

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE AGRONOMÍA



**REGENERACIÓN DE BROTES *in vitro* DE *Persea americana* Mill.
CON FINES DE CONSERVACIÓN.**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS EN PRODUCCIÓN AGRÍCOLA

**QUE PRESENTA
SERGIO ARAFAT GALINDO BARRIENTOS**

MARIN, N. L.

MAYO 2018

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE AGRONOMÍA



**REGENERACIÓN DE BROTES *in vitro* DE *Persea americana* Mill.
CON FINES DE CONSERVACIÓN.**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS EN PRODUCCIÓN AGRÍCOLA

PRESENTA

SERGIO ARAFAT GALINDO BARRIENTOS

MARIN, N. L.

MAYO 2018

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



FACULTAD DE AGRONOMÍA

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

MAESTRO EN CIENCIAS EN PRODUCCION AGRICOLA

COMITÉ PARTICULAR

Dra. Ma. Del Carmen Ojeda Zacarías
Director

Ph. D. Rigoberto E. Vázquez Alvarado
Co-Director

Ph. D. Emilio Olivares Sáenz
Asesor

Dr. Víctor E. Aguirre Arzola
Asesor

Dra. Adriana Gutiérrez Díez
Subdirectora de Estudios de Posgrado

DEDICATORIA

A mis padres y amigos que nunca me dan la espalda, gracias por su apoyo y confianza.

AGRADECIMIENTOS

Para Dra. Ma. Del Carmen Ojeda Zacarías, Ph. D. Rigoberto E. Vázquez Alvarado, Ph. D. Emilio Olivares Sáenz, Dr. Víctor E. Aguirre Arzola por haberme guiado a lo largo de esta etapa de mi vida y haberme apoyado de forma incondicional con su conocimiento y ayudado a cumplir con esta meta.

Al laboratorio de Biotecnología Vegetal, Unidad Marín, de la Facultad de Agronomía de la Universidad Autónoma de Nuevo León, por las facilidades brindadas durante el desarrollo de esta investigación.

A todos mis compañeros de posgrado que me ayudaron cuando lo necesitaba en la realización de esta investigación.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo brindado para la realización de mis estudios de posgrado.

INDICE DE CUADROS

		Página
No.1	Clasificación taxonómica según el Sistema Integrado de Información Taxonómica	8
No.2	Lugares de síntesis de los reguladores de crecimiento	35
No.3	Composición del medio de cultivo Murashige y Skoog (1962)	41
No.4	Tratamientos de desinfección en el establecimiento aséptico de yemas axilares de ambos cultivares de (<i>Persea americana</i> var. <i>drymifolia</i>)	42
No.5	Dosis hormonales en la etapa de inducción de brotes en ambos cultivares de (<i>Persea americana</i> var. <i>drymifolia</i>)	44
No.6	Dosis hormonales en la etapa de inducción de raíces en ambos cultivares de (<i>Persea americana</i> var. <i>drymifolia</i>), en el experimento uno	46
No.7	Dosis hormonales en la etapa de inducción de raíces en ambos cultivares de (<i>Persea americana</i> var. <i>drymifolia</i>), en el experimento dos	47
No.8	Análisis y tratamiento mediante tablas de contingencia con prueba de ji-cuadrada para la variable contaminación	49
No.9	Análisis por cultivar mediante tablas de contingencia con prueba de ji-cuadrada para la variable contaminación	50

No.10	Análisis por técnica de desinfección mediante tablas de contingencia con prueba de ji-cuadrada para la variable contaminación	51
No.11	Resultados de parámetros evaluados en la etapa de desinfección evaluados por técnica desinfección (<i>Persea americana var. drymifolia</i>)	51
No.12	Análisis por tratamientos mediante tablas de contingencia con prueba de ji-cuadrada para la variable oxidación	53
No.13	Análisis por cultivar mediante tablas de contingencia con prueba de ji-cuadrada para la variable oxidación	54
No.14	Análisis por técnica de desinfección mediante tablas de contingencia con prueba de ji-cuadrada para la variable oxidación	54
No.15	Análisis por tratamientos mediante tablas de contingencia con prueba de ji-cuadrada para la variable de explantes viables	56
No.16	Análisis por cultivar mediante tablas de contingencia con prueba de ji-cuadrada para la variable viabilidad	56
No.17	Análisis por técnica de desinfección mediante tablas de contingencia con prueba de ji-cuadrada para la variable viabilidad	57
No.18	Comparacion de medias por Tukey de las dosis hormonales utilizadas para evaluar las variables numero de brotes,	59

longitud de brotes y numero de hojas de las variedades en estudio (*Persea americana var. drymifolia*)

No.19	Resultados de las dosis hormonales en la etapa de inducción evaluados en cada variedad por separado para las variables longitud de brote y numero de hojas (<i>Persea americana var. drymifolia</i>)	60
-------	--	----

INDICE DE FIGURAS

		Página
Figura 1	Variedades en la forma del fruto del árbol del aguacate	10
Figura 2	Mapa de producción de aguacate en México	18
Figura 3	Árboles de aguacate de la raza Mexicana (<i>P. americana</i> var. <i>drymifolia</i>) del cultivar Rosita y Huevo de Toro	37
Figura 4	Pasos generales de etapa de pre-desinfección de los explantes de aguacate	38
Figura 5	Pasos generales de etapa de desinfección de los explantes de aguacate	39
Figura 6	Pasos generales de etapa de establecimiento aséptico de los explantes de aguacate	40
Figura 7	Diagrama del procedimiento de las etapas de la organogénesis de <i>P. americana</i> var. <i>drymifolia</i>	48
Figura 8	Explantes de la variedad Huevo de toro a las ocho semanas; A) T1, B) T2, C) T3, D) T4, E) T5 y F) T6	61
Figura 9	Explantes de la variedad Rosita a las ocho semanas; G) T7, H) T8, I) T9, J) T10, K) T11 y L) T12	61
Figura 10	Explantes de <i>Persea americana</i> Mill después de transcurridas ocho semanas de enraizamiento	62

INDICE

RESUMEN	xiii
ABSTRACT	xiv
I INTRODUCCIÓN	
II HIPÓTESIS	
2.1 Hipótesis nula	4
2.2 Hipótesis alternativa	4
III OBJETIVOS	
3.1 Objetivo general	5
3.2 Objetivos específicos	5
IV REVISIÓN DE LITERATURA	
4.1 Origen e Historia del aguacate	6
4.2 Taxonomía del aguacate	8
4.3 Descripción botánica del aguacate <i>Persea americana</i> Mill	9
4.4 Diversidad de especies de aguacate	10
4.4.1 Razas de aguacate	10
4.4.2 Mexicana (<i>P. americana</i> var. <i>drymifolia</i>)	10
4.4.3 Guatemalteca (<i>P. americana</i> var. <i>guatemalis</i>)	11
4.4.4 Antillana (<i>P. americana</i> var. <i>americana</i>)	11
4.5 Importancia del aguacate	12
4.5.1 Importancia económica	12

4.5.2	Importancia nutricional	13
4.5.3	Usos industriales	15
4.6	Producción de aguacate	
4.6.1	Mundial	16
4.6.2	Nacional	17
4.6.3	Estatad	19
4.7	Importancia del uso de aguacate cultivares mexicanos	
4.7.1	Propagación tradicional	20
4.7.2	Porta injertos	21
4.7.3	Variabilidad genética	21
4.7.4	Conservación de germoplasma	22
4.7.5	Bancos de cultivo <i>in vitro</i>	24
4.8	Importancia de la biotecnología vegetal	26
4.9	Micropropagación <i>in vitro</i>	27
4.9.1	Etapa 1: Establecimiento del cultivo <i>in vitro</i>	29
4.9.2	Etapa 2: Multiplicación	31
4.9.3	Etapa 3: Enraizamiento	33
4.10	Hormonas Vegetales	34

V	MATERIALES Y MÉTODOS	
5.1	Localización del trabajo experimental	36
5.2	Selección del material vegetal	36
5.3	Técnica de desinfección	37
5.3.1	Pre-desinfección de los explantes	37
5.3.2	Desinfección de los explantes	38
5.3.3	Establecimiento aséptico de los explantes	39
5.4	Inducción de brotes	42
5.5	Enraizamiento de brotes	45
VI	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
6.1	Desinfección y establecimiento aséptico de los explantes	49
6.2	Inducción de brotes	58
6.3	Enraizamiento de brotes	62
VII	CONCLUSIONES	64
VIII	BIBLIOGRAFÍA	65

NOMENCLATURAS

MS	Murashige y Skoog, 1962
ANA	Ácido 1-naftalenacético
AIB	Ácido indol-3-butírico
AIA	Ácido indolacético
AG3	Ácido giberélico
BAP	6-bencilaminopurina
TDZ	Thidiazuron
CA	Carbón activado
NaClO	Hipoclorito de sodio
Tween-20	Polisorbato 20
mL	Mililitro
L	Litro
Mg	Miligramo
g	Gramo
kg	Kilogramo
ton	Tonelada
s	Segundo
min	Minuto
h	Hora
mm	Milímetro
cm	Centímetro
ha	Hectárea

RESUMEN

Las razones para la conservación de brotes *in vitro* de material vegetal en bancos de germoplasma pueden ser cultivos destinados a alimentos y plantas útiles para la producción agrícola comercial. El presente trabajo tiene como objetivo determinar una metodología que permita la regeneración de brotes *in vitro* de *Persea americana* Mill., para conservación de germoplasma.

El tratamiento de desinfección utilizado fue favorable, se logró el establecimiento aséptico de ambos cultivares y se obtuvo un 90.01% en “Rosita” y 86.67% en “Huevo de Toro” de explantes sin contaminar y viables. Para la inducción de brotes y enraizamiento se usaron brotes provenientes del establecimiento aséptico, donde la presencia de citocininas fue necesaria para la inducción y crecimiento de brotes en el medio de cultivo de Murashige & Skoog al 50%, de macronutrientes y dosis de 2.0 y 2.5 mg L⁻¹ del BAP se obtuvieron diferentes respuestas en los dos cultivares. Después de ocho semanas se evaluaron las variables, número de brotes donde la mayor respuesta promedio fue de 1.38 brotes, mientras que la longitud de brotes fue de 2.71 cm y el mayor número de hojas fue de 5.15. En la etapa de enraizamiento después de ocho semanas de permanecer los brotes en los medios de cultivo no se logró observar la aparición de raíces en ningún tratamiento evaluado.

ABSTRACT

The reasons for the conservation of *in vitro* of plant material in germplasm banks may be crops for food plants and plants for commercial agricultural production. The present work aims to determine a methodology that allows the regeneration of *in vitro* shoots of *Persea americana* Mill. for the conservation of germplasm.

The treatment of disinfection has been used favorably, the aseptic complex of two cultivars has been achieved and 90,01% in "Rosita" and 86,67% in "Huevo de Toro" of unpolluted explants and viability. For outbreak induction and rooting, shoots were used previously from the aseptic stage, where the presence of cytokinins was necessary for the induction and growth of shoots. The addition of 6-N-Benzylaminopurine (BAP) in Murashige & Skoog culture medium modified with 50% macronutrients, and 2.0 and 2.5 mg L⁻¹ doses of BAP resulted in different responses in both cultivars. After eight weeks variables were evaluated for the number of outbreaks where the majority of the mayoral response was 1.38 outbreaks, while the length of outbreaks was 2.71 cm and the highest number of leaves was 5.15. In the rooting stage after eight weeks of stay of the shoots in the culture media was not able to observe the appearance of roots in any treatment evaluated.

I. INTRODUCCIÓN

El aguacate (*Persea americana* Mill.) es originario de Mesoamérica, se considera que es allí donde se llevó a cabo su domesticación. La evidencia más antigua del consumo de este fruto data de 7,000 a 8,000 años A. C. y fue encontrada en una cueva localizada en Puebla, México. La palabra aguacate proviene del náhuatl ahuacacuáhuítl, que significa árbol de los testículos: de ahuácatl, testículo, y cuáhuítl, árbol. El aguacatero pertenece a la familia Lauraceae y al género *Persea*, y en la actualidad contiene alrededor de 85 especies. En México no sólo existe una enorme cultura en el cultivo y consumo de este fruto, sino que representa una fuente muy importante de ingresos para el país (Mijares & Lopez, 1998).

Es miembro de la antigua y numerosa Familia vegetal de las lauráceas, la cual comprende poco más de 50 géneros entre los que se encuentra *Persea* (INIFAP, 1999). Se considera una importante fruta tropical, originaria del área de Mesoamérica. El aguacate es una especie altamente variable y su taxonomía aún no ha sido totalmente definida (Galindo *et al.*, 2008).

El género *Persea* tiene un número desconocido de especies (Berg & Scora, 1992), aunque algunos autores aseguran que son unas 80 las reconocidas como válidas (Storey *et al.*, 1986; Zentmyer, 1991). Como su nombre lo indica *Persea americana* es originaria de Mesoamérica y existen 3 razas altamente distinguibles que han sido reconocidas. Son conocidas normalmente como Mexicana, Guatemalteca y

Antillana, llamadas así por sus respectivos lugares de origen (Bergh & Ellstrand, 1986).

México es uno de los países con mayor diversidad de tipos de aguacate con al menos 20 diferentes especies, riqueza que debe ser valorada, conservada y aprovechada para una producción de mayor calidad, además de ser el principal productor y consumidor de aguacate en el mundo (Berg & Scora, 1992). La producción proviene de fuentes distintas de árboles nativos y cultivares selectos reproducidos asexualmente, en los cuales el sabor y los valores nutritivos varían según el tipo ecológico (Mijares *et al.*, 1998; Moreno-Limon *et al.*, 2010).

