

Establecimiento *in vitro* de Aguacate (*Persea americana* Mill.) variedad Criollo

José Andrés Blanco Anleu

**Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano
Honduras**

Noviembre, 2017

ZAMORANO
CARRERA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA

Establecimiento *in vitro* de Aguacate (*Persea americana* Mill.) variedad Criollo

Proyecto especial de graduación presentado como requisito parcial para optar
al título de Ingeniero Agrónomo en el
Grado Académico de Licenciatura

Presentado por

José Andrés Blanco Anleu

Zamorano, Honduras

Noviembre, 2017

Establecimiento *in-vitro* de Aguacate (*Persea americana* Mill.) variedad Criollo

José Andrés Blanco Anleu.

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

Palabras clave: Micropropagación, palta, propagación *in vitro*, reguladores de crecimiento.

The cultivation of avocado (*Persea americana* Mill.) is of economic importance for producing countries. Pattern and production plant grafts are selected according to attributes that each variety possesses for the specific function that they are going to develop in production. The objective of this study was to establish Criollo avocado *in vitro* from axillary meristems. In the establishment the Murashige and Skoog medium modified with half of the mineral salts and supplemented with growth regulators was used: Experiment 1 consisted of three treatments: 0.5 mg/L of Benzylaminopurine (BAP), 0.5 mg of BAP + 0.5 mg of Gibberellic Acid (AG) and without hormones. Experiment 2 consisted of four treatments 0.5 mg/L of naphthaleneacetic acid (ANA) was combined with 0.5, 3 and 5 mg/L BAP and the control without phytohormones. The number of leaves and number of outbreaks per meristem were evaluated. In the experiment 1 best treatments where the one's supplemented with BAP. No shoot formation was observed in Experiment 2. It was possible to establish meristems of Avocado variety Criollo *in vitro* in the culture medium supplemented with 0.5 mg/L of BAP.

Key words: Avocado, growth regulators, micropropagation, propagation *in vitro*.

CONTENIDO

Portadilla.....	i
Página de firmas	ii
Resumen	iii
Contenido	iv
Índice de Cuadros y Figuras	v
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. METODOLOGÍA.....	3
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	6
4. CONCLUSIÓN.....	10
5. RECOMENDACIÓN.....	11
6. LITERATURA CITADA.....	12

ÍNDICE DE CUADROS Y FIGURAS

Cuadros	Página
1. Medio de cultivo Murashige y Skoog modificado para el establecimiento <i>in vitro</i> de aguacate variedad Criollo (<i>Persea americana</i> Mill.).....	4
2. Número de brotes por meristemo de aguacate (<i>Persea americana</i> Mill.) variedad Criollo en etapa de establecimiento <i>in vitro</i> como respuesta a Bencilaminopurina (BAP) y Acido Giberélico (AG).....	7
3. Número de hojas por meristemo de aguacate (<i>Persea americana</i> Mill.) variedad Criollo en etapa de establecimiento <i>in vitro</i> como respuesta a Bencilaminopurina (BAP) y Acido Giberélico (AG).....	7

Figuras	Página
1. Aguacate (<i>Persea americana</i> Mill.). A: Plantación de patrones de aguacate Criollo en la Unidad de Propagación de Zamorano. B: Meristemos axilares de crecimiento.	3
2. Aguacate (<i>Persea americana</i> Mill.) variedad Criollo. A. Brotes jóvenes de la planta madre. B: Segmentos nodales listos para proceso de desinfección	4
3. Meristemos de aguacate (<i>Persea americana</i> Mill.) establecidos <i>in vitro</i> en medio de cultivo MS modificado y suplementado con 0.5 mg/L de BAP A. Meristemo axilar a siete días de establecido B. Meristemo axilar a los 42 días de establecido C. Meristemo axilar a los 49 días de establecido en el tratamiento.....	6
4. Meristemos de aguacate (<i>Persea americana</i> Mill.) establecidos <i>in vitro</i> en medio de cultivo MS modificado y suplementado con BAP y ANA a los 21 días de establecidos. A. Meristemo axilar en medio 0.5 BAP + 0.5ANA. B. Meristemo axilar en medio 3 BAP + 0.5ANA C. Meristemo axilar en el medio 5 BAP + 0.5ANA. D. Meristemo axilar a los 21 días Testigo.	8

1. INTRODUCCIÓN

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

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

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

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

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

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

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

2. METODOLOGÍA

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

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



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

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



Figura 2.- Aguacate (*Persea americana* Mill.) variedad Criollo. A. Brotes jóvenes de la planta madre. B: Segmentos nodales listos para proceso de desinfección

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

Cuadro 1.- Medio de cultivo Murashige y Skoog modificado para el establecimiento *in vitro* de aguacate variedad Criollo (*Persea americana* Mill.).

