

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

Héctor Andrée Reyes Lucero

**Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano
Honduras**

Noviembre, 2019

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

Héctor Andréé Reyes Lucero

Zamorano, Honduras
Noviembre, 2019

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

Héctor Andréa Reyes Lucero

Resumen. Los objetivos de esta investigación fueron: 1. Evaluar el efecto de los medios de cultivo Murashige y Skoog (MS) a $\frac{1}{2}$ concentración de sales y Lloyd y McCown (WPM); 2. Evaluar el efecto de la combinación de AIB (Ácido indol-3-butírico) con MS completo y MS $\frac{1}{2}$; y 3. Evaluar el efecto de BAP (0.00, 1.00 y 2.00 mg/L) + AIB (0.00, 0.50 y 1.00 mg/L) en el establecimiento *in vitro* de aguacate. En todos los experimentos se evaluó el número de nudos/meristemo. En los tres experimentos se utilizó un DCA, con arreglo factorial en los experimentos 2 y 3. En el experimento 1, no se encontró diferencia significativa para ninguno de los dos tratamientos con un promedio de 5.5 nudos/meristemo. En el experimento 2 no hubo efecto de la interacción de MS \times AIB, y AIB en el número de nudos a los 30, 60 y 75 días. El tratamiento MS $\frac{1}{2}$ sin AIB presentó el mayor número de nudos/meristemo al día 60 (5.14 nudos/meristemo). En el experimento 3 no hubo efecto de la interacción BAP \times AIB a los 30 y 60 días ni del AIB al día 30. Los tratamientos 1.00 mg/L BAP y 1.00 mg/L AIB presentaron el mayor número de nudos/meristemo al día 60 (5.78 nudos/meristemo). El efecto de MS $\frac{1}{2}$ y WPM en el establecimiento de aguacate fue similar. Se obtuvo un mejor desarrollo de nudos en MS $\frac{1}{2}$ +0.5 mg/L de BAP. Los meristemos axilares presentaron un mayor número de nudos en el medio de cultivo suplementado con 1.00 mg/L de BAP o 1.00 mg/L de AIB.

Palabras clave: Fitohormonas, meristemos axilares, micropropagación, propagación *in vitro*.

Abstract. The objectives of this research were: 1. To evaluate the effect of the Murashige and Skoog (MS) growth medium at $\frac{1}{2}$ concentration of salts and Lloyd and McCown (WPM); 2. Evaluate the effect of the combination of AIB (indole-3-butyric acid) with complete MS and MS $\frac{1}{2}$; and 3. Evaluate the effect of BAP (0.00, 1.00 and 2.00 mg / L) + AIB (0.00, 0.50 and 1.00 mg / L) in the *in vitro* avocado establishment. In all experiments the number of nodes / meristem was evaluated. In all three experiments, a DCA was used, with factorial arrangement in experiments 2 and 3. In experiment 1, no significant difference was found for either of the two treatments with an average of 5.5 nodes / meristem. In experiment 2 there was no effect of the interaction of MS \times AIB, and AIB on the number of nodes at 30, 60 and 75 days. The MS $\frac{1}{2}$ treatment without AIB presented the highest number of nodes / meristem at day 60 (5.14 knots / meristem). In experiment 3 there was no effect of the BAP \times AIB interaction at 30 and 60 days nor of the AIB at day 30. The treatments 1.00 mg / L BAP and 1.00 mg / L AIB had the highest number of nodes / meristem at day 60 (5.78 knots / meristem). The effect of MS $\frac{1}{2}$ and WPM on avocado establishment was similar. Better node development was obtained in MS $\frac{1}{2}$ + 0.5 mg / L of BAP. Axillary meristems showed a greater number of nodes in the culture medium supplemented with 1.00 mg / L of BAP or 1.00 mg / L of AIB.

Keywords: Axillary meristems, *in vitro* propagation, micropropagation, phytohormones.