El consumo de aguacate *per cápita* anual es de 10 kilogramos por habitante, el mayor del mundo. El aguacate posee un alto porcentaje de lípidos totales (18%) y de ácido oléico (4%), así mismo es una excelente fuente de potasio. En la actualidad se le reconoce como alimento funcional por su aporte en ácidos grasos ω -3, vitaminas y β -sitosterol; aunado a lo anterior se le agregan las ventajas en el campo de los cosméticos. Recientemente se ha ido incursionando en aspectos de la tecnología de alimentos, para la obtención de pulpa, aguacate deshidratado, así como la extracción del aceite. El consumo de aguacate en México es principalmente en forma fresca, empleándose en numerosos platillos, o bien como acompañante. Igualmente se elaboran bebidas y helados (Bautista & Ortega, 2002).

El aguacate posee valiosas propiedades alimenticias por su alto contenido de aceite (de 12 a 30%) y proteína (de 3 a 4%), además de su contenido de hidratos de

carbono, vitaminas y minerales. Estas propiedades le confieren grandes posibilidades para el aumento en su consumo en la dieta humana. En los últimos años se ha desarrollado su industrialización en la producción de alimentos, extracción de aceites y productos farmacológicos (Rodríguez, 1992; Kritchevsky *et al.*, 2003; Ortiz *et al.*, 2004).

El estado de Nuevo León se considera uno de los centros de origen del aguacate (*Persea americana* Mill), el cual está localizado en los municipios de Galeana, Rayones, General Zaragoza y Aramberri. El fruto es cultivado en diferentes sistemas agrícolas y de forma intensiva tanto en huertas familiares como de traspatio. Sin embargo, a pesar de que el estado es reconocido como parte del centro de origen de aguacate, los niveles potenciales de producción y comercialización de este cultivo no han logrado alcanzarse por lo que es necesario identificar los factores que limitan el potencial de producción (Moreno-Limón *et al.*, 2010).

Por los antecedentes antes mencionado, el objetivo de la presente investigación es determinar una metodología que permita la regeneración de brotes *in vitro* de *Persea americana* Mill. para conservación de germoplasma.

II. HIPÓTESIS

2.1 Hipótesis nula

La interacción de reguladores de crecimiento, dosis y medio de cultivo permitirán la inducción de brotes regenerados en cultivares de aguacate raza mexicana (*Persea americana* var. *drymifolia* Mill.) con fines de conservación.

Hipótesis alternativas

1. Los explantes de ambos cultivares de aguacate se podrán establecer en condiciones asépticas.
2. La inducción de brotes en ambos cultivares de aguacate, se puede lograr mediante la combinación óptima de reguladores de crecimiento.
3. La inducción de raíces en los brotes de aguacate se puede obtener mediante el medio de cultivo y dosis óptima de una auxina.

III. OBJETIVOS

Objetivo General

Determinar una metodología que permita la regeneración de brotes *in vitro* de *Persea americana* Mill. para conservación de germplasma.

Objetivos Específicos

1. Probar tratamientos de establecimiento aséptico para dos cultivares de aguacate raza Mexicana.
2. Evaluar la combinación de reguladores de crecimiento para inducir la proliferación de brotes de aguacate raza Mexicana.
3. Inducir el enraizamiento *in vitro* de brotes regenerados de aguacate raza Mexicana.

IV. REVISION DE LITERATURA

4.1 Origen e historia del aguacate

El origen del aguacate de acuerdo a William (1977) tuvo lugar en las partes altas del centro y este de México, así como partes altas de Guatemala. Esta misma región está incluida en lo que se conoce como Mesoamérica, y también es considerada como el área donde se llevó a cabo la domesticación del mismo. Existe evidencia directa de la domesticación en el periodo clásico Maya del maíz, calabaza, yuca, algodón, aguacate, camote, y el agave, lo cual está sustentado por restos de planta en el contexto arqueológico y lingüístico que le dan validez a esta lista de cultivos (Turner & Miksieck, 1984).

El aguacate era bien conocido por el hombre desde tiempo atrás, ya que la evidencia más antigua del consumo de aguacate fueron encontrados en una cueva en Coxcatlán, región de Tehuacán, Puebla, México, datados entre los años 8,000-7,000 B.C. Las culturas antiguas también contaban con un buen conocimiento acerca del aguacate y de sus variantes, como se muestra en el Códice Florentino, donde se mencionan tres tipos de aguacate, que de acuerdo a su descripción; “aoacatl” podría tratarse de *Persea americana* var. *drymifolia* (raza Mexicana), “tlacacolaocatl” a *P. americana* var. *americana* (Raza Antillana) y “quillaoacatl” a *P. americana* var. *guatemalensis* (raza Guatemateca) (Smith, 1966).

México es uno de los países con amplia diversidad de tipos de aguacate y existen en el país al menos 20 diferentes especies relacionadas con el aguacate. Esta gran variabilidad puede ser debida a diferentes condiciones ambientales presentes a lo largo y ancho del territorio nacional y a la naturaleza que le ha conferido al aguacate, mecanismos que hacen maximizar el cruzamiento con otros tipos, y por lo tanto incrementa la variabilidad genética y por ende ampliar la adaptación a un mayor número de ambientes (Bergh, 1995).

Los recursos genéticos del aguacate son una fuente única de genes (caracteres) que pueden utilizarse para el mejoramiento genético de cultivares, porta-injertos e inter-injertos. Estos recursos están desapareciendo durante las pasadas dos o tres décadas (Ben-Ya`acov *et al.*, 1992), debido a factores como el cambio en el uso del suelo, utilización de la madera, enfermedades del suelo, sequías e incendios, factores que han traído gran devastación en México. La deforestación se ha acelerado dramáticamente en los trópicos. A las tasas actuales, los países en desarrollo perderán cerca del 40% de su cubierta forestal entre 1978 y la vuelta del siglo (Westboy, 1989). Cerca de 380,000 hectáreas de bosque y selva se destruyeron durante 1989 y solamente en Chiapas 50,000 hectáreas fueron devastadas por incendios. Todos estos resultados llevan a lo que se conoce como erosión genética, por lo que existe la necesidad urgente de rescatar los recursos genéticos que están en peligro de desaparecer y que puedan utilizarse en el futuro antes que estos recursos se pierdan para siempre.

4.2 Taxonomía del aguacate

Pertenece a las Lauráceas, familia con gran importancia económica, productora de aceites esenciales, madera y especias.

Cuadro 1. Clasificación taxonómica según el Sistema Integrado de Información Taxonómica.

	Reino	Plantae
Subreino		Viridiplantae
Infrareino		Streptophyta
Superdivisión		Embryophyta
División		Tracheophyta
Subdivisión		Spermatophytina
Clase		Magnoilopsida
Superorden		Magnolianaes
Orden		Lurales
Familia		Luraceae
Género		Persea Mill
Especie		Persea americana Mill

Fuente: (ITIS, 2015).

Es una planta perenne, puede llegar a medir más de 10 metros de altura, su fruto es una baya carnosa, con una sola semilla, grande, y su forma puede variar de acuerdo a la variedad entre oblata, esferoide, esferoide alto, elipsoide, obovado-angosto, obovado, claviforme, romboide, periforme, ovoide o globoso (Bernal & Díaz, 2008).

Es un fruto climatérico presentando una tasa de respiración acelerada después de recolectado, su maduración completa no se da en el árbol por eso se separa de este manualmente cortando su pedúnculo, conservando una pequeña porción de este para no acelerar su maduración y evitar daños por patógenos, alcanzando su madurez comercial después de haber sido cosechado de acuerdo a las exigencias del mercado quien tiene en cuenta sus características sensoriales (Bernal & Diaz, 2008).

4.3 Descripción botánica del aguacate (*Persea americana* Mill.)

El árbol del Aguacate *P. americana* Mill puede ser erecto, usualmente de 9 metros, pero puede ser hasta de 18 metros o más, con un tronco de 30 a 60 centímetros de diámetro (más grueso en árboles muy viejos); o puede ser bajo y ancho, con ramas que se abren desde muy cerca del suelo. Aunque suele ser de hoja perenne, deshoja un poco en la estación seca y cuando florece; las hojas son alternas, verde oscuras y de superficie lustrosa, blanquizcas en la parte posterior. Su forma es variada (lanceoladas, elípticas, ovals, ovoides o mezcladas), de 7.5 a 40 cm de largo, aromatzadas. Sus flores, pequeñas y verde pálido o verde amarillo, se dan profusamente en racimos cerca de la punta de las ramas. No tienen pétalos, sino 2 espirales de tres lóbulos periantrales, más o menos pubescentes, y 9 estambres con dos glándulas anaranjadas de néctar en la base (Calabrese, 1992).

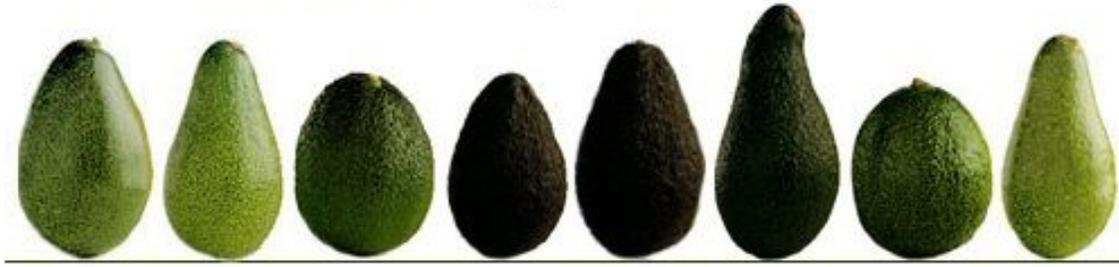


Figura 1. Variedades en la forma del fruto del árbol de aguacate (Fuente: <http://www.agromatica.es/variedades-de-aguacate/>).

4.4 Diversidad de especies de aguacate

4.4.1 Razas de aguacate

El término “raza” se utiliza porque éstas presentan características específicas, que se propagan y fijan. Durante la época de la conquista, los cronistas españoles destacaron las propiedades alimenticias del aguacate y la gran diversidad existente, éstas permitieron al ilustre horticultor Wilson Popenoe agruparlas por caracteres comunes en tres razas:

4.4.2 Mexicana (*P. americana* var. *drymifolia*)

Originaria de los valles y altiplanos de México Central, con clima subtropical a templado y alturas de 1,500 hasta más de 2,000 msnm, es resistente al frío, de fruto generalmente pequeño, de 30 a 80 mm de largo, con pesos de 90 a 180 g, de forma piriforme, de cáscara delgada y de superficie exterior lisa. Comúnmente de color verde, pero alcanza tonalidades más oscuras entre morado y negro. La pulpa tiene un alto contenido de grasa (10 a 25 %), que en su madurez tiene un sabor de nuez.

Las hojas son más pequeñas que las otras dos razas, las cuales, junto con los tallos tiernos tienen glándulas esenciales, cuyo contenido es una esencia de olor parecido al anís, lo cual se nota al estrujar las hojas con la mano. La semilla es de tamaño pequeño (FHA, 2008).

4.4.3 Guatemalteca (*Persea americana* var. *guatemalis*)

Originaria del Centro - Occidente de Guatemala, con alturas entre 1,000 y 2,000 msnm, presenta cáscara gruesa, resistente al transporte del fruto. Se caracteriza por ser menos resistente al frío que la raza mexicana, con frutos de tamaño mediano a gran tamaño de 7,5 a 25 cm de largo y peso de 120 a 1500 g. Los frutos tienen forma esférica, ovalada o piriforme, el grosor del epicarpio oscila entre 2 y 12 mm y de consistencia correosa, dura hasta casi leñosa en algunas variedades, su superficie es quebradiza y a veces granulada y de color verde opaco, incluso morado (FHA, 2008). La pulpa es algo fibrosa con alto contenido de grasa (18 a 20 %), que en su madurez el sabor varía de mantequilla al de nuez. La semilla o hueso es de gran tamaño y suele llenar toda la cavidad que la contiene. Las hojas son de mayor tamaño que las de la raza mexicana, sin olor a anís.

4.4.4 Antillana (*Persea americana* var. *americana*)

Originaria de la costa del Pacífico de Chiapas (México), Guatemala, El Salvador, Honduras, Nicaragua, Costa Rica y Panamá, en alturas menores a 1,000 msnm, susceptible al frío, resistente a salinidad y clorosis. El período de flor a formación del fruto es bastante corto. El pedúnculo es alargado en forma de cabeza de clavo.

Adaptada a las tierras bajas y temperaturas altas, sus frutos son de tamaño mediano a grande (7,5 a 25 cm de longitud), con peso entre 110 gr, y 1,100 gr., Los frutos presentan formas entre ovalados y piriformes, cáscara delgada pero más dura que los de la raza Mexicana de color verde claro a amarillo rojizo, la pulpa presenta un contenido bajo de grasa (5 a 15 %) y de sabor desde acuoso-insípido hasta el de mantequilla. El hueso de gran tamaño no suele llenar la cavidad que lo contiene (FHA, 2008).

Entre las características distintivas entre las razas se toma en cuenta: La época de floración, la época de recolección, el periodo de floración-recolección, el peso y tipo de corteza de la fruta, el contenido de aceite de la pulpa y la resistencia al frío, tanto en las plantas jóvenes como en las adultas (FHA, 2008). Otras características a tener en cuenta son: el olor que caracteriza las hojas, ya sea el olor intenso a anís o directamente inodoras, la forma del pedúnculo y el tipo de grupo floral.

4.5 Importancia del aguacate

4.5.1 Importancia económica

En 2010, los principales países importadores de aguacate fueron los Estados Unidos (47.1%), Francia (12.8%), Japón (6.1%) y Canadá (4.9%), los cuales concentran 70.8% de la importación total (Secretaría de Economía). Al comparar 2010 con el año previo destaca que Estados Unidos reduce su participación en 25%, mientras que, en ese mismo periodo de comparación, Francia aumenta su participación 13%.

Por su parte, entre los principales países exportadores de aguacate se encuentra México, el cual participa con el 51.4% del mercado, le siguen en menor medida Israel (11.6%), Perú (9.4%) y Sudáfrica (8.0%) (Secretaría de Economía, 2012).