Componentes	Fórmula	Nombre Común	mg/L
Macroelementos	CaCl ₂ .2H ₂ O	Cloruro de calcio bihidratado	220.0000
	KH ₂ PO ₄	Fosfato monobásico de potasio	85.0000
	KNO ₃	Nitrato de potasio	950.0000
	MgSO ₄ .7H ₂ O	Sulfato de magnesio heptahidratado	185.0000
	NH ₄ NO ₃	Nitrato de amonio	825.0000
Microelementos	H ₃ BO ₃	Ácido bórico	3.1000
	CoCl ₂ .6H ₂ O	Cloruro de cobalto hexahidratado	0.0125
	CuSO ₄ .5H ₂ O	Sulfato de cobre pentahidratado	0.0125
	KI	Yoduro de potasio	0.4150
	MnSO ₄ .4H ₂ O	Sulfato de manganeso tetrahidratado	11.1500
	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	Molibdato de sodio bihidratado	0.1250
	ZnSO ₄ .7H ₂ O	Sulfato de zinc heptahidratado	4.3000
	FeNa EDTA	Sal férrica sódica de ácido Etilendiaminotetraacético	25.0000
Vitaminas		Myo-inositol	50.0000
		Tiamina	0.2000
		Piridoxina	0.2500
		Ácido Nicotínico	0.2500
Carbohidrato		Sacarosa	15000.0000

Fuente: (Kyte 1987)

Experimento 1 Evaluación de la respuesta de los meristemos a 6-Bencilaminopurina (BAP) y Ácido Giberélico (AG).

Los tratamientos a evaluar en este experimento fueron:

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

Experimento 2 Evaluación de la respuesta de los meristemos a 6-Bencilaminopurina (BAP) y Ácido Naftalenacético (ANA).

Los tratamientos a evaluar en este experimento fueron:

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

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

Diseño experimental. En los dos experimentos se utilizó un Diseño Completo al Azar. En el experimento uno se evaluaron tres tratamientos cada uno con 36 repeticiones. En el experimento dos se usaron cuatro tratamientos con 25 repeticiones por tratamiento.

Análisis estadístico. Se usó un análisis de varianza con separación de medias por el método Duncan $P \leq 0.5$. Se usó el programa “Statistical Analysis System” SAS versión 9.1.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Experimento 1 Evaluación de la respuesta de los meristemos a 6-Bencilaminopurina (BAP) y Ácido Giberélico (AG).

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

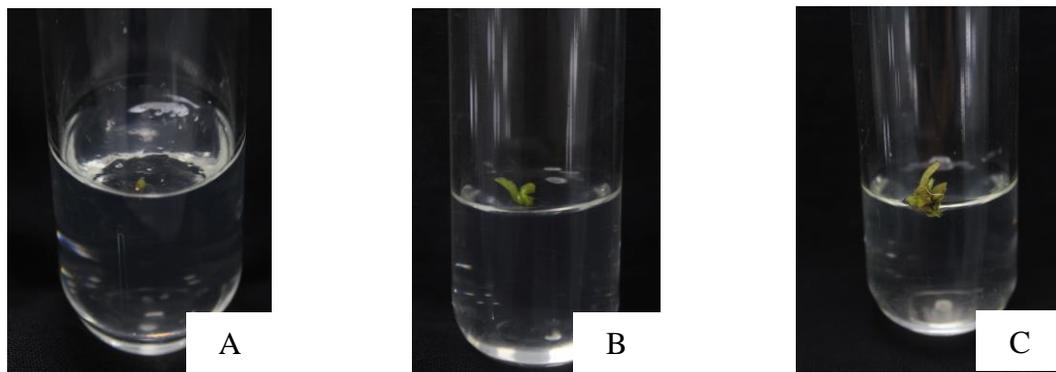


Figura 3.- Meristemos de aguacate (*Persea americana* Mill.) establecidos *in vitro* en medio de cultivo MS modificado y suplementado con 0.5 mg/L de BAP A. Meristemo axilar a siete días de establecido B. Meristemo axilar a los 42 días de establecido C. Meristemo axilar a los 49 días de establecido en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

Para la variable de brotes el mejor tratamiento fue el suplementado con 0.5mg/L BAP (Cuadro 2). Estos datos no concuerdan con el estudio que realizaron Muñoz et al. (1999) donde observaron de 7 a 15 brotes por explante establecido como respuesta a las hormonas BAP y AG. Estos investigadores también obtuvieron elongación en los tallos y formación de hojas en porcentajes mayores al 50% lo que nos indica que estas fitohormonas son necesarias para la obtención de brotes.

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

Cuadro 2.- Número de brotes por meristemo de aguacate (*Persea americana* Mill.) variedad Criollo en etapa de establecimiento *in vitro* como respuesta a Bencilaminopurina (BAP) y Acido Giberélico (AG).