CONTENIDO

Portadilla.....	i
Página de firmas	ii
Resumen	iii
Contenido	iv
Índice de Cuadros y Figuras	v
1. INTRODUCCIÓN	1
2. MATERIALES Y MÉTODOS	3
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	9
4. CONCLUSIONES	15
5. RECOMENDACIONES	16
6. LITERATURA CITADA	17

ÍNDICE DE CUADROS Y FIGURAS

Cuadros	Página
1. Medio de cultivo basal de Murashige y Skoog (MS) modificado a ½ concentración de sales para el establecimiento <i>in vitro</i> de aguacate (<i>Persea americana</i> Mill.) variedad Criollo.....	5
2. Medio de cultivo basal de Murashige y Skoog modificado para el establecimiento <i>in vitro</i> de aguacate (<i>Persea americana</i> Mill.) variedad Criollo.....	6
3. Medio de cultivo de Lloyd y McCown (WPM) modificado para el establecimiento <i>in vitro</i> de aguacate (<i>Persea americana</i> Mill.) variedad Criollo.....	7
4. Número de nudos por meristemo de aguacate (<i>Persea americana</i> Mill.) variedad Criollo en etapa de establecimiento <i>in vitro</i> como respuesta a los medios de cultivo Murashige y Skoog (MS) a ½ concentración de sales y Lloyd y McCown (WPM).	10
5. ANOVA de número de nudos por meristemo de aguacate (<i>Persea americana</i> Mill.) variedad Criollo en etapa de establecimiento <i>in vitro</i> como respuesta a los Medios MS completo y a ½ concentración de sales suplementados con 0.25 mg/L de AIB.	11
6. Número de nudos por meristemo de aguacate (<i>Persea americana</i> Mill.) variedad Criollo en etapa de establecimiento <i>in vitro</i> como respuesta a los Medios MS completo y a ½ concentración con 0.5 mg/L de BAP.....	11
7. ANOVA de número de nudos por meristemo de aguacate (<i>Persea americana</i> Mill.) variedad Criollo en etapa de establecimiento <i>in vitro</i> como respuesta a las fitohormonas BAP y AIB.	13
8. Número de nudos por meristemo de aguacate (<i>Persea americana</i> Mill.) variedad Criollo en etapa de establecimiento <i>in vitro</i> como respuesta a BAP suplementado en medio MS con ½ concentración de las sales minerales.	13
9. Número de nudos por meristemo de aguacate (<i>Persea americana</i> Mill.) variedad Criollo en etapa de establecimiento <i>in vitro</i> como respuesta a AIB suplementado en medio MS con ½ concentración de sales minerales.	14

Figuras	Página
1. Aguacate (<i>Persea americana</i> Mill.) variedad Criollo. A: Plantación de aguacate criollo en la unidad de Producción de ornamentales de Zamorano. B: Meristemos axilares.	3
2. Preparación de explantes de Aguacate (<i>Persea americana</i> Mill.) variedad Criollo. A: Brotes jóvenes de la planta madre. B: Segmentos nodales listos para el proceso de desinfección. C: Segmento nodal listo para la extracción del explante. D: Meristemo axilar sembrado en el medio de cultivo.....	4
3. Brotes de aguacate (<i>Persea americana</i> Mill.) variedad Criollo a partir de meristemos axilares establecidos <i>in vitro</i> . A: Medio de cultivo MS a ½ concentración de las sales. B: Medio de cultivo WPM.....	9
4. Brotes de aguacate (<i>Persea americana</i> Mill.) a partir de meristemos axilares establecidos <i>in vitro</i> . A: Medio MS modificado ½ concentración de sales + 0.5 mg/L de BAP. B: Medio MS modificado a ½ concentración de sales + 0.5 mg/L de BAP y 0.25 mg/L de AIB. C: Medio MS con las sales completas + 0.5 mg/L de BAP. D: Medio MS con las sales completas + 0.5 mg/L de BAP y 0.25 mg/L de AIB.	10
5. Brotes de aguacate (<i>Persea americana</i> Mill.) a partir de meristemos axilares establecidos <i>in vitro</i> en medio de cultivo MS modificado a ½ concentración de sales. A: Medio sin fitohormonas. B: 1 mg/L BAP. C: 2 mg/L BAP. D: 0.5 mg/L AIB. E: 0.50 mg/L AIB + 1 mg/L BAP. F: 0.50 mg/L AIB + 2 mg/L BAP. G: 1 mg/L AIB. H: 1 mg/L AIB + 1 mg/L BAP. I: 1 mg/L AIB + 2 mg/L BAP.....	12

1. INTRODUCCIÓN

El aguacate (*Persea americana* Mill.) es una planta que pertenece a la familia Laurácea. Es una planta perenne, se caracteriza por ser de gran crecimiento vegetativo alcanzando una altura de 10 a 12 metros, posee raíces superficiales, estas hacen que el cultivo sea susceptible a la humedad que induce el ataque de hongos y pudriciones vasculares (Anacafé 2018). Esta especie comprende tres razas con distintos orígenes; la primera es originaria de México, la segunda de Guatemala y la tercera de las Antillas (Restrepo *et al.* 2017). Debido al manejo de este cultivo e importancia comercial, se considera una gran alternativa de producción en el rubro agrícola, además se ha convertido en el principal cultivo de asocio con café (Solís 2011).