4.5.2 Importancia nutrimental

Actualmente se reconoce como “alimento funcional”, además de ser una fuente de energía y vitaminas, si se considera como alimento funcional aquel ya sea fresco o procesado del que se diga que tiene propiedades promotoras de la salud o preventivas de enfermedades más allá de sus funciones básicas nutricionales de aportar nutrimentos (se menciona que estos alimentos pueden provenir de fuentes genéticamente modificadas).

De acuerdo con el Instituto de Nutraceuticos (The Nutraceuticals Institute) los nutraceuticos (compuestos a los que comúnmente también se les conoce como fitoquímicos o alimentos funcionales) son compuestos químicos bioactivos naturales que tienen propiedades medicinales o que promueven la salud o previenen la enfermedad (Wildman, 2001). En este sentido, la pulpa de aguacate contiene antioxidantes, como la vitamina E o tocoferoles (4.31 UI/100 g), así como glutatión (17.7 mg/100g), los cuales actúan como estabilizador de las membranas celulares y neutralizan los radicales libres causantes del estrés oxidativo celular (envejecimiento, enfermedades degenerativas, cáncer) de acuerdo con (Gómez, 1991; Calderón, 2006). Por otra parte, también se ha mencionado que es fuente considerable de luteína (248 mg/100 g), carotenoide que ayuda a proteger el ojo de

enfermedades como cataratas. La cantidad de β -sitosterol en esta fruta es similar al encontrado en la soya y olivas (aceitunas), el cual se ha relacionado con la inhibición de tumores cancerosos (Gómez, 1991).

Otros componentes nutracéuticos en el aguacate es una mezcla de lípidos de alta calidad: como son los ácidos grasos ω -3, ω -6, y ácidos ω -9; además de contener lecitina, un fosfolípido necesario para el metabolismo de las grasas (Berg & Scora, 1992), por lo que, se reporta que una dieta enriquecida con aguacate, reduce significativamente las lipoproteínas de baja densidad (LDL) o "colesterol malo", y de colesterol total en pacientes con altos niveles de colesterol (Carranza *et al.*, 1997). La lecitina previene efectivamente los accidentes cardiovasculares como infartos y derrames cerebrales.

Lerman *et al* (1994, citados por Gómez 1991) concluyeron que, en pacientes diabéticos no dependientes de insulina, era benéfico sustituir hidratos de carbono por lípidos como los que se encuentran en el aguacate, lo que favorece la reducción de triglicéridos en sangre. Por su parte (Carranza *et al.*, 1997) mencionaron que una dieta enriquecida con aguacate (alta en ácidos grasos monoinsaturados), en pacientes con diabetes mellitus no dependientes de insulina, mantiene un adecuado control glucémico. Por otra parte, se ha demostrado que el aguacate ayuda a evitar la hiperlipidemia sin los efectos indeseables que provocan las dietas bajas en grasa saturada sobre las concentraciones del colesterol LDL y triglicéridos (Alvizouri *et al.*, 1992).

En otros estudios se ha señalado que el aguacate es una fruta libre de colesterol a

pesar de ser una importante fuente de energía. De acuerdo con la Comisión Californiana del Aguacate, éste contiene más potasio que un plátano, y aporta aproximadamente el 10% de los requerimientos diarios de hierro de un adulto; además de proveer altas cantidades de β - carotenos y vitaminas B6, C, E, ácido fólico y cobre (Baustista & Ortega, 2002).

Por todo lo mencionado hasta aquí se puede concluir que la inclusión diaria de aguacate en la dieta de las personas, puede traer beneficios a la salud si se tiene en cuenta que ningún alimento es 100% completo, y que por sí solo no proporcionará todos los compuestos nutritivos y nutracéuticos requeridos (a excepción de la leche materna), por lo que, la dieta deberá de incluir diferentes alimentos de todos los grupos y de esta manera integrar una alimentación adecuada y suficiente.

4.5.3 Usos Industriales

Presenta una variada posibilidad de usos como producto industrializado entre otros: pulpas para productos untables, aceites, tradicionalmente para fines cosméticos y farmacéuticos pero también tiene uso comestible como aceite extrafino (Secretaría de Economía, 2012).

El puré de aguacate congelado ha tenido un mayor desplazamiento pues se utiliza como materia prima en diversos procesos, tanto cosméticos como comestibles. El aguacate deshidratado para consumo es una buena alternativa de industrialización,

de esta manera su vida es superior a la presentación en fresco. A pesar del liderazgo que México tiene en este producto su uso industrial es muy restringido, con solo 16% de la producción (Secretaría de Economía, 2012).

4.6 Producción de aguacate

4.6.1 Mundial

En el ranking mundial, los principales 20 países productores de aguacate, produjeron 3.5 millones de toneladas (mt). México destaca como el principal productor con 1.2 mt. Cantidad que representa el 35% de la producción de este grupo. La mayor producción de aguacate se concentra en 12 países del continente americano. Chile es el segundo país productor, su producción alcanza 328 mil toneladas. Destaca también Indonesia y República Dominicana como importantes productores (SAGARPA, 2011).

Esta distribución de la producción mundial es resultado de las condiciones climatológicas y edafológicas que prevalecen en el Continente Americano, ya que son las ideales para que este fruto pueda alcanzar su madurez y pueda alcanzar el óptimo desarrollo que requiere en el mercado de exportación (SAGARPA, 2011).

En lo que concierne al comercio internacional, las exportaciones de aguacate de los países que se encuentran en el top mundial alcanzaron 688 mil toneladas en el 2008.

En esta lista, México ocupó el primer lugar, exportando 270 mil toneladas. Chile el segundo lugar con 84 mil toneladas. Las exportaciones mundiales de aguacate

mexicano se han incrementado en los últimos años por la creciente demanda en algunos países y la apertura comercial. Perú, Sudáfrica, España y Países Bajos, juntos representan una tercera parte de las exportaciones mundiales que representa el 34% (SAGARPA, 2011). El resto de exportadores lo conforman países como: Francia, EE.UU., Alemania, Bélgica, entre otros, los cuales se suman a la lista de los principales países exportadores en el mercado del aguacate.

4.6.2 Nacional

En el 2010 la producción total de aguacate en la República Mexicana reportó un poco más de 1 millón 77 mil toneladas. La mayor producción se focaliza en el Estado de Michoacán, lugar donde se concentran 920 mil toneladas de la fruta. Michoacán es el Estado que reporta 85% del total de la producción, siendo el líder productor. Ofertando en promedio 76 mil toneladas mensuales que se destinan al mercado internacional y al mercado doméstico. Jalisco produce 29 mil toneladas, las cuales representan el 3% de la producción nacional. Morelos, Nayarit, México, Guerrero y Yucatán en conjunto producen 97 mil toneladas, las cuales representan el 8% de la producción total (SAGARPA, 2011).



Figura 2. Mapa de producción de aguacate en México (Fuente: SAGARPA, 2011).

La producción nacional de aguacate en la última década ha tenido un comportamiento positivo. En los últimos diez años, el total de la producción superó los 10 mt, con un crecimiento promedio anual de 2%. El 2009 fue un año con mayor producción, con 1 millón 230 mil toneladas (SAGARPA, 2011). Las excelentes condiciones climatológicas y edafológicas han propiciado que el aguacate se adapte rápidamente y se obtengan buenos resultados en su producción.

La producción de aguacate en la República Mexicana es realizada casi en su totalidad por el estado de Michoacán. En el 2010, los meses que se reportan con máxima producción fueron: abril, con el 12%, mayo el 11%, junio el 14%, y julio con el 12% de la producción total. En los meses posteriores el rendimiento en la producción va disminuyendo gradualmente, hasta llegar a 29 mil toneladas en el mes de diciembre. Siendo el mes que reportó el mínimo de producción. Los meses restantes representan el 51% de la producción. En menor escala, destaca la

producción de Jalisco y Nayarit en el mes de septiembre y de Morelos los meses de mayo y octubre (SAGARPA, 2011).

4.6.3 Estatal

El cultivo de aguacate en Nuevo León se realiza solamente en nueve de los 51 municipios que conforman la entidad, siendo estos: Aramberri, Rayones, General Zaragoza, Sabinas Hidalgo, Bustamante, Galeana, Allende, Cadereyta Jiménez y Santa Catarina (Moreno-Limón *et al.*, 2010).

El volumen de producción de aguacate en el 2008 fue de 2611 toneladas, volumen que en el periodo del 2001 a 2008 disminuyó significativamente al pasar de 4258 a 2611 toneladas respectivamente, representando una pérdida del 33.68%, es decir, 1646.7 toneladas (Moreno-Limón *et al.*, 2010).

El rendimiento promedio de aguacate en el estado para 2008 fue de 3.47 toneladas por hectárea, presentando un decremento promedio de 2.2 ton/ha en el periodo comprendido entre el 2001 y 2008. El rendimiento estatal se encuentra por debajo de los municipios con los más altos valores, donde destacan Rayones con 7 ton/ha, Allende con 6 ton/ha y Cadereyta Jiménez con 5 ton/ha (Moreno-Limón *et al.*, 2010).

El valor de la producción del cultivo de aguacate muestra un decremento del 36.5% al pasar de 27,411 miles de pesos en el 2001 a 17,406 miles de pesos en el 2008. Sin embargo, es importante destacar que entre los años de 2005 a 2006 se presentó un incremento de 13,285 miles de pesos (Moreno-Limón *et al.*, 2010).

4.7 Importancia del uso de aguacate cultivares mexicanos

4.7.1 Propagación tradicional

El aguacate se puede propagar por semilla o por injerto. La propagación por semilla no es recomendable para plantaciones comerciales debido a la gran variabilidad que ocurre en producción y calidad de fruto (Nodals *et al.*, 2005).

La propagación por injerto es el método más apropiado para reproducir las variedades seleccionadas para cultivo comercial, ya que los árboles injertados son uniformes en cuanto a la calidad, forma y tamaño de la fruta. Las semillas deben provenir de frutas sanas, de buen tamaño, cosechadas directamente del árbol. Su viabilidad dura hasta tres semanas después de extraída de la fruta. Es recomendable cortar la parte angosta de la semilla, en un tramo de una cuarta parte del largo total, para ayudar así a la salida del brote y para hacer una primera selección, ya que el corte permite eliminar las semillas que no presenten el color natural blanco amarillento, debido a podredumbre, lesiones o cualquier otro daño. Inmediatamente después de cortadas, se siembran en el semillero previamente preparado colocándolas sobre el extremo ancho y plano de modo que la parte cortada quede hacia arriba. Las semillas empiezan a brotar aproximadamente treinta días después de sembradas. Generalmente las plantas están listas para ser trasplantadas al vivero, a los treinta días después de la germinación (Nodals *et al.*, 2005).

4.7.2 Porta injertos

En general las huertas comerciales de aguacate en México se establecen con plantas injertadas, preferentemente por enchapado lateral, sobre porta injertos de raza Mexicana (Gallegos, 1983), sin que se lleve un estricto control sobre la fuente de la semilla usada.

Como en otros sistemas de producción frutícola, existe la necesidad de utilizar porta injertos específicos que toleren enfermedades que atacan a la raíz. Por ejemplo, en el estado de Michoacán la pudrición radical o tristeza del aguacatero causada por *Phytophthora cinnamomi* Rands ocasionó daños severos a por lo menos 100,000 árboles de aguacatero, causando pérdidas económicas para los productores de 32'700 000 pesos (Vidales & Álcantar, 1994).

4.7.3 Variabilidad genética

La biodiversidad del mundo es un producto de millones de años de evolución y las fuerzas evolutivas que nos han conducido al estado actual siguen operando y crearán la biodiversidad del futuro (o su ausencia). La biodiversidad está compuesta de los recursos genéticos del mundo y para manejarlos efectivamente tenemos que poder medir sus niveles y patrones de variación. La mayor parte de la gente piensa que la biodiversidad es el número de especies (riqueza de especies) en un área, lo cual ciertamente es un componente muy importante de la variación, pero hay otros también (Frankel 1983; Frankel *et al.* 1995).

Una gran cantidad de la variación genética reside dentro de especies, entre y dentro de poblaciones. Los procesos evolutivos que moldean la variación dentro de especies son los mismos que crean la diversidad entre especies. Los niveles de variación genética dentro de especies y poblaciones nos interesan en el manejo de recursos genéticos, porque la variación sirve como materia prima de la evolución y está relacionada con la habilidad de las poblaciones para adaptarse a cambios ambientales. Los patrones de variación dentro de especies nos interesan, ya que determinan la manera en que explotamos y conservamos estos recursos. Si hay pocas diferencias entre poblaciones, la pérdida de cualquier población no es tan grave debido a que no perdemos una unidad única genéticamente. Por otra parte, si las poblaciones son muy diferenciadas, cada una representa un recurso único y tendremos que mantener más poblaciones en programas de conservación y mejoramiento, algo que nos costará más (Fisher, 1930).

4.7.4 Conservación de germoplasma

La conservación de germoplasma vegetal como actividad científica fue propuesta en los años 70 del siglo XX con el objetivo de prevenir la erosión genética y mejorar la productividad agrícola de muchas especies a partir de la conservación de diferentes especies y genes de interés. Existen dos estrategias básicas para la conservación de germoplasma vegetal, la conservación *in situ* y la conservación *ex situ* (Nodarse *et al.*, 1998).

En la conservación *in situ* las especies se mantienen en su hábitat natural, generalmente en parques nacionales, reservas biológicas y reservas ecológicas. Mientras que, en la conservación *ex situ* las especies se preservan fuera de su

hábitat natural, en bancos de semillas botánicas, bancos de plantas en campo o en bancos de plantas *in vitro* (García-Águila *et al.*, 2013).

