.
- IBAR, L. 1986. Cultivo del aguacate, chirimoyo, mango, papaya. 3ra. ed. Barcelona, Aedos. 175 p.

JORDAN, M.; ITURRIAGA, L. and ROVERARO, C. 1991. Promotion of Annona cherimola in vitro shoot morphogenesis as influenced by antioxidants. *Gartenbauwissenschaft* 56(5): 224-227.

\_\_\_\_\_ and OYANEDEL, E. 1992. Regeneration of Pouteria lucuma (Sapotaceae) plants in vitro. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 31: 249-252.

KESTER, D.E. 1978. The relationship of juvenility to plant propagation. *Proc. Intern. Plant Prop. Soc.* 26: 71-84.

KURTZ, S. and TOLLEY, T. 1990. Generation and selection of Phytophthora cinammomi resistant avocado rootstocks through somaclonal variation. *Calif. Avocado Society Yearbook.* 67:65-70.

LEVITT, J. 1980. *Responses of Plants to Environmental Stresses.* 2nd. ed. New York, Academic Press. 488 p.

LLOYD, G. and McCOWN, B. 1981. Woody plant medium. *Proc. Intern. Plant Prop. Soc.* 30: 421.

MARGARA, J. 1988. *Multiplicación vegetativa y cultivo in vitro.* Madrid, Mundi-Prensa. 232 p.

MAYER, A.M. 1987. Polyphenol oxidases in plants - Recent progress. *Phytochemistry* 26: 11-20.

MOK, M.C.; MOK, D.W.S.; TURNER, J.E. and MUJER, C.V. 1987. Biological and biochemical effects of cytoquinin - active phenylurea derivatives in tissue culture systems. *HortScience* 22(6): 1194-1197.

MOONEY, P.A. and VAN STADEN, J. 1987. Induction of embryogenesis in callus from immature embryos of Persea americana. Canadian Journal of Botany 65: 622-626.

NEL, D. and KOTZÉ, J.M. 1982. Tissue culture of avocado. South African Avocado Grower's Association Yearbook 5:68-70.

\_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_ and SNYMAN, C. 1982. In vitro propagation of Persea indica. Calif. Avocado Society Yearbook 68: 167-168.

\_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_ and \_\_\_\_\_. 1983. Progress in tissue culture of avocado. South African Avocado Grower's Association Yearbook 6: 90-91.

\_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_ and \_\_\_\_\_. 1983a. In vitro propagation of Persea indica. South African Avocado Grower's Association Yearbook 6: 92.

MURASHIGE, T. and SKOOG, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plantarum 15: 473-497.

PALMA, B. 1990. Contribution à l'étude de certains aspects de la multiplication de l'Acacia senegal (L.) Willd. Tesis Ph.D. Marseille. Université d'Aix Marseille. 335 p.

PIERIK, R.L.M. 1987. In vitro culture of higher plants. 3rd. ed. Dordrecht, Martinus Nijhoff Publishers. 326 p.

PLIEGO-ALFARO, F., ENCINA, C.L. and BARCELO-MUÑOZ, A. 1987. Propagation of avocado rootstocks by tissue culture. South African Avocado Grower's Association Yearbook 10: 36-39.

- \_\_\_\_\_, and MURASHIGE, T. 1987. Possible rejuvenation of adult avocado by graftage onto juvenile rootstocks in vitro. HortScience 22(6): 1321-1324.
- \_\_\_\_\_, and \_\_\_\_\_. 1988. Somatic embryogenesis in avocado (Persea americana Mill.). Plant Cell, Tissue and Organ Culture 12: 61-66.
- \_\_\_\_\_. 1988. Development of an in-vitro rooting bioassay using juvenile-phase stem cutting of Persea americana Mill. Journal of Horticultural Science 63(2): 295-301.
- \_\_\_\_\_, BARCELO-MUÑOZ, A.; HERRERO, A. y LOPEZ-ENCINA, C. 1990. Micropropagación de especies subtropicales. Hortofruticultura 8: 47-50.
- \_\_\_\_\_ and BERGH, B.O. 1992. Avocado. In: Hammerschlag, F.A. and Litz, R.E. eds. Biotechnology of Perennial Fruit Crops. Wallingford, CAB International. pp. 323-334.
- QUAMME, H.A. y STUSHNOFF, C. 1988. Resistencia al estrés ocasionado por el medio ambiente. In: Moore, J.N. y Janick, J. Eds. Métodos genotécnicos en frutales. Ciudad de México, AGT. pp. 323-355.
- RAVIV, M. and REUVENI, O. 1984. Mode of leaf shedding from avocado cuttings and the effect of its delay on rooting. HortScience 19(4): 529-531.
- \_\_\_\_\_ and \_\_\_\_\_. 1984a. Endogenous content of a leaf substance(s) associated with rooting ability of avocado cuttings. Journal of the American Society of Horticultural Science 109(3): 284-287.
- RODRIGUEZ, R., DIAZ-SALA, C., CUOZZO, L. y ANCORA, G. 1991. Pear in vitro propagation using a double - phase culture system. HortScience 26(1): 62-64.