En el año 2013 la FAO reportó una producción mundial de 4.71 millones de toneladas de aguacate, en donde el mayor productor es el continente americano abarcando el 70.3%, seguido está el continente africano con un 15.2% y por último Asia con un 10.9%. La producción de aguacate se encuentra principalmente en países de América, donde México, República Dominicana, Colombia y Perú son los principales productores de este fruto alrededor del mundo. Siendo el mayor exportador de este fruto México, con un promedio de 1.45 millones de toneladas anualmente.

Debido a la importancia comercial que tiene el aguacate, se han ido creando programas de mejoramiento para incorporar resistencia a enfermedades y otras características deseables en el árbol frutal, sin embargo, estos programas tienen la desventaja de ser tardados y meticulosos debido al largo periodo juvenil y heterocigosidad de la especie (Ben-Ya'acov 1987; Pliego-Alfaro *et al.* 1999). De igual manera, el uso de portainjertos a partir de semillas se ve afectado, esto no garantiza homogeneidad genética ni un comportamiento estable en campo. Sin embargo, utilizando este método de propagación, permite obtener portainjertos bien adaptados a condiciones bióticas y abióticas en el lugar donde se desea establecer la plantación (Ben-Ya'acov 1987; Bernal y Díaz 2008).

La propagación del aguacate se ha logrado mediante injertos, este método es el más usado a nivel mundial y consiste en acoplar una yema de alguna variedad mejorada sobre un patrón que muestre características como resistencia y adaptación a condiciones ambientales desfavorables (DANE 2015), esta técnica de propagación puede llegar a ser costosa y consumir mucho tiempo, debido a esto, es necesario buscar y desarrollar otros métodos de propagación para este cultivo (Barceló-Muñoz *et al.* 1999).

El uso de alternativas como la biotecnología pueden ser de gran interés en programas de mejoramiento y propagación de aguacate libre de enfermedades. La micropropagación permite la producción masiva de plántulas en un periodo breve de tiempo, bajo condiciones

controladas, en espacios relativamente pequeños y con poca mano de obra, además de obtener plantas sanas y estabilidad genética (Barceló-Muñoz *et al.* 1999). Diversos cultivares de aguacate se han establecido a partir de segmentos nodales como meristemo axilares y apicales, embriones inmaduros, varetas y microestacas (Dalsaso y Guevara 1988; Barceló-Muñoz *et al.* 1999; Ibarra López 2015).

La micropropagación también presenta algunas dificultades al momento de realizarla, como la contaminación, fenolización y lograr el establecimiento aséptico de los explantes. Por lo que han realizado investigaciones para determinar los medios de cultivo adecuados y los reguladores de crecimiento que presentan mejores resultados. Ibarra (2015) en su investigación utilizó los medios de cultivo Murashige y Skoog (MS), Gupta y Durzan (DCR) y Lloyd y McCown (WPM) para el establecimiento de microestacas con meristemos axilares de aguacate.

La citocinina mayormente utilizada para el establecimiento *in vitro* de aguacate es el BAP (6-Bencilaminopurina) a concentraciones de 0.1 hasta 2.0 mg/L, la función de esta fitohormona es promover el crecimiento y multiplicación de brotes (Pliego-Alfaro *et al.*, 1999; Barceló-Muñoz *et al.* 1999; Rodríguez *et al.* 1999). El AIB (Ácido indol-3-butírico) es la auxina que más se utiliza para la inducción de raíces y combinada con citocininas para la iniciación de brotes en la propagación *in vitro* (Ibarra López 2015).

Los objetivos de este estudio fueron:

- Evaluar el efecto de los medios de cultivo Murashige y Skoog (MS) a ½ concentración de las sales y el medio Lloyd y McCown (WPM) en el establecimiento *in vitro* de aguacate.
- Evaluar el efecto del medio MS completo y a ½ concentración de sales y el AIB (Ácido indol-3-butírico) en el establecimiento *in vitro* de aguacate.
- Evaluar el efecto de BAP y AIB en el establecimiento de meristemos axilares de aguacate *in vitro*.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Ubicación.

El estudio se llevó a cabo 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.