Los bancos de semillas botánicas resultan de gran utilidad en especies que se propagan sexualmente y cuyas semillas se mantienen viables durante un largo período de almacenamiento, pero no deben aplicarse para conservar especies de plantas con semillas botánicas de corta supervivencia, ni pueden emplearse en caso de trabajar con plantas auto incompatibles, o plantas de propagación vegetativa obligada. En estos casos, la diversidad genética de estas especies se puede conservar mediante bancos de plantas en campo o mediante técnicas de conservación *in vitro* (Graudal *et al.*, 1997).

Los bancos en condiciones de campo tienen como limitante que se necesitan grandes extensiones de tierra, los costos por mantenimientos asociados a las labores agro técnicas son altos, se hace necesario controlar plagas y enfermedades y además son vulnerables a los desastres climáticos. Es por ello, que el desarrollo de nuevas técnicas de conservación, han permitido preservar mejor los recursos genéticos importantes para muchos países (Ortiz, 2000).

En particular, los avances alcanzados en el cultivo *in vitro* en diferentes especies vegetales dieron la posibilidad de desarrollar nuevas alternativas para la conservación *ex situ*, al permitir disponer de suficientes individuos en períodos de tiempo relativamente cortos y facilitar la manipulación del material vegetal al ser plantas con un desarrollo fisiológico homogéneo. Desde entonces, la conservación *in vitro* de germoplasma vegetal constituyó una herramienta de trabajo que apoyó

la conservación de semillas botánicas y la conservación en campo, ya que permitió tener duplicados seguros de aquellos genotipos de particular interés (Engelmann y Takagi, 2000).

4.7.5 Bancos de cultivo *in vitro*

Si bien la conservación *ex situ* en bancos de semillas constituye la alternativa más utilizada, en ciertas especies surgen problemas de propagación o conservación que impiden o dificultan el uso de dicha solución. Este sería el caso de: a) especies con semillas recalcitrantes; b) especies que no producen semilla, con baja o nula fertilidad o con producción reducida de semillas o de polen (Pence, 1999); c) clones con elevado grado de heterocigosis que han sido seleccionados por sus características en una población natural y que deben ser mantenidos mediante propagación vegetativa. La conservación por semilla permite el almacenamiento de los genes del clon, pero puede resultar difícil recuperar la combinación heterocigótica para la que fueron seleccionados los clones (Withers, 1985); d) especies perennes con ciclos de vida muy largos que no producen semilla hasta cierta edad. Estas especies se suelen propagar vegetativamente para acortar la entrada en producción, aunque posean semillas viables y con capacidad de ser conservadas en un banco de germoplasma; e) especies con una población natural extremadamente reducida donde la mera recolección de semillas pueda afectar a la supervivencia de la población (Clemente, 1999). En estos casos, las técnicas de almacenamiento o conservación *in vitro* constituyen una alternativa válida a la conservación de semillas de especies raras o amenazadas.

Los protocolos de conservación *in vitro* se atienen, en todos los casos, a las siguientes etapas: a) obtención del explante; b) establecimiento del cultivo; c) almacenamiento; d) recuperación de un cultivo viable; e) regeneración de plantas (Dodds, 1991). En este protocolo el almacenamiento es normalmente la etapa que implica más costos, tanto en equipamiento como en personal. En el caso de que el cultivo se mantenga en condiciones normales (crecimiento continuo), los repicados deberán hacerse en intervalos que oscilarán de varios días a varios meses, dependiendo del tipo de cultivo y de las especies. Además, en estas circunstancias, los subcultivos están expuestos a un continuo riesgo de pérdidas por accidente o contaminación, y el riesgo de alteraciones genéticas (variación somaclonal) (Phillips *et al.*, 1994; Lynch, 1999; Pence, 1999).

El periodo comprendido entre repicados puede extenderse induciendo un crecimiento limitado del cultivo mediante reducción de la temperatura y/o iluminación, estrés osmótico, reducción de la presión parcial de oxígeno, desecación del material vegetal, o alteración de los medios de cultivo, eliminando componentes nutritivos o incorporando retardantes de crecimiento. Entre estas alternativas, la utilización de bajas temperaturas y la manipulación de los componentes del medio de cultivo son las más aconsejables desde un punto de vista práctico, por su eficacia y simplicidad (Lynch, 1999).

4.8 Importancia de la biotecnología vegetal

La Biotecnología es el conjunto de técnicas que utilizan organismos vivos o partes de ellos para obtener productos o modificarlos, para mejorar plantas o animales, o para desarrollar microorganismos con fines bien determinados, es decir, para la obtención de bienes y servicios. La biotecnología vegetal es la específica de las plantas.

Las promesas de la biotecnología vegetal han ido aumentando conforme se ha avanzado en la investigación, las más importantes para el desarrollo del medioambiente son: aumentar la productividad y reducir costes, generar innovaciones y mejoras en los alimentos y conducir a prácticas agrícolas más ecológicas o contribuir a la agricultura sostenible, que utiliza los recursos con respeto al medio ambiente y sin hipotecar a las generaciones futuras (Iáñez, E. 2000).

Algunas aplicaciones de la biotecnología vegetal son las siguientes:

- Cultivo in vitro: por el que se puede proteger a especies cercanas a través de cruzamientos convencionales y por retrocruzamiento podemos quedarnos sólo con el gen deseado.
- Creando resistencia a hongos mediante la sobreexpresión de los genes que son tóxicos para el patógeno, genes que neutralicen sus componentes,

mejoren las defensas estructurales, participen en las vías de señalización de las defensas, es decir, que preparen con anterioridad a la planta para la llegada del patógeno, genes que sean de resistencia.

- Obteniendo resistencia a las bacterias: se introducen los genes que produzcan enzimas que maten a la bacteria. También lo podemos conseguir haciendo a la planta insensible a la toxina bacteriana. Aumentando sus defensas naturales por sobreexpresión de genes o provocando una muerte celular artificial en el sitio de la infección (Benitez, 2005).

4.9 Micropropagación *in vitro*

La micropropagación consiste en propagar un genotipo a gran escala a través del empleo de técnicas de cultivo de tejidos. El cultivo es así una herramienta muy útil en los programas de mejoramiento, ya que tiene el potencial de producir plantas de calidad uniforme a escala comercial, a partir de un genotipo selecto y con una tasa de multiplicación ilimitada. Esto es posible gracias a la propiedad totipotencial que tienen las células vegetales; esto es la capacidad de regenerar una planta completa cuando están sujetas a los estímulos adecuados. Así, las células somáticas de cualquier tejido podrían formar tallos, raíces o embriones somáticos de acuerdo con la competencia que posean y al estímulo que reciban (Echenique *et al.*, 2004).

Esta regeneración ocurre en fases consecutivas: la fase de dediferenciación, donde las células se vuelven competentes para responder ante cualquier estímulo organogénico o embriogénico; la fase de inducción, donde las células se determinan

para formar un órgano o embrión, y finalmente la fase de realización, donde se forma el órgano o embrión propiamente dicho. Estas fases están directamente afectadas por el balance hormonal del medio de cultivo, por lo cual la optimización de los protocolos de regeneración debe realizarse teniendo en cuenta los requerimientos intrínsecos de cada genotipo en cada fase del cultivo. Así, en general, puede decirse que el proceso de des diferenciación generalmente es promovido por una auxina, la fase de inducción por un balance hormonal específico del órgano o embrión a formarse y la fase de realización, por una disminución de la concentración hormonal en el medio de cultivo (Echenique *et al.*, 2004).

Las técnicas de cultivos asépticos han contribuido no sólo a un mejor entendimiento de los eventos de diferenciación celular, sino a un mejor aprovechamiento de tales eventos en la explotación más eficiente de las plantas. En este último aspecto vale la pena mencionar los siguientes usos de las técnicas del cultivo *in vitro*: a) mejoramiento genético; b) obtención de plantas libres de virus y otros patógenos; c) conservación de germoplasma; y d) micropropagación.

El uso de alternativas biotecnológicas puede ser de gran interés en programas de mejora de aguacate (Pliego-Alfaro *et al.*, 1992). La micropropagación sería de utilidad para producción a gran escala de plantas clonales, mientras que la inducción de variantes somaclonales podría ser un camino para seleccionar material tolerante a patógenos de suelo (Van Den Bulk, 1991) especialmente, si tenemos en cuenta que la tolerancia a *P. cinnamomi* ocurre a nivel celular de forma similar a lo observado en la planta completa (Phillips *et al.*, 1994).

La multiplicación de plantas mediante proliferación de brotes axilares es el método de micropropagación más fiable en términos de estabilidad genética del material obtenido (George, 1993). En especies leñosas, incluido el aguacate, la capacidad morfogénica es mayor en material juvenil que en adulto (Arriaga *et al.*, 1991; Pliego-Alfaro *et al.*, 1987), por eso, al tratar de poner a punto un método de micropropagación en este tipo de plantas, inicialmente se suelen llevar a cabo experimentos con material juvenil y posteriormente, los resultados obtenidos sirven de base para la multiplicación de explantes de origen adulto (Pliego-Alfaro *et al.*, 1987).

4.9.1 Etapa 1: Establecimiento del cultivo *in vitro*

El objetivo de esta etapa es establecer cultivos viables y axénicos. El éxito está determinado por la edad de la planta donante, la edad fisiológica, el estado de desarrollo y el tamaño del explantes.

Según Echenique *et al.* (2004), en esta etapa los principales procesos a controlar son la selección, el aislamiento y la esterilización de los explantes. Los materiales que demuestran tener mayor capacidad regenerativa son los obtenidos de tejidos meristemáticos jóvenes, sean yemas axilares o adventicias, embriones o semillas en plantas herbáceas y aquellos tejidos meristemáticos que determinan el crecimiento en grosor, como el cambium en las plantas leñosas. En este sentido, es importante señalar que el empleo de yemas adventicias (también llamadas yemas

formadas de *novo*) está asociado con una mayor probabilidad de ocurrencia de variantes somaclonales respecto de los sistemas de propagación, basados en la regeneración a partir de yemas axilares o embriones somáticos.

La obtención de cultivos axénicos puede lograrse trabajando tanto sobre aspectos preventivos como curativos. Una acción preventiva la constituye el empleo de métodos de verificación de patógenos en los explantes. Esto puede realizarse mediante análisis específicos para las enfermedades del cultivo, tales como DAS-ELISA o PCR, análisis generales para patógenos cultivables como el empleo de medios de cultivo para el crecimiento de bacterias y hongos y métodos específicos para la detección e identificación de patógenos intracelulares como virus, viroides y bacterias. La realización de estos análisis directamente sobre las plantas donantes, previo establecimiento, presenta dos ventajas. En primer lugar, el empleo de tejidos maduros permite visualizar los síntomas más marcados de la enfermedad; en segundo lugar, la carga de patógenos es mayor y por lo tanto la precisión del sistema de detección aumenta. Por otro lado, las plantas enfermas pueden tratarse con técnicas adecuadas para la eliminación de patógenos como la termoterapia, la quimioterapia a través de la aplicación de antibióticos, desinfectantes, antivirales y el cultivo de meristemas (Echenique *et al.*, 2004).

La desinfección superficial incluye varios pasos: el lavado de los explantes con agua corriente, el empleo de etanol al 70% por 1 minuto, seguido de concentraciones variables de hipoclorito de sodio (0,5 a 1,5% de cloro activo) con unas gotas de tensoactivos para favorecer su penetración y actividad. Posteriormente, los

explantes deben ser enjuagados al menos tres veces con agua destilada estéril. Algunos patógenos permanecen latentes y se expresan cuando son transferidos a un medio de cultivo nuevo. En general, estos patógenos incluyen los patógenos superficiales del material vegetal, los patógenos endógenos y los patógenos propios del manejo en laboratorio. En la Etapa 1 también pueden observarse infecciones por bacterias y hongos asociados a trips que sobreviven a los tratamientos de esterilización y por patógenos endógenos latentes dentro del sistema vascular, resultado de una esterilización inefectiva de los explantes. Estos patógenos latentes podrían manejarse mediante el empleo de bacteriostáticos o antibióticos en el medio de cultivo (Echenique *et al.*, 2004).

4.9.2 Etapa 2: Multiplicación

El objetivo de esta etapa es mantener y aumentar la cantidad de brotes para los nuevos ciclos de multiplicación sucesivos y poder destinar parte de ellos a la siguiente etapa de producción (enraizamiento, bulbificación, etc.). Es importante señalar que, en esta etapa, cualquiera que sea la vía de regeneración empleada, es conveniente evitar la formación de callo para disminuir el riesgo de variación somaclonal. En esta etapa, los medios de cultivo, los reguladores de crecimiento como auxinas, citocininas y ácido giberélico y las condiciones de crecimiento juegan un papel crítico sobre la multiplicación clonal de los explantes (Minorsky, 2001).

Ambas vías de regeneración, organogénesis y embriogénesis, pueden darse en forma directa o indirecta. Esta última implica la formación de callo. En general, la organogénesis conduce a la producción de vástagos unipolares que enraízan en etapas sucesivas, mientras que por embriogénesis somática se forman embriones bipolares a través de etapas ontogénicas similares a la embriogénesis cigótica (Echenique *et al.*, 2004).

La organogénesis puede darse por inducción de yemas axilares o adventicias. La inducción de yemas axilares comprende la multiplicación de yemas preformadas, usualmente sin formación de callo. La inducción de yemas adventicias comprende la inducción de tejido meristemático localizado mediante un tratamiento con reguladores de crecimiento, conduciendo a la diferenciación del primordio y desarrollo del vástago, esto último generalmente en ausencia del regulador de crecimiento que indujo la organogénesis. La principal desventaja del primer método es que el número de yemas axilares por explante limita la cantidad de vástagos. Esto se ve compensado, sin embargo, por un aumento en la tasa de multiplicación con los sucesivos subcultivos. La formación de yemas adventicias ofrece mayor potencial para la producción de vástagos, ya que la inducción de vástagos ocurre en sitios distintos al de los meristemas (Echenique *et al.*, 2004).