- SALAZAR-GARCIA, S. and BORYS, M. W. 1989. Clonal propagation of the avocado through "franqueamiento". Calif. Avocado Society Yearbook 73: 69-72.
- SKENE, K.G.M. and BARLASS, M. 1983. In vitro culture of abscised immature avocado embryos. Annals of Botany 52: 667-672.
- SCHROEDER, C.A. 1977. Longevity of plant tissue cultures. Calif. Avocado Society Yearbook 61: 72-74.
- \_\_\_\_\_. 1979. Etiolation and avocado bud elongation in vitro. Calif. Avocado Society Yearbook 63: 85-89.
- \_\_\_\_\_. 1980. Avocado tissue in vitro. Calif. Avocado Society Yearbook. 64:139-141.
- SOLORZANO, D. 1989. Propagation in vitro of rootstocks of avocado. Calif. Avocado Society Yearbook 73: 149-151.
- STANDARDI, A. and ROMANI, F. 1990. Effects of some antioxidants on in vitro rooting of apple shoots. HortScience 25(11): 1435-1436.
- TAIZ, L. and ZEIGER, E. 1991. Plant Physiology. Redwood City, The Benjamin Cummings Publishing Co. 559 p.
- TAO, R. and SUGIURA, A. 1992. Adventitious bud formation from callus cultures of japanese persimmon. HortScience 27(3): 259-261.
- THORP, T.G.; ASPINAL, D. and SEDGLEY, M. 1994. Preformation on node number in vegetative and reproductive proleptic shoot modules of Persea (Lauraceae). Annals of Botany 73(1): 13-22.

- VAUGHN, K.C. and DUKE, S.O. 1984. Function of polyphenol oxidase in higher plants. *Physiol. Plant.* 60: 106-112.
- \_\_\_\_\_, LAX, A.L. and DUKE, S.O. 1988. Polyphenol oxidase: The chloroplast oxidase with no established function. *Physiol. Plant.* 72: 659-665.
- VIDAL, M.T., AZCON-AGUILAR, C., BAREA, J.M. y PLIEGO-ALFARO, F. 1992. Mycorrhizal inoculation enhances growth and development of micropropagated plants of avocado. *HortScience* 27(7): 785-787.
- WANG, Q. 1992. The effect of light, darkness and temperature on micropropagation of the pear rootstock BP10030. *Journal of Horticultural Science.* 67(6): 869-876.
- WETHERELL, D.F. 1982. Introduction to *in vitro* propagation. Wayne-New Jersey, Avery Publishing Group Inc. 87 p.
- WHILEY, A. W.; SCHAFFER, B. 1993. <sup>14</sup>C-Photosynthate partitioning in avocado trees as influenced by shoot development. *HortScience* 28(8): 850-852.
- WHITE, P.R. 1943. *A Handbook of Plant Tissue Culture.* Lancaster, The Jaques Cattell Press. 277 p.
- WHITSELL, R.; MARTIN, G.; BERGH, B.; LYPPS, A.; BROKAW, W. 1989. Propagating avocados: Principles and techniques of nursery and field grafting. University of California, Division of Agriculture and Natural Resources. Publ. 21461. 30 p.
- WIESMAN, Z.; RIOV, J. and EPSTEIN, E. 1989. Paclobutrazol and urea-phosphate increase rooting and survival of peach 'Maravilha' softwood cuttings. *HortScience* 24(6): 908-909.