Tratamiento mg/L	DÍAS		
	60	67	74
0.5BAP	1.31a	1.31a	1.47a
0.5BAP+0.5AG	1.00b	1.00b	1.11b
Testigo	1.00b	1.00b	1.00b
Coefficiente de variación	32.71	43.64	43.64

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

Para la variable número de hojas los tratamientos no hubo diferencia significativa a los 28 días. Esto se puede atribuir al crecimiento lento que presentaron los meristemos establecidos. A partir del día 35 los tratamientos empezaron a mostrar diferencias significativas y los meristemos empezaron a desarrollar una mayor cantidad de hojas (Cuadro 3). Estos datos concuerdan con Rodríguez et al. (1999) en donde obtuvieron formación de hojas en los meristemos con la adición de BAP y AG teniendo un desarrollo de la lámina foliar reducido en los meristemos establecidos a distintas concentraciones de fitohormonas. Peixoto et al. (2010) reportan un promedio de cuatro hojas por meristemo establecido y variaciones durante el crecimiento por meristemo establecido de cítricos con el uso de distintas combinaciones de BAP y AG. Estos datos nos indican que tanto la hormona BAP por si sola o en combinación con AG es capaz de inducir la formación de hojas durante el crecimiento de los meristemos.

Cuadro 3.- Número de hojas por meristemo de aguacate (*Persea americana* Mill.) variedad Criollo en etapa de establecimiento *in vitro* como respuesta a Bencilaminopurina (BAP) y Acido Giberélico (AG).

Tratamiento mg/L	DÍAS		
	35	42	49
0.5BAP	2.35 ab	2.58 a	3.05 a
0.5BAP+0.5AG	3.03 a	3.11 a	3.50 a
Testigo	1.68 b	1.68 b	1.72 b
Coefficiente de Variación	50.84	52.97	52.38

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

Experimento 2 Evaluación de la respuesta de los meristemos a 6-Bencilaminopurina (BAP) y Ácido Naftalenacético (ANA).

Los meristemos axilares hasta finalizar los 72 días del establecimiento crecieron y expresaron cambios en la coloración. Empezaron a incrementar de tamaño pero no presentaron formación de tallos o de hojas (Figura4).

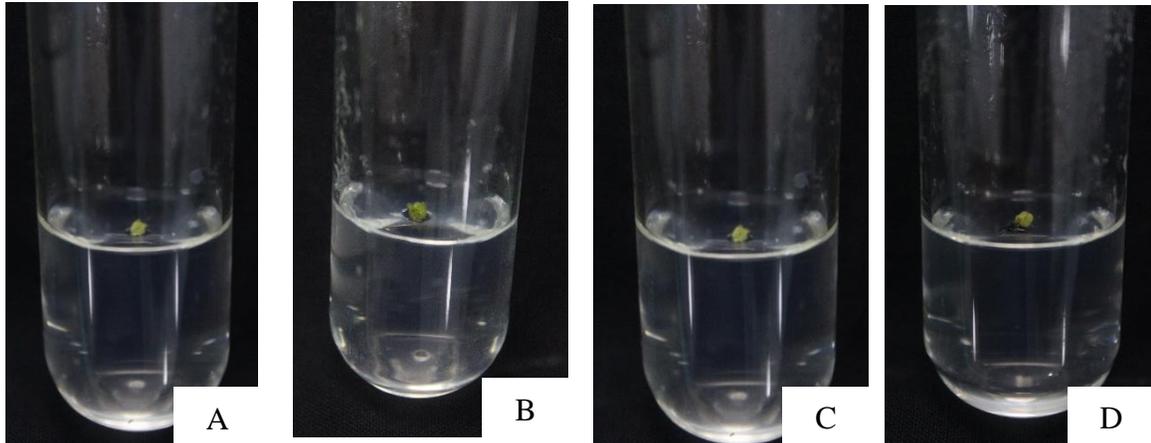


Figura 4.- Meristemos de aguacate (*Persea americana* Mill.) establecidos *in vitro* en medio de cultivo MS modificado y suplementado con BAP y ANA a los 21 días de establecidos. A. Meristemo axilar en medio 0.5 BAP + 0.5ANA. B. Meristemo axilar en medio 3 BAP + 0.5ANA C. Meristemo axilar en el medio 5 BAP + 0.5ANA. D. Meristemo axilar a los 21 días Testigo.

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

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

El crecimiento de los meristemos en nuestro experimento fue lento y esto difiere del crecimiento que obtuvieron Cantillo et al. (2011) para la propagación *in vitro* de *Pinus cubensis* Griseb quienes lograron un incremento en el número de brotes establecidos y en la elongación de los mismos usando 5.4 mg/L de ANA. Se cree que la diferencia puede radicar en la dosis de ANA que se usó en el establecimiento de aguacate la cual fue menor y por lo cual se obtuvo un crecimiento moderado, por ende no se vieron indicios de formación de brotes o de hojas.