La embriogénesis somática es una vía más conveniente porque permite saltar las etapas de formación de yemas y enraizamiento regenerando plantas en una forma mucho más rápida y eficiente, disminuyendo además el riesgo de variación somaclonal. A su vez, la disponibilidad de protocolos para la obtención de

embriones somáticos es clave para la automatización de la micropropagación y la consecuente reducción de costos para su implementación a escala comercial. Los biorreactores son equipos que contienen aproximadamente 2 litros de medio de cultivo líquido estéril y donde los embriones somáticos pueden regenerar y madurar a partir de suspensiones celulares, sustentados por la circulación permanente de nutrientes y de aire (Echenique *et al.*, 2004).

4.9.3 Etapa 3: Enraizamiento

En esta etapa se produce la formación de raíces adventicias. En las especies herbáceas es relativamente fácil mientras que en las especies leñosas es complicado por su limitada capacidad rizogénica. El enraizamiento puede realizarse tanto en condiciones *in vitro* como *ex vitro*. En el primer caso pueden emplearse varios tipos de sustratos y reguladores de crecimiento (auxinas) para promover la rizogénesis. Los sustratos incluyen: medio solidificado con agar, perlita y/o vermiculita humedecidas con medio nutritivo o agua. En un medio solidificado con agar, los nutrientes se reducen de 1/2 a 1/4 de la composición original, y la sacarosa se reduce a una concentración final de 1-2%. Medios con baja concentración salina, como el WPM (Lloyd & Mccown, 1980) y GD (Gresshoff & Doy, 1972). Comúnmente, a fin de proceder a su enraizamiento, los vástagos de buen tamaño provenientes de la etapa de multiplicación y provistos de al menos 4-5 yemas, se colocan durante periodos cortos en soluciones con concentraciones elevadas de auxinas.

4.10 Hormonas vegetales

Las hormonas vegetales o también llamadas fitohormonas fueron descubiertas a mediados del siglo 19 y extensivamente divulgadas por Charles Darwin, ampliando el conocimiento de sus efectos en la observación del fototropismo de las plantas. Las fitohormonas se producen en pequeñas cantidades en diferentes tejidos vegetales y son más sencillas molecularmente (González, 2010).

Los cinco principales grupos de hormonas vegetales son: Auxinas, citoquininas, giberelinas, etileno y ácido abscisico (ABA) (Cuadro 2). La mayoría de los procesos fisiológicos parecen estar gobernados por la interacción de compuestos pertenecientes a dos o más de estos grupos, ya sea en forma simultánea, o en el orden secuencial. Hay otros compuestos que se sintetizan la forma natural en la planta, que no han alcanzado la denominación de hormona y que son capaces, en ciertos casos, de alterar el desarrollo de una planta, es decir, tienen propiedades reguladoras. Dentro de estas sustancias se pueden citar las poliamidas, los jasmonatos, el ácido salicílico y los brasinoesteroides (Herrera *et al.*, 2006).

Por lo común, todas estas hormonas se unen a uno o más receptores y desencadenan una respuesta solo después de que la interacción entre la hormona y el receptor genera una cascada de eventos, muchos de los cuales implican la activación o la desactivación de proteínas. Estos procesos conforman una red de mensajes secundarios que amplifican la señal recibida y provocan una respuesta específica (Curtis y Schnek, 2006).

Cuadro 2. Lugares de síntesis de los reguladores de crecimiento (Fuente: Salisbury y Ross, 1994).

Regulador de crecimiento	Sitio de síntesis
Auxinas	<ul style="list-style-type: none"> • Polen, meristemos, primordios foliares • Hojas jóvenes • Semillas y frutos en expansión
Giberelinas	<ul style="list-style-type: none"> • Semillas en desarrollo • Brotes en activo crecimiento • Raíces, frutos • Tejidos seminales
Citoquininas	<ul style="list-style-type: none"> • Semillas en desarrollo • Brotes en activo crecimiento • Raíces, frutos • Tejidos seminales

V. MATERIALES Y METODOS

5.1 Localización del trabajo experimental

La presente investigación se realizó en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal, de la Facultad de Agronomía, Unidad Marín de la Universidad Autónoma de Nuevo León UANL, localizado en la carretera Zuazua-Marín km 17.5, durante el periodo Agosto 2014 a Diciembre 2016.

5.2 Selección del Material Vegetal

El material vegetal de aguacate de la raza Mexicana (*P. americana* var. *drymifolia*), se recolectó del municipio de Aramberri, Nuevo León, el cual se encuentra 24° 6' latitud Norte y 99° 49' longitud Oeste a una altura de 1100 msnm (INEGI, 2009). Los cultivares utilizados para el establecimiento *in vitro* fueron Rosita y Huevo de Toro, ambos se mantuvieron en condiciones de invernadero, durante el tiempo que duro la etapa de establecimiento aséptico de los cultivares, se recolectaron varetas de 3.0 a 8.0 cm de longitud de árboles en desarrollo de aproximadamente seis a siete años de edad. La preparación que reciben estos árboles es aplicando una semana antes del establecimiento aséptico, una solución de 2.0 g L⁻¹ de AGRY-GENT PLUS 800[®] (sulfato de gentamicina 2.0 %; clorhidrato de oxitetraciclina 6.0 %).



Figura 3. Árboles de aguacate de la raza mexicana (*P. americana* var. *drymifolia*) del cultivar Rosita y Huevo de Toro de 5 años de edad.

5.3 Técnica de desinfección

5.3.1 Pre-desinfección de los explantes

Con el objetivo de eliminar los agentes contaminantes superficiales de los explantes, el material vegetal fue lavado con detergente comercial y enjuagado con agua bidestilada tres veces para posteriormente ser llevados a una solución de 3 g L^{-1} , amistar (fungicida comercial), 2 g L^{-1} , oxitetraciclina (bactericida), 1.5 g L^{-1} , Benomilo (fungicida), 400 mg L^{-1} , ácido ascórbico, 400 mg L^{-1} y se dejó en agitación por 1:30 horas posteriormente se les hizo un lavado triple con agua bidestilada para eliminar los restos de la solución desinfectante para ser llevadas al proceso de desinfección.



Figura 4. Pasos generales de etapa de pre-desinfección de los explantes de aguacate.

5.3.2 Desinfección de los explantes

Bajo una cama de flujo laminar el material vegetal fue sumergido a una solución de alcohol etílico 70 % v/v durante dos tiempos (tabla) seguido de tres enjuagarán con agua bidestilada estéril. Después se sumergieron en una solución de Cloralex® (NaClO) al 35 % v/v más 12 gotas de Tween-20, 1 ml de PPM por dos tiempos (tabla) y se enjuagaron con agua destilada estéril tres veces para eliminar restos de la solución.



Figura 5. Pasos generales de etapa de desinfección de los explantes de aguacate.

5.3.3 Establecimiento aséptico de los explantes

Fueron seccionados los explantes y se extrajeron las yemas axilares de ambos cultivares, las cuales fueron sembradas en medios de cultivo MS con macronutrientes al 50% más 30 g de glucosa más vitaminas. Se colocó 1 explante por frasco y se selló con parafilm. Las unidades se incubaron bajo un diseño completamente al azar en condiciones homogéneas. Donde el modelo estadístico que se utilizó en esta investigación para la primera etapa del establecimiento aséptico, fue un diseño completamente al azar con arreglo factorial 2x2, el cual se expresa como $Y_{ij} = \mu + T_i + E_{ij}$ donde el factor A son los explantes y el factor B el tiempo en etanol C el tiempo en cloralex. Teniendo un total de 4 tratamientos con 30 repeticiones, el experimento tendrá un total de 120 unidades experimentales. Los resultados serán analizados a través de pruebas de contingencia utilizando el programa estadístico Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) versión 21. Finalmente, las unidades experimentales se incubaron en una cámara bioclimática bajo condiciones de fotoperiodo de 16 h luz y 8 h oscuridad a una temperatura de

24 ± 2 °C, las variables evaluadas fueron: asepsia, oxidación y viabilidad de los explantes después de seis semanas del establecimiento in vitro.



Figura 6. Pasos generales de etapa de establecimiento aséptico de los explantes de aguacate.

Cuadro 3. Composición del medio de cultivo (1962). Murashige y Skoog.

Ingredientes	Cantidad en g L ⁻¹
NH ₄ NO ₃	1.65
K NO ₃	1.9
Mg SO ₄ .7H ₂ O	0.37
KH ₂ PO ₄	0.17
Fe SO ₄ .7H ₂ O	0.0278
Na ₂ EDTA.2H ₂ O	0.0372
CaCl ₂ .2H ₂ O	0.44
H ₃ BO ₃	0.062
Mn SO ₄ .H ₂ O	0.0169
Zn SO ₄ .7H ₂ O	0.0086
Na ₂ MoO ₄ .2 H ₂ O	0.00025
Cu SO ₄ .5H ₂ O	0.000025
Co Cl ₂ .6H ₂ O	0.000025
KI	0.00083
Agar	7.0
Vitaminas	Cantidad en mg L ⁻¹
Ácido nicotínico	0.5
Piridoxina	0.5
Tiamina	0.1
Glicina	2.0
pH	5.7

El pH de los medios se ajustó a 5.7, esterilizado con anterioridad en autoclave a 121 °C a 15 lb de presión durante 15 minutos.

Cuadro 4. Tratamientos de desinfección en el establecimiento aséptico de yemas axilares de ambos cultivares de (*Persea americana* var. *drymifolia*).

Tratamiento	Cultivar	Agentes desinfectantes
T1	Huevo de Toro	1.0 minuto etanol/20 minutos cloralex
T2	Rosita	1.0 minuto etanol/20 minutos cloralex
T3	Huevo de Toro	2.5 minutos etanol/25 minutos cloralex
T4	Rosita	2.5 minutos etanol/25 minutos cloralex

5.4 Inducción de brotes

Fueron transferidos los brotes provenientes de la etapa de establecimiento de ambos cultivares Rosita y Huevo de toro los cuales se sembraron en el medio de cultivo MS con macronutrientes al 50%, 30 g de glucosa, vitaminas y reguladores de crecimiento (Cuadro 5), el pH de los medios se ajustó a 5.7, esterilizado con anterioridad en autoclave a 121 °C a 15 lb de presión durante 15 minutos. Concluido el establecimiento las unidades experimentales se incubaron en una cámara bioclimática bajo condiciones controladas de fotoperiodo 16 h luz y 8 h oscuridad a una temperatura de 24 ± 2 °C, regidos por un diseño completamente al azar con

arreglo factorial 2x6 donde el factor A fueron los cultivares y el factor B fueron las dosis de fitohormonas vegetales añadidas al medio, obteniendo un total de 12 tratamientos con 10 repeticiones y las variables a evaluadas fueron: número de brotes, longitud de brotes y número de hojas permaneciendo por ocho semanas en estas condiciones. Estos resultados se evaluaron a través de un análisis de varianza, procediéndose a realizar la transformación de los datos con $\sqrt{X + 1}$ y las diferencias entre las medias de los tratamientos se compararon mediante la prueba de Tukey a 95% de nivel de confianza. Los datos de esta etapa se analizaron utilizando el paquete estadístico Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) versión 21.

Cuadro 5. Dosis hormonales en la etapa de inducción de brotes en ambos cultivares de (*P. americana* var. *drymifolia*).

Tratamiento	Cultivar	Regulador de crecimiento (mg L ⁻¹)		
		BAP	AIB	Kinetina
T1	Huevo de Toro			10
T2	Huevo de Toro	0.63		
T3	Huevo de Toro	1.5		
T4	Huevo de Toro	2		
T5	Huevo de Toro	2	0.3	
T6	Huevo de Toro	2.5		
T7	Rosita			10
T8	Rosita	0.63		
T9	Rosita	1.5		
T10	Rosita	2		
T11	Rosita	2	0.3	
T12	Rosita	2.5		

5.5 Enraizamiento de brotes

Fueron utilizados brotes de 2.0 a 3.0 cm de longitud provenientes de la etapa anterior de inducción de brotes *in vitro* después de ocho semanas de edad fueron transferidos a medios de cultivo MS con macronutrientes al 50%, 21 g glucosa más vitaminas y reguladores de crecimiento a concentración de 1.0 mg L⁻¹ de ácido indol butírico (AIB), 0.5 mg L⁻¹ de ácido naftalanacético más 1.0 mg L⁻¹ de AIB y 2.0 mg L⁻¹ de AIB, el pH de los medios se ajustó a 5.7 esterilizados con anterioridad en autoclave a 121 °C a 15 lb de presión durante 15 minutos. Las unidades experimentales de ambos cultivares Rosita y Huevo de Toro. Se incubaron en una cámara bioclimática bajo condiciones controladas de fotoperiodo 16 h luz y 8 h oscuridad a una temperatura de 24 ± 2 °C, en estas condiciones permanecieron por 8 semanas, bajo un diseño completamente al azar con un arreglo factorial 2x3, donde el factor A fueron los cultivares y el factor B fueron las fitohormonas vegetales añadidos al medio, obteniendo un total de 6 tratamientos con 8 repeticiones. La variable evaluada fue: número de brotes con raíces, para evaluar esta variable se realizó un análisis de varianza. Los datos de esta etapa se analizarán utilizando el paquete estadístico Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) versión 21.

Cuadro 6. Dosis hormonales en la etapa de inducción de raíces en ambos cultivares de (*P. americana* var. *drymifolia*). en el experimento uno.