Se utilizaron meristemos axilares los cuales se extrajeron de plantas jóvenes de aguacate variedad Criollo provenientes de la Unidad de Producción de Ornamentales de la Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano (Figura 1).

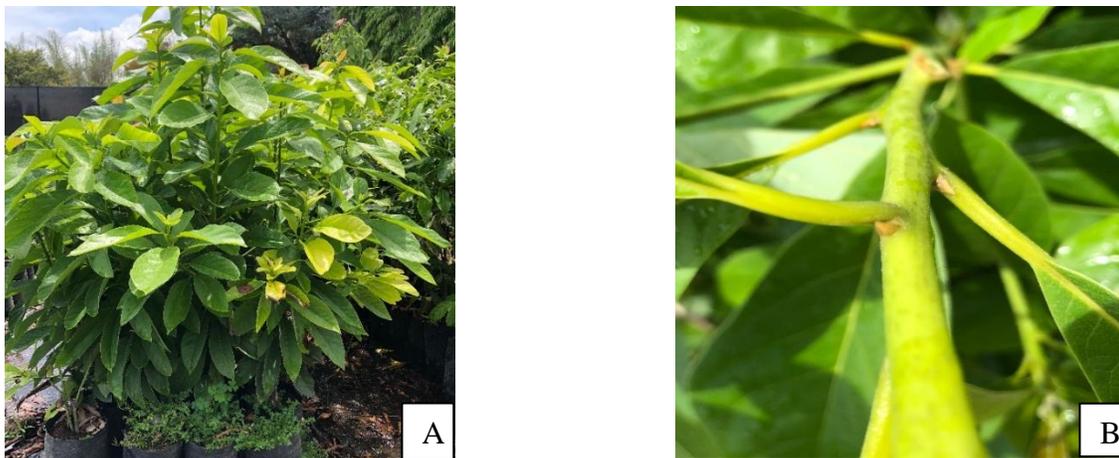


Figura 1. Aguacate (*Persea americana* Mill.) variedad Criollo. A: Plantación de aguacate criollo en la unidad de Producción de ornamentales de Zamorano. B: Meristemos axilares.

Desinfección superficial del material vegetal.

El material vegetal se llevó al Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales, una vez ahí, se procedió a remover las hojas sin dañar los explantes (Figura 2). Luego se realizó la separación en segmentos nodales para poder manipularlos de mejor manera, después estos se introdujeron en un beaker y se lavaron con agua y jabón. A continuación, se desinfectaron con Etanol al 70% por diez segundos, se sumergieron en una solución de NaClO al 20% (v/v) (4.72% ingrediente activo) con dos gotas de TweenTM80 por cada 100 mL de solución y se dejó reposar por 10 minutos. Por último, se trasladaron a la cámara de flujo laminar y se lavaron tres veces con agua destilada estéril.