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

4. CONCLUSIÓN

- Se logró establecer el cultivo *in vitro* de Aguacate (*Persea americana* Mill.) variedad criollo en medio de cultivo suplementado con 0.5 mg/L de BAP.

5 RECOMENDACIÓN

- Realizar pruebas con otras fitohormonas para lograr crecimiento en los explantes y la formación de brotes múltiples.

6 LITERATURA CITADA

- Bernal J, Díaz C. 2008. Tecnología para el cultivo del aguacate. Antioquia (Colombia); Centro de investigación Rionegro. [consultado 2017 jul 15]. 208 p. https://books.google.hn/books?id=t_Z7nMjbhCMC&printsec=frontcover&dq=Bernal+J,+D%C3%ADaz+C.+2008.+Tecnolog%C3%ADa+para+el+cultivo+del+aguacate.+Centro+de+investigaci%C3%B3n+Rionegro&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwjhNnF8_zWAhVGMMyYKHhWCIEQ6AEIJTAA#v=onepage&q&f=false
- Cantillo R, Igarza J. Ochoa A. 2011. Propagación *in vitro* de plantas de *Pinus cubensis* Griseb. IBP; [consultado 2017 jun 26]. 11(1):3. <https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/article/view/201/703>
- Ernst A. 1999. Micro cloning: A multiple cloning technique for avocados using micro containers. Rev Ch Ser Hort; [consultado 2017 may 24]. 5:217-220. http://www.avocadosource.com/WAC4/WAC4_p217.pdf
- Frolich E, Platt R. 1971. Use of the etiolation technique in rooting avocado cuttings. In: Coit E ed. California Avocado Society yearbook; [consultado jun 25]. 55: 97-109. <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.505.126&rep=rep1&type=pdf>
- Gamboa J, Abdelnour A. 1999. Micropropagación de melina (*Gmelina arborea*). Agronomía Costarricense 23(1):69-76. http://www.mag.go.cr/rev_agr/v23n01_069.pdf
- Gutiérrez A, Martínez J, Garcia E, Iracheta L, Ocampo J, Hurtado I. 2009. Estudio de diversidad genética del aguacate nativo en Nuevo León, México. Fitotec. Mex; [consultado jun 15]. 32(1):9-18. <http://www.redalyc.org/pdf/610/61011105002.pdf>
- Kyte L. 1987. Plants from test tubes: An introduction to micropropagation. Portland (OR). Timber Press. 260 p.
- Lavarie E. 2013. Manual técnico del cultivo de aguacate en Honduras [internet]. PRONAGRO; [consultado 4 jul 2017]. pronagro.sag.gob.hn/dmsdocument/183.
- Muñoz A, Encina C, Simón E, Pliego F. 1999. Micropropagation of adult avocado. PCTOC. 58:11–17. doi:10.1023/A:1006305716426

- Pua E, Chong E, Davey J, Michael R. 2007. Biotechnology in agriculture and forestry. Universidad de Illinois (USA). doi:10.1007/978-3-540-49161-3.
- Peixoto M, Cardoso M, Silva C, Campos W. 2010. Growth regulators, culture media and antibiotics in the *in vitro* shoot regeneration from mature tissue of citrus cultivars. *Pesq. Agropec. Bras.*; [consultado 2017 may 26]. 5(7):654-660. <http://www.scielo.br/pdf/pab/v45n7/04.pdf>
- Rodríguez NN, Capote M, Zamora V. 1999. Cultivo *in vitro* del aguacatero (*Persea americana* Mill.). *Rev Ch Ser Hort*; [consultado 2017 may 26]. 5:231-237. http://www.avocadosource.com/WAC4/WAC4_p231.pdf
- Rojas F, Abdelnour A. 2012. Brotación *in vitro* de yemas de teca (*Tectona grandis* L.f.). *Tecnología en marcha* 25(5):67-72. revistas.tec.ac.cr/index.php/tec_marcha/article/download/475/403
- Solis M. 2011. Manual del cultivo buenas prácticas de cultivo variedad Hass. Costa Rica: Agencia de Servicios Agropecuarios de Frailes; [consultado 2017 jul 4]. <http://www.mag.go.cr/bibliotecavirtual/F01-4259.pdf>.
- Sotolongo R, García M, Junco L, Gaeda G, García E. 2003. Micropropagación de *Psidium salutare* (Myrtaceae). *Jard. Bot. Nac. Univ. Habana*. 24(1/2):245-250. <http://www.jstor.org/stable/42597205>