Tratamiento	Cultivar	Reguladores de crecimiento (mg L ⁻¹)	
		AIB	ANA
T1	Huevo de Toro	1	
T2	Huevo de Toro	1	0.5
T3	Huevo de Toro	2	
T4	Rosita	1	
T5	Rosita	1	0.5
T6	Rosita	2	

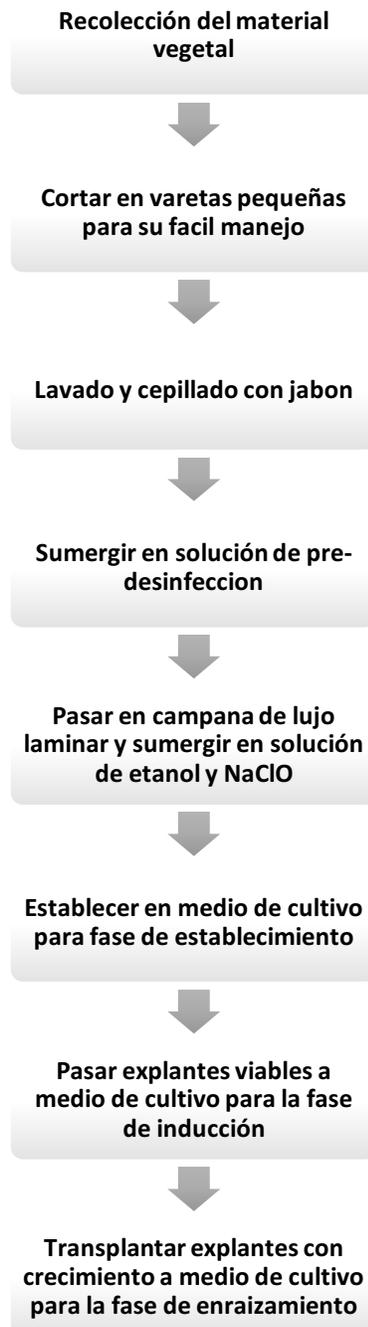
El experimento dos estuvo regido bajo las mismas condiciones que el anterior pero con la modificación adición de 2 mg L⁻¹ de carbón activado a los medios de cultivo, de la misma manera que el experimento anterior se estableció bajo un diseño completamente al azar con un arreglo factorial 2x4, donde el factor A fueron los cultivares y el factor B fueron las fitohormonas vegetales añadidos al medio a concentraciones de 1 mg L⁻¹ de ácido indol butírico (AIB), 0.5 mg L⁻¹ de ácido naftalanacético más 1 mg L⁻¹ de AIB, 1 mg L⁻¹ de ácido naftalanacético más 1 mg L⁻¹ de AIB y 2 mg L⁻¹ de AIB más 2 g L⁻¹ de carbón activado, el pH de los medios se ajustó a 5.7 esterilizados con anterioridad en autoclave a 121 °C a 15 lb de presión durante 15 minutos. Las unidades experimentales de ambos cultivares Rosita y Huevo de Toro. Se incubaron en la cámara bioclimática bajo condiciones controladas de fotoperiodo 16 h luz y 8 h oscuridad a una temperatura de 24 ± 2 °C,

en estas condiciones permanecieron por ocho semanas, obteniendo un total de ocho tratamientos con ocho repeticiones. La variable evaluada fue: número de brotes con raíces, para evaluar esta variable se realizó un análisis de varianza y si existiera significancia, la comparación de medias de los tratamientos se compararán mediante la prueba de tablas de contingencia a 95% de nivel de confianza. Los datos de esta etapa se analizarán utilizando el paquete estadístico Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) versión 21.

Cuadro 7. Dosis hormonales en la etapa de inducción de raíces en ambos cultivares de (*P. americana* var. *drymifolia*), en el experimento dos.

Tratamiento	Cultivar	Reguladores de crecimiento (mg L ⁻¹)		Carbón Activado (g L ⁻¹)
		AIB	ANA	
T1	Huevo de Toro	1		2
T2	Huevo de Toro	1	0.5	2
T3	Huevo de Toro	1	1	2
T4	Huevo de Toro	2		2
T5	Rosita	1		2
T6	Rosita	1	0.5	2
T7	Rosita	1	1	2
T8	Rosita	2		2

Figura 7. Diagrama del procedimiento de las etapas de la organogénesis para (*Persea americana var. drymifolia*).



VI. RESULTADOS Y DISCUSION

6.1 Desinfección y establecimiento aséptico de los explantes

Se realizó un análisis de Ji-cuadrada entre tratamientos donde se observó diferencia significativa entre ellos para la variable contaminación, donde el tratamiento 3 y 4 presentan la menor contaminación (Cuadro 8), sin embargo al observar estos resultados no quedaba claro si la diferencia significativa era debido a los cultivares o a la técnica de desinfección por lo que se procedió a realizar otro análisis por tablas de contingencia con prueba de ji-cuadrada entre cultivares y técnicas de desinfección.

Cuadro 8. Análisis por tratamientos mediante tablas de contingencia con prueba de ji-cuadrada para la variable contaminación.

Tratamiento	Contaminado	No contaminado	Total
Tratamiento 1	11	19	30
Tratamiento 2	8	22	30
Tratamiento 3	4	26	30
Tratamiento 4	3	27	30
Prueba de Ji-cuadrada			
Ji-cuadrada	8.052	Variables relacionadas	
Sig.	0.045		

Posteriormente los datos fueron evaluados a través de un análisis de Ji-cuadrada entre cultivares para observar si presentan dependencia entre ellos para la variable contaminación, sin embargo, no se observó diferencia significativa por lo que, el cultivar no influye directamente en la variable de contaminación (Cuadro 9).

Cuadro 9. Análisis por cultivar mediante tablas de contingencia con prueba de ji-cuadrada para la variable contaminación.

Cultivar	Contaminado	No contaminado	Total
Huevo de Toro	15	45	60
Rosita	11	49	60
Prueba de Ji-cuadrada			
Ji-cuadrada	0.786	Variables relacionadas	
Sig.	0.253		

Al realizar el análisis de Ji-cuadrada entre técnicas de desinfección y la variable contaminación se observó diferencia significativa, por lo que, el tratamiento de desinfección es el factor que influye directamente en la variable de contaminación (Cuadro 10). El método de desinfección número dos (T3 y T4) para cada cultivar permitió obtener 88.33% de explantes sin contaminación para ambos cultivares en comparación con la técnica de desinfección número uno, que nos permitió obtener un 68.33% de explantes sin contaminación (Cuadro 11).

Cuadro 10. Análisis por técnica de desinfección mediante tablas de contingencia con prueba de ji-cuadrada para la variable contaminación.

Desinfección	Contaminado	No contaminado	Total
Desinfección 1	19	41	60
Desinfección 2	7	53	60
Prueba de Ji-cuadrada			
Ji-cuadrada	7.07	Variables relacionadas	
Sig.	0.007		

Cuadro 11. Resultados de parámetros evaluados en la etapa de desinfección evaluados por técnica desinfección (*P. americana* var. *drymifolia*).

Desinfección	Raza	No oxidación	No contaminación	Viables
HT				
1	ROS	86.66%	68.33%	55%
HT				
2	ROS	100%	88.33%	88.33%
Sig.		0.003	0.007	0.000
Ji-cuadrada		8.571	7.07	16.416

La diferencia significativa entre los tratamientos utilizados para la fase de desinfección concuerda con investigaciones de Sato *et al.*, (2006) donde obtuvieron un 100% de desinfección en explantes al utilizar concentraciones de etanol al 70%

e investigaciones de Chen *et al.*, (2012) al utilizar NaOCl en diferentes concentraciones para su desinfección. Los cultivares no presentan influencia directa en la variable contaminación, esta información es respaldada por investigaciones de Ascough y Van (2010) cuyos resultados no presentan diferencias con los diferentes cultivares utilizados. En investigaciones de Baskaran y Van (2013) reportaron resultados negativos en la desinfección sin embargo al modificar la técnica de desinfección se obtienen resultados satisfactorios para esta fase por lo que el factor que influye directamente en esta variable viene siendo la técnica de desinfección utilizada.

Para la variable de oxidación se realizó un análisis de Ji-cuadrada donde se observó diferencia significativa entre los tratamientos donde la oxidación disminuyó en los tratamientos que presentaban menor contaminación (Cuadro 12), al observar estos resultados no quedaba claro si la diferencia significativa era debido a los cultivares o a la técnica de desinfección por lo que se procedió a realizar otro análisis por tablas de contingencia con prueba de ji-cuadrada entre cultivares y técnicas de desinfección.

Cuadro 12. Análisis por tratamientos mediante tablas de contingencia con prueba de ji-cuadrada para la variable oxidación.

Tratamiento	Oxidados	No oxidados	Total
Tratamiento 1	6	24	30
Tratamiento 2	2	28	30
Tratamiento 3	0	30	30
Tratamiento 4	0	30	30
Prueba de Ji-cuadrada			
Ji-cuadrada	12.857	Variables relacionadas	
Sig.	0.005		

Al realizar el análisis de Ji-cuadrada entre cultivares se observó que no hay dependencia entre la variable de oxidación y el cultivar (Cuadro 13). Posteriormente se realizó un análisis de Ji-cuadrada entre técnicas de desinfección donde se observa diferencia significativa para la variable oxidación (Cuadro 14) donde la desinfección que presenta los mejores resultados para la variable de oxidación es la desinfección 2 con un total de 100% de explantes sin oxidación en comparación del 86.66% de explantes sin oxidación obtenidos de la técnica de desinfección número uno (Cuadro 11).

Cuadro 13. Análisis por cultivar mediante tablas de contingencia con prueba de ji-cuadrada para la variable oxidación.

Cultivar	Oxidados	No oxidados	Total
Huevo de Toro	6	54	60
Rosita	2	58	60
Prueba de Ji-cuadrada			
Ji-cuadrada	2.143	Variables relacionadas	
Sig.	0.136		

Cuadro 14. Análisis por técnica de desinfección mediante tablas de contingencia con prueba de ji-cuadrada para la variable oxidación.

Desinfección	Oxidados	No oxidados	Total
Desinfección 1	8	52	60
Desinfección 2	0	60	60
Prueba de Ji-cuadrada			
Ji-cuadrada	8.571	Variables relacionadas	
Sig.	0.003		

La diferencia significativa presentada entre los tratamientos concuerda con investigaciones de Vidales-Fernández (2002) en donde utilizo productos comerciales en la desinfección de explantes de *P. americana* reportando una desinfección efectiva y sin explantes con oxidación. Los análisis realizados para

observar la interacción entre cultivar y oxidación mostraron resultados similares que en investigaciones elaboradas por Ibarra *et al* (2016) en explantes de *P. americana* donde no presenta diferencia entre cuatro especies utilizadas para la etapa de desinfección. La técnica de desinfección presentó diferencia significativa, esto nos demuestra que la variable de oxidación depende directamente de los agentes desinfectantes y tiempos a los que están sometidos los explantes a los mismos, esta información es respaldada por experimentos realizados por Ibarra (2016) donde se presentaban explantes oxidados provenientes de la fase de desinfección.

Se observó diferencia significativa en el análisis de Ji-cuadrada realizado para evaluar los explantes viables en los diferentes tratamientos para la etapa de desinfección (Cuadro 15), posteriormente se procedió a realizar otro análisis por tablas de contingencia con prueba de ji-cuadrada entre cultivares y técnica de desinfección para identificar el factor que influía directamente en este resultado.

Se realizó el análisis de Ji-cuadrada para evaluar la dependencia entre cultivar y explantes viables, no se observó diferencia significativa entre los cultivares y esta variable (Cuadro 16). Al no observar diferencias significativas en el análisis previo se procedió a correr el análisis por tablas de contingencia con prueba de ji-cuadrada entre técnicas de desinfección.

Cuadro 15. Análisis por tratamientos mediante tablas de contingencia con prueba de ji-cuadrada para la variable de explantes viables.

Tratamiento	No viables	Viables	Total
Tratamiento 1	17	13	30
Tratamiento 2	10	20	30
Tratamiento 3	4	26	30
Tratamiento 4	3	27	30
Prueba de Ji-cuadrada			
Ji-cuadrada	20.52	Variables relacionadas	
Sig.	0.000		

Cuadro 16. Análisis por cultivar mediante tablas de contingencia con prueba de ji-cuadrada para la variable viabilidad.

Cultivar	No viables	Viables	Total
Huevo de Toro	21	39	60
Rosita	13	47	60
Prueba de Ji-cuadrada			
Ji-cuadrada	2.627	Variables relacionadas	
Sig.	0.078		

El análisis de Ji-cuadrada para evaluar la dependencia entre la desinfección y explantes viables, donde se observó diferencia significativa (Cuadro 17), el método de desinfección número dos (T3 y T4) para cada cultivar permitió obtener 86.67%

para el cultivar Huevo de Toro y 90.1% para el cultivar Rosita de explantes viables respectivamente, dándonos un resultado conjunto de 88.33% de explantes libres de patógenos para ambos cultivares (Cuadro 11).

Cuadro 17. Análisis por técnica de desinfección mediante tablas de contingencia con prueba de ji-cuadrada para la variable viabilidad.

Desinfección	No viables	Viables	Total
Desinfección 1	27	33	60
Desinfección 2	7	53	60
Prueba de Ji-cuadrada			
Ji-cuadrada	16.416	Variables relacionadas	
Sig.	0.000		

La diferencia significativa entre los tratamientos utilizados para la fase de desinfección es corroborada por diferentes investigaciones donde se empleó etanol y NaClO para el proceso de desinfección reportando una desinfección efectiva y sin oxidación en explantes de diferentes especies (Sato *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2012; Al-Wasel, 2000). Los cultivares no influyen en la viabilidad al finalizar la desinfección, diversos estudios e investigaciones previas en diferentes especies muestran que la variedad no influye sobre la viabilidad de los explantes tras haber concluido la etapa de desinfección (Ascough *et al.*, 2010; Ascough y Van, 2010). La técnica de desinfección utilizada es el factor clave para la viabilidad de los explantes esto concierne con investigaciones en donde la desinfección utilizada influye sobre la viabilidad de los explantes tras haber concluido la etapa de desinfección (Ascough *et al.*, 2010; Baskaran y Van, 2013).