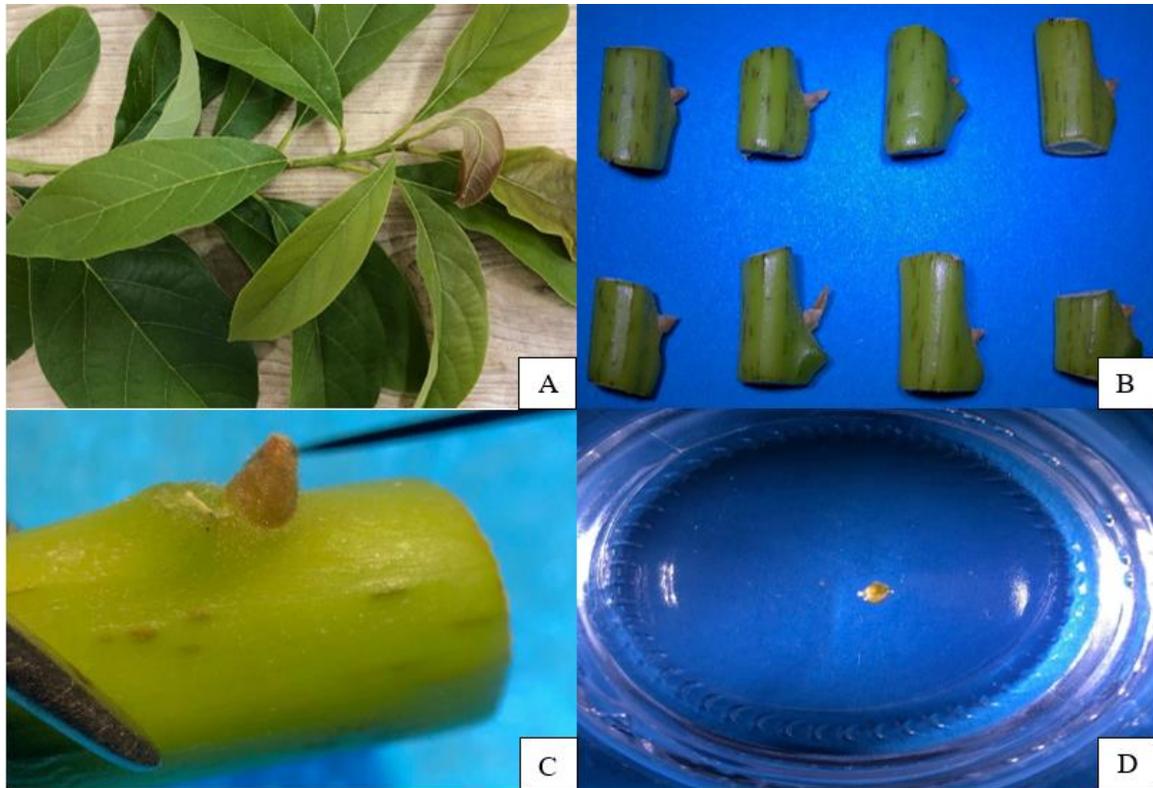


Figura 2. Preparación de explantes de aguacate (*Persea americana* Mill.) variedad Criollo. A: Brotes jóvenes de la planta madre. B: Segmentos nodales listos para el proceso de desinfección. C: Segmento nodal listo para la extracción del explante. D: Meristemo axilar sembrado en el medio de cultivo.

Medio de cultivo.

Para la elaboración del medio se basó en el procedimiento descrito por Blanco Anleu (2017). En la investigación se evaluaron tres medios de cultivo, uno fue Murashige y Skoog con la concentración de sales a la mitad (Cuadro 1), otro fue el mismo medio con la concentración de sales completa (Cuadro 2) y el tercero fue el medio de Lloyd y McCown (Cuadro 3). Cada uno de estos medios fue suplementado con fitohormonas según los tratamientos a evaluar. Se ajustó el pH de todos los medios a 5.8, para esto se utilizó hidróxido de potasio (KOH) como agente alcalinizador o ácido clorhídrico (HCL) como agente acidificante. Para la solidificación de los medios se utilizó Phytigel[®] (1.8 g/L). La esterilización de los medios se realizó a 121 °C, 1 kg/cm² por 20 minutos. En los tres experimentos se hizo refrescamiento de medios de cultivo cada 21 días.

Cuadro 1. Medio de cultivo basal de Murashige y Skoog (MS) modificado a 1/2 concentración de sales para el establecimiento *in vitro* de aguacate (*Persea americana* Mill.) variedad Criollo.

Componentes	Formula	Nombre	mg/L
Macroelementos	NH ₄ NO ₃	Nitrato de amonio	825.0000
	KNO ₃	Nitrato de potasio	950.0000
	MgSO ₄ .7H ₂ O	Sulfato de magnesio heptahidratado	185.0000
	CaCl ₂ .2H ₂ O	Cloruro de calcio bihidratado	220.0000
	KH ₂ PO ₄	Fosfato monobásico de potasio	85.0000
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 Manganeseo tetrahidratado	11.1500
	Na ₂ MoO ₄ .7H ₂ O	Molibdato de sodio heptahidratado	0.1250
	ZnSO ₄ .7H ₂ O	Sulfato de zinc heptahidratado	4.3000
	FeNa EDTA	Sal férrica sódica de ácido etilendiaminotetraacético	25.0000
Vitaminas		Inositol	100.0000
		Tiamina	0.5000
		Piridoxina	0.5000
		Ácido nicotínico	0.4000
Carbohidrato		Sacarosa	30000.0000

Fuente: Kyte 1987

Cuadro 2. Medio de cultivo basal de Murashige y Skoog modificado para el establecimiento *in vitro* de aguacate (*Persea americana* Mill.) variedad Criollo.