6.2 Inducción de brotes

En esta fase se realizó una comparación de medias por Tukey para cada una de las variables a evaluar, se consideró la significancia entre la interacción genotipo y dosis hormonal para evaluar si las dosis utilizadas tenían diferente respuesta en las variedades utilizadas, los mejores resultados para la variable número de brotes se presentaron en las dosis hormonales de 1.5 mg L⁻¹ BAP con 1.0 cm, 2 mg L⁻¹ BAP con 1.38 cm y 2.5 mg L⁻¹ BAP con 1.17 brotes, no se observó interacción entre las dosis hormonales y las variedades en esta variable por lo que estas dosis son adecuadas para ambos cultivares, el análisis se llevó a cabo a través de una comparación de medias por Tukey con un nivel de confianza del 95% después del subcultivo (Cuadro 18). Resultados similares se obtuvieron en investigaciones realizadas por Le Roux *et al.*, (1991).

Cuadro 18. Comparación de medias por Tukey de las dosis hormonales utilizadas para evaluar las variables número de brotes, longitud de brotes y número de hojas de las variedades en estudio (*P. americana* var. *drymifolia*).

Medio de inducción	Variables		
	Número de brotes	Longitud de brotes	Número de hojas
M1	0.0 b	0.0 c	0.0 c
M2	0.1 b	0.1 c	0.2 bc
M3	1.0 a	0.92 b	1.05 bc
M4	1.381 a	1.119 ab	1.381 b
M5	0.277 b	0.138 c	0.111 c
M6	1.173 a	1.176 a	3.043 a
Sig.	0.000	0.000	0.000
Var x Dosis	0.127	0.000	0.000
Fc	19.859	20.351	10.533

La variable longitud de brote y número de hojas presentaron diferencia significativa en la interacción de variedad por dosis hormonal utilizada, por lo que se procedió a realizar una comparación de medias por Tukey para cada cultivar en específico.

En el Cuadro 19 y Figura 5 se muestran resultados obtenidos al utilizar el BAP, al igual que investigaciones previas, indican que el BAP, juega un importante papel en la inducción de brotes y longitud en explantes de aguacate (Barceló-Muñoz y Pliego-Alfaro, 2003) (Zulfiqar *et al.*, 2009) (Cortés-Rodríguez *et al.*, 2011) (Sandoval-Prando *et al.*, 2014). Sin embargo, Barceló-Muñoz y Pliego-Alfaro (2003) y Cortés-Rodríguez *et al.*, (2011), mencionan que altas concentraciones de este regulador no

solo reducen el número de brotes formados, sino que además detiene el crecimiento de los mismos. Mientras que para el cultivar Rosita, el mejor tratamiento para la variable longitud de brotes fue la dosis 2.5 mg L⁻¹ BAP (T12) con un promedio de 2.71 cm (Cuadro 19) (Figura 6), por la otra parte en el cultivar Huevo de Toro los tratamientos que mostraron mejores resultados fueron 1.5 mg L⁻¹ BAP (T3), 2 mg L⁻¹ BAP (T4) y 2.5 mg L⁻¹ BAP (T6) destacando el tratamiento de T4 con 1.19 cm en promedio por explante

Cuadro 19. Resultados de las dosis hormonales en la etapa de inducción evaluados en cada variedad por separado para las variables longitud de brote y número de hojas (*P. americana* var. *drymifolia*).

Medio de inducción	Variables		
	Número de brotes	Longitud de brotes	Número de hojas
T1	0.0 b	0.0 c	0.0 a
T2	0.1 b	0.0 c	0.0 a
T3	1.0 a	0.650 ab	0.666 a
T4	1.381 a	1.119 ab	1.615 a
T5	0.277 b	0.150 bc	0.2 a
T6	1.173 a	0.530 abc	0.3 a
T7	0.0 b	0 c	0.0 b
T8	0.1 b	0.2 c	0.4 b
T9	1.0 a	1.325 b	1.625 b
T10	1.381 a	1 b	1.0 b
T11	0.277 b	0.125 c	0.0 b
T12	1.173 a	2.715 a	5.153 a

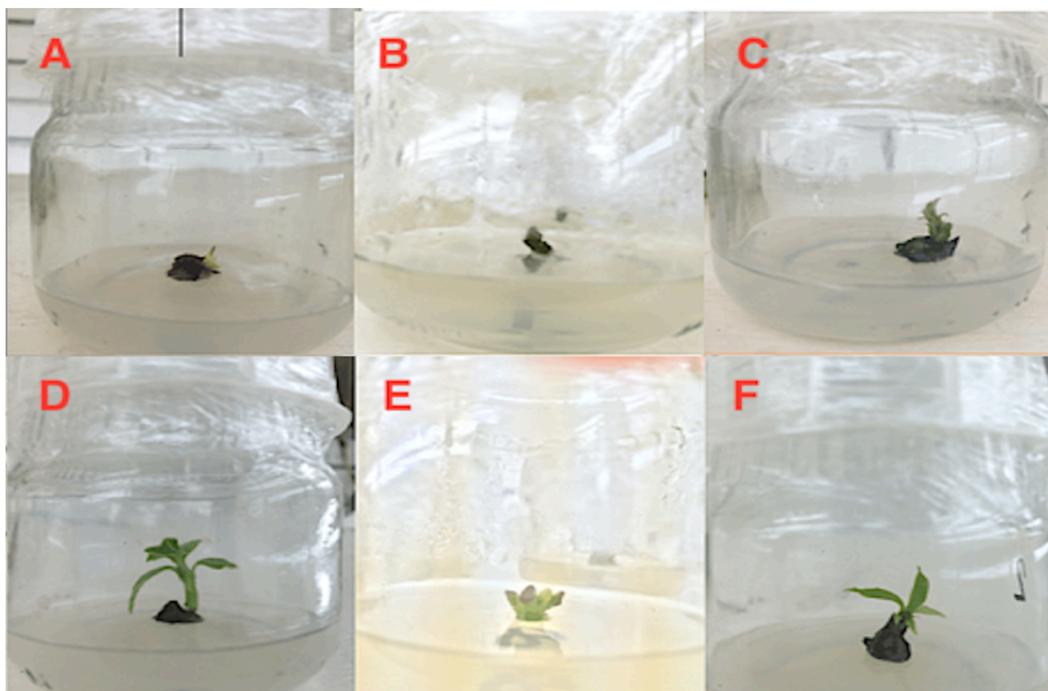


Figura 8. Explantes de la variedad Huevo de toro a las ocho semanas de la transferencia de los 6 tratamientos: A) T1, B) T2, C) T3, D) T4, E) T5 y F) T6.

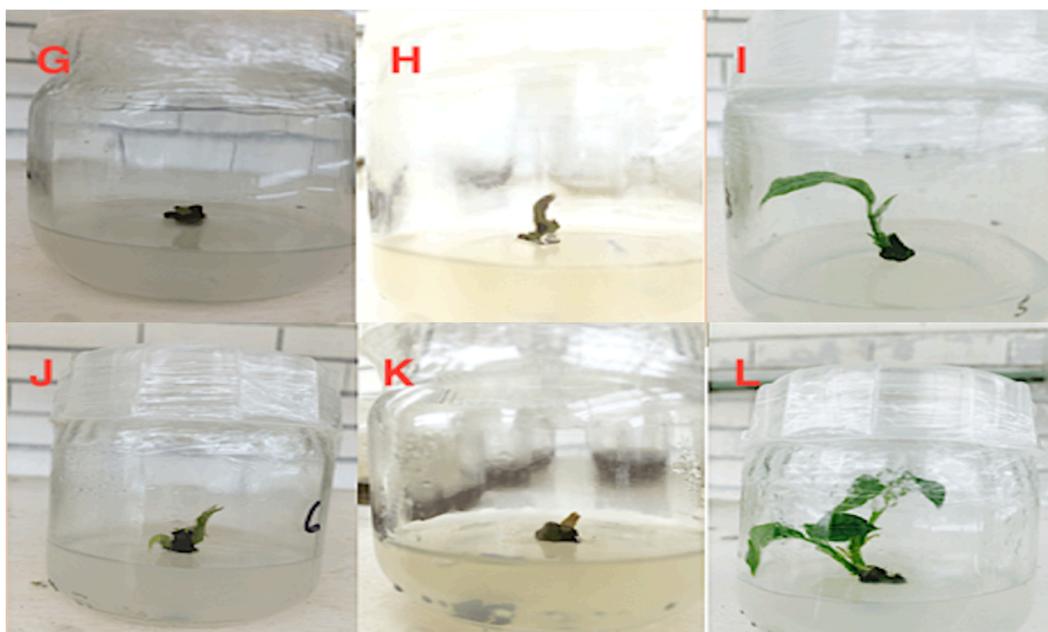


Figura 9. Explantes de la variedad Rosita a las ocho semanas de la transferencia de los 6 tratamientos; G) T7, H) T8, I) T9, J) T10, K) T11 y L) T12.

El mayor número de hojas en los explantes en el cultivar Rosita fue de 5.15 hojas por explante en el T12 (Figura 6), sin embargo, en el cultivar Huevo de Toro no se encontró diferencia significativa ante ninguna dosis hormonal aun así destacando la dosis hormonal de 2 mg L⁻¹ BAP con un promedio de 1.61 hojas (Figura 5), evaluado con un nivel de confianza del 95% evaluado mediante una comparación de medias por Tukey (Cuadro 19). Resultados similares se obtuvieron en investigaciones realizadas por Pliego-Alfaro., *et al* (1999).

6.3 Enraizamiento de brotes

Después de transcurrir las ocho semanas se evaluó el número de brotes con raíces en los tratamientos que fueron establecidos en el experimento número uno, se observó que a partir de la semana número seis los brotes empezaron a defoliarse y al llegar a la semana número ocho se observó un 50% de explantes defoliados, no se observaron a simple vista raíces en los brotes en los tratamientos utilizados.



Figura 10. Explante de *P. americana* Mill. después de haber transcurrido ocho semanas en medio de enraizamiento.

En el experimento numero dos se observó una defoliación del 35% al haber transcurrido 8 semanas, sin embargo, tampoco fue visible la formación de raíces a simple vista en los tratamientos utilizados con las diferentes dosis hormonales suplementadas con carbón activado, esto concuerda con resultados de Osuna *et al.*, (2006) donde el carbón activado afectó negativamente el enraizamiento de los explantes utilizados. Pérez *et al.*, (2001) reporta que para algunas especies el carbón activado perjudica la formación de raíces y lo que en realidad beneficia la formación de estas es un aumento en la cantidad de glucosa en el medio.

Otros investigadores reportan que al utilizar el carbón activado se estimula la formación de raíces (Radice *et al.*, 1999) muestra resultados del 95% de explantes con formación de raíz para *Vaccinium meridionale* también considerada una especie leñosa y Sospedra *et al.*, (2003) consiguió la formación de raíces con la adición de carbón activado en la especie leñosa *Psidium salutare*.

VII. CONCLUSIONES

El mejor tratamiento de desinfección en ambos cultivares fue el dos, permitiendo el establecimiento *in vitro* de los dos cultivares.

Para la inducción de brotes en ambos cultivares la mayor respuesta promedio fue de 1.38 brotes. Mientras que el promedio en la longitud de brotes fue de 2.71 cm, y por último el mayor número de hojas fue de 5.15 en promedio.

El enraizamiento no fue visible en los brotes de ambos cultivares después de ocho semanas de permanecer los brotes en los medios de cultivo y balance hormonal mencionados en esta investigación.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

- Alfonso Bartoli, José Ángel. (2008). Alfonso Bartoli, José Ángel. (2008). Manual Técnico del cultivo del aguacate Hass. Fundación Hondureña de Investigación Agrícola (FHIA). NC State University. CALS Internationals Programs. 127 pp
- Alvizouri Muñoz M., J. Carranza-Madriral, J.E. Herrera-Abarca, F. Chavez-Carbajal y J.L. Amezcua-Gastelum. Effects of avocado as a source of monounsaturated fatty acids on plasma lipid levels. *Achieves of Medical Research* (1992), 23(4): 163-167.
- Al-Wasel, A. S. (2000). Micropropagation of *Acacia seyal* Del. *in vitro*. *Journal of arid environments*, 46(4), 425-431.
- Arriaga I., T. Marzo & J. Segura. (1991). Micropropagation of juvenile and adult *Sorbus domestica* L. *Plant Cell, Tissue and organ Culture*, 341-348.
- Ascough G. D., & J. Van Staden. (2010). Micropropagation of *Albuca bracteata* and *A. nelsonii* indigenous ornamentals with medicinal value. *South African Journal of Botany*, 76(3), 579-584.
- Ascough P. L., C.J. Sturrock & M.I. Bird. (2010). Investigation of growth responses in saprophytic fungi to charred biomass. *Isotopes in environmental and health studies*, 46(1), 64-77.
- Barceló-Muñoz A., C.L. Encina, E. Simón-Pérez & F. Pliego-Alfaro (1999). Micropropagation of adult avocado. *Plant cell, tissue and organ culture*, 58(1), 11-17.
- Barceló-Muñoz A., F. Pliego-Alfaro. 2003. Micropropagation of avocado (*Persea americana* Mill). En: Jain, S. M., K. Ishii (eds), *Micropropagation of Woody Trees and Fruits*, 519-542.

- Baustista, R. O., & Ortega, C. R. (2002). El aguacate mexicano frente a la apertura del mercado norteamericano. *Claridades Agropecuarias*, 33-51.
- Ben-Ya'acov, A., G. Bufler, A. F. Barrientos-Priego, E. de la Cruz-Torres, and L. López López. 1992. A study of avocado germplasm resources, 1988-1990. I. General description of the international project and its findings. *Proc. of Second World Avocado Congress II*: 535-541.
- Bergh, B. 1992. The origin, nature and genetic improvement of the avocado. *California Avocado society yearbook* 76: 61-75.
- Bergh, B., and Ellstrand. 1987. Taxonomy of the avocado. *California Avocado Society Yearbook* 70: 135-145.
- Bergh, B.O. 1995. Avocado, *Persea americana* (Lauraceae). In: J. Smartt and N.W. Simmonds (eds.). *Evolution of crop plants*. Second edition. Longman Scientific and Technical, London, UK. 240-245 pp.
- Bernal, J. A., & C.A. Diaz. (2008). Tecnología para el cultivo del aguacate. Manual Técnico 5. CORPOICA, Centro de Investigación La Selva. Río Negro, Antioquia, Colombia. 241 pp.
- Baskaran P., & J. Van Staden. (2013). Rapid in vitro micropropagation of *Agapanthus praecox*. *South African Journal of Botany*, 86, 46-50.
- Calabrese, F. (1992). El aguacate. 2da. Edición. Traducción: Javier Calatrava. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid, España. 249 pp.
- Calderon, M. C. (2006). Un aliado para la salud y la belleza: La palta (aguacate).). www.cicalmo.wordpress.com/2006
- Carranza Madrigal J., J.E. Herrera-Abarca, M. Alvizouri-Muñoz, M.R. Alvarado-Jiménez y F. Chavez. Effects of a vegetarian diet vs vegetarian diet enriched

- with avocado in hypercholesterolemic patients. *Achieves of medical research* (1997), 28(4):537-541.
- Chen, R., Chen, X. L., Li, Q. L., Yang, Y. S., & Wu, H. (2012, May). Micropropagation by repeatedly inducing axillary bud formation of different gene dosage purple coneflower plants. In *Biomedical Engineering and Biotechnology (iCBEB), 2012 International Conference on* (pp. 1056-1059). IEEE.
- Clemente, M. (1999). *In vitro* culture and Plant Conservation. *Biodiversity*, 263-268.
- Cortés-Rodríguez, M. A., R. López-Gómez, M.M. Martínez-Pacheco, L.M. Suárez-Rodríguez, A. Hernández-García y R. Salgado-García. 2011. *In vitro* propagation of Mexican race avocado (*Persea americana* Mill var. *drymifolia*). *Acta Hort*, 923: 47-52.
- Curtis H. & A. Schneck. (2006). *Invitación a la biología. Sexta Edición en español*. Editorial Panamericana. Madrid, España. pp. 886-990.
- Dodds, H. J. (1991). *In vitro* methods for conservation of plant genetic resources. *Chapman & Hall*, 240.
- Engelmann F., & H. Takagi. (2000). *Cryopreservation of tropical plant germoplasm. Current research progress and application*. Tsukuba, Japan. 1-7p.
- Fisher, R. A. (1930). *The genetical theory of natural selection*. Oxford University. The Clarendon Press. 372 pp.
- Frankel, O. (1983). The place of management in conservation. *Genetic and conservation*, 1-14.
- Frankel, O. H., A.H. Brown & J.J. Burdon. (1995). *The conservation of plant biodiversity*. Cambridge University Press, 299.
- Galindo Tovar, M. E., N. Ogata A. & M. Arzate F. Some aspects of avocado (*Persea americana* Mill.) diversity and domestication in Mesoamérica. Veracruz, México. *Genet Resour Crop Evol* (2008) 55: 441-450.

- Gallegos, E. R. (1983). Algunos aspectos del aguacate y su producción en Michoacan. Universidad Autónoma de Chapingo. Grupo Editorial Gaceta, S.A. Chapingo, México. 317p.
- García-Aguilar M.A., T. Terrazas, O. Segura L., S. Arias, H. Vibrans y L. López-Mata. Molecular characterization of three species of *Hylocereus* (Cactaceae) from Mexico. Rev. Fitotec. Mex. Vol. 36 (1): 13-22, 2013.
- Gresshoff, P.M. y C.H. Doy. 1972. Development and differentiation of haploid *Lycopersicon esculentum* (tomato). Planta 107: 161-170.
- González, R. (2010). Hormonas vegetales. Boletín 118. Asociación Guatemalteca de Orquideología. Guatemala, Guatemala. 3p.
- Gómez, Carlos (2004). Post-harvest operations, IMPHO Post-harvest Compendium. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) Rome, Italia. 72pp.
- Graudal L., E. Kjaer, N. Thomden & A.B. Larsen. (1997). Planning nationales programmes of forest genetic resources. Technical Note N°48 Danida Forest Seed Centre. Humlebaek, Denmark. 92pp
- Herrera J., R. Alizaga, E. Guevara y V. Jiménez. (2006). Germinación y crecimiento de las plantas. Fisiología de la producción de los cultivos tropicales. Editorial Universidad de Costa Rica. Costa Rica. pp. 56-57.
- Iáñez, Enrique (2000). Ingeniería genética de plantas. Adaptado de la Conferencia dentro de los Cursos de Verano del Centro Mediterráneo de la Universidad de Granada (Motril, Septiembre 1977).
- Ibarra-López A.; M.C. Ojeda-Zacarías; E.A. García-Zambrano y A. Gutiérrez-Diez, 2016. Inducción *in vitro* de brotes de dos cultivares de aguacate raza mexicana *Persea americana* var. *drymifolia* Schlttdl. & Cham. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas, 7(2): 337-347.

- Kritchevsky, D., S.A. Tepper, S. Wright, S.K. Czamecki, T.A. Wilson & R.J. Nicolosi. (2013). Cholesterol vehicle in experimental atherosclerosis experimental. 24:Avocado oil. Revista del Colegio América de nutrición, 22:1, 52-55.
- Levitus Gabriela, V. Echenique, C. Rubinstein, E. Hopp & L. Mroginski. (2010). Biotecnología y Mejoramiento Vegetal II. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA). ArgenBio, Consejo Argentino para la información y el desarrollo de la Biotecnología. 650 pp.
- Lloyd G.& B. Mc Cown. 1980. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. Proc. Intern. Plant Prop. Soc. 30:421-426.
- Lynch, P. T. (1999). Tissue culture techniques in *In vitro* plant conservation. Plant Conservation Biotechnology, 41-62.
- Mijares Oviedo, P. & L. López López. (1998). Variedades de aguacate y su producción en México. Memoria Fundación Salvador Sánchez Colín, CICTAMEX S.C. Coatepec Harinas, México. 22-32 pp.
- Minorsky, P. V. (2001). Tribute to Folke Skoog. Plant Physiol. *Plant*, 125(4), 1546-1547.
- Moreno-Limón S., A. Rocha-Estrada, M.A. Alvarado-Vázquez, M. Salgado-Mora y E. P. Pinson Rincón. (2010). Aguacate. Variedades, cultivo y producción en Nuevo León. Universidad Autónoma de Nuevo León. Monterrey, Nuevo León, México: UANL. 158 pp.
- Nodarse, O, Santana I, Cornides MT, Figueredo Y, Héctor E y Rodríguez R (1998) Comparación de poblaciones de caña de azúcar conservadas *in vitro* e *in situ*. Libro de resúmenes. III Encuentro Latinoamericano de Biotecnología Vegetal. Palacio de las Convenciones. Ciudad de la Habana.

- Ortiz, M., A.L. Dorantes, M.J. Galldnez & E. Cardenas. (2004). Effect of a novel oil extraction method on avocado (*Persea americana* Mill.) pulp microstructure. 11-14.
- Ortiz, R. (2000). Conservacion de células, tejidos y órganos vegetales a bajas temperaturas: Crioconservación [en línea] 2000. Disponible en:<http://www.hannover2000.net/expo2000hannover/es/tecnología/proyectos/crioconservación/largo.htm>.
- Osuna, L., M.E. Tapia-Pérez, O. Figueroa, E. Jiménez-Ferrer, M.L. Garduño-Ramírez, M.T. González-Garza & D.E. Cruz-Vega. (2006). Micropropagation of *Lepidium virginicum* (Brassicaceae), a plant with antiprotozoal activity. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*, 42(6), 596-600.
- Pence, V. (1999). The application of biotechnology for the conservation of endangered plants. (T. & Francis, Ed.) *Plant conservation Biotechnology*, 5222-5226.
- Pérez, M. B., M.R. Ramírez, P. Núñez & A.N. Ochoa. (1999). Introducción al cultivo de tejidos vegetales. *FOMES*, 51-69.
- Pérez, F.J. 2001. Desarrollo de un método de micropropagación aplicable a genotipos selectos de *Cedrela odotata* L. Tesis Mag. Sc. CATIE, Turrialba, Costa Rica. 81 pp.
- Phillips R. L., S.M. Kaeppler & P. Olhoft. (1994). Genetic instability of plant tissue cultures. *National Academy Science*, 522-526.
- Pliego-Alfaro F., C. Lopez-Encina & A. Barcelo-Muñoz. (1987). Propagation of avocado rootstocks by tissue culture. *South Africa avocado Growers*, 36-39.
- Pliego-Alfaro, F. & B.O.Bergh. (1992). *Biotechnology of Perennial Fruit Crops*. International Wallinfdord, 323-333.

- Radice, S., P.E. Perelman & O.H. Caso. (1999). Clonal propagation of three rootstocks of the genus *Prunus* for the " Flooding Pampa". *Phyton-international journal of experimental botany*, 64(1-2), 149-156.
- Ralner W. Scora y B.O. Bergh. Origin of and Taxonomic Relationships whitin the genus *Persea*. Proc. of Second World Avocado Congress, 1992. 505-514 pp.
- Renner, Susanne S. Variation in diversity among Laurales. Early cretaceous to present. *Biol Skr.* (2004) 55: 441-458.ñ
- Rodríguez Nodals A A. y P. Sánchez Pérez. (2005). Especies de frutales cultivadas en Cuba, en la Urbana. 4ta. Edición (corregida y aumentada). La Habana, Cuba. 69pp
- Rodríguez, S.F. 1982. El aguacate. Editorial A.G.T. México D.F. p 13- 15, 166.
- SAGARPA. (2011). Monografía de Cultivos. Subsecretaría de fomentos a los agronegocios. Gobierno Federal, México, D.F. 10 pp.
- Salisbury, B.F., Ross, C.W. (1994). Fisiología vegetal. Editorial Iberoamericana. México. D.F. pp. 321-323.
- Sánchez Pérez J.de la L. Recursos genéticos de aguacate (*Persea americana* Mill.) y especies afines en México. INIFAP Campo Experimental de Uruapan, Michoacan, México: Revista Chapingo Serie Horticultura 5 Número especial:7-18 (1999)
- Sandoval-Prando, M. A., P. Chiavazza, A. Faggio & C. Contessa. 2014. Effect of coconut water and growth regulator supplements on *in vitro* propagation of *Corylus avellana* L. *Scientia Horticulturae*, 171: 91-94.
- Sato, A., S.S. de Lima, V.R. Afonso, M.A. Esquibel & C.L. Lage. (2006). Micropropagation of *Chamomilla recutita* (L.) Rauschert: A shock treatment model with growth regulators. *Scientia horticulturae*,109(2), 160-164.

- Secretaría de Economía. (2012). Monografía del sector aguacate en México: Situación actual y oportunidades de mercado. Dirección General de Industrias Básicas. 21 pp.
- Smith, C. E. Archeological evidence for selection in avocado. *Economic Botany* (1966), Volume 20: 169-175.
- Sospedra, R. S., M.G. López, L.J. Cruz, G.G. López & E.G. Quiñones. (2003). Micropropagación de *Psidium salutare* (Myrtaceae). *Revista del Jardín Botánico Nacional*, 245-250.
- Storey, W.B., B. Bergh y G.A. Zentmyer. The origin, indigenous range and dissemination of the avocado. *California Avocado Society 1986, Yearbook 70*: 127-133.
- Takashi, T. (1986). The avocado in Mexico. *Calif Avocado Soc. Yrbk.* 52: 169–172.
- Turner, B. L., & C. H. Miksiek. Economic plant species associated with prehistoric agriculture in the Maya lowlands. *Economic Botany* (1984), 38(2): 171-193.
- Valenzuela-Nuñez, L. M., & E. Armendariz-Erives. (1999). Uso de antibioticos en medios de cultivo para reducir la presencia de agentes contaminantes en la propagacion in vitro de palma datilera (*Phoenix dactylifera L.*). Chapingo, Estado de México, México: Universidad Autónoma de Chapingo.
- Van Den Bulk, R. W. (1991). Application of cell and tissue culture and *in vitro* selection for disease resistance breeding. 269-285.
- Vidales, F., & R. Alcantar. (1994). Control integrado de la tristeza (*Phytophthora cinnamomi*) del aguacate (*Persea americana*) en Michoacán. Memorias de VII Reunión Científica y Técnica forestal y agropecuaria. Centro de Investigación del Pacífico Centro. INIFAP. 7 pp

- Vidales-Fernández, I. 2002. Efecto de los reguladores de crecimiento en los procesos de organogénesis y embriogénesis somática de aguacate (*Persea americana* Mill). Tesis. Universidad de Colima, Tecomán, Colima, México. 141 pp.
- Westboy, Jack (1991). Introduction to world forestry. The Oxford Forestry Institute, University of Oxford, South Park Road Oxford. Basil Blackwell Press. 240 pp.
- Wildman, R. E. (2007). Handbook of Nutraceuticals and Functional Foods. Series in Modern Nutrition. Second Edition. CRC Press. 523 pp
- Williams, L. O. The avocados, a synopsis of the genus *Persea*, subg. *Persea*. Economic Botany (1977) Vol.31: 315-320pp.
- Withers, L. A. (1985). Long-term storage of in vitro cultures. (M. Nijhoff, Ed.) 137-148.
- Zulfiqar, B., Abbasi, N. A., Ahmad, T., Hafiz, I. A. 2009. Effect of explant sources and different concentrations of plant growth regulators on *in vitro* shoot proliferation and rooting of avocado (*Persea americana* Mill) cv. "Fuerte". Pak. J. Bot., 41(5): 2333-2346.