Componentes	Formula	Nombre	mg/L	
Macroelementos	NH ₄ NO ₃	Nitrato de amonio	1650.0000	
	KNO ₃	Nitrato de potasio	1900.0000	
	MgSO ₄ .7H ₂ O	Sulfato de magnesio heptahidratado	370.0000	
	CaCl ₂ .2H ₂ O	Cloruro de calcio bihidratado	440.0000	
	KH ₂ PO ₄	Fosfato monobásico de potasio	170.0000	
Microelementos	H ₃ BO ₃	Ácido bórico	6.2000	
	CoCl ₂ .6H ₂ O	Cloruro de cobalto hexahidratado	0.0250	
	CuSO ₄ .5H ₂ O	Sulfato de cobre pentahidratado	0.0250	
	KI	Yoduro de potasio	0.8300	
	MnSO ₄ .4H ₂ O	Sulfato de Manganeso tetrahidratado	22.3000	
	Na ₂ MoO ₄ .7H ₂ O	Molibdato de sodio heptahidratado	0.2500	
	ZnSO ₄ .7H ₂ O	Sulfato de zinc heptahidratado	8.6000	
	FeNa EDTA	Sal férrica sódica de ácido etilendiaminotetraacético	50.0000	
	Vitaminas		Inositol	100.0000
			Tiamina	0.5000
		Piridoxina	0.5000	
		Ácido nicotínico	0.4000	
Carbohidrato		Sacarosa	30000.0000	

Fuente: Kyte 1987

Cuadro 3. Medio de cultivo de Lloyd y McCown (WPM) modificado para el establecimiento *in vitro* de aguacate (*Persea americana* Mill.) variedad Criollo.

Componentes	Formula	Nombre	mg/L
Macroelementos	NH ₄ NO ₃	Nitrato de amonio	400.0000
	CaCl ₂ .2H ₂ O	Cloruro de calcio bihidratado	96.0000
	MgSO ₄ .7H ₂ O	Sulfato de magnesio heptahidratado	370.0000
	KH ₂ PO ₄	Fosfato monobásico de potasio	170.0000
	Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	Nitrato de calcio tetrahidratado	556.0000
	K ₂ SO ₄	Sulfato potásico	990.0000
	Microelementos	H ₃ BO ₃	Ácido bórico
MnSO ₄ .H ₂ O		Sulfato de manganeso monohidratado	22.3000
ZnSO ₄ .7H ₂ O		Sulfato de zinc heptahidratado	8.6000
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O		Molibdato de sodio bihidratado	0.0250
CuSO ₄ .5H ₂ O		Sulfato de cobre pentahidratado	0.0250
FeSO ₄ .7H ₂ O		Sulfato ferroso heptahidratado	27.8000
FeNa EDTA		Sal férrica sódica de ácido etilendiaminotetraacético	37.3000
Vitaminas			Inositol
		Tiamina	1.0000
		Piridoxina	0.5000
		Ácido nicotínico	0.5000
Carbohidrato		Sacarosa	20000.0000

Fuente: Kyte 1987

Experimento 1. Evaluación de la respuesta de los meristemos axilares al medio de cultivo de Murashige y Skoog (MS) y Lloyd y McCown (WPM).

Los tratamientos a evaluar en este experimento fueron:

1. Medio Murashige y Skoog (MS) a ½ concentración de sales.
2. Medio Lloyd y McCown (WPM).

Los explantes permanecieron en estos medios por 42 días, al día 43 fueron colocados en medio MS suplementado con dosis de 0.50 mg/L de BAP + 0.25 mg/L de AIB.

Variable evaluada. Número de nudos formados por explante. El conteo se realizó al día 30, 60, 75 y 85.

Diseño Experimental. Se utilizó un Diseño Completamente al Azar (DCA) con 40 repeticiones por tratamiento.

Análisis Estadístico. Se usó la Prueba “T Student” ($P \leq 0.05$). Se usó el programa estadístico InfoStat versión 2018.

Experimento 2. Efecto de la concentración de sales del medio MS, BAP y AIB en el establecimiento *in vitro* de meristemos axilares de aguacate (*Persea americana* Mill.) variedad Criollo.

Los tratamientos a evaluar en este segundo experimento fueron el medio de cultivo de Murashige y Skoog (MS) completo y a ½ concentración de sales (Cuadro 1 y 2) ambos suplementados con 0.5 mg/L BAP (6-bencilaminopurina) y dos tratamientos, uno sin AIB y otro con 0.25 mg/L de AIB.

Se evaluaron cuatro tratamientos, utilizando dos concentraciones de sales del medio MS combinados con 0.00 o 0.25 mg/L de AIB.

Variable evaluada. Número de nudos formados por explante. El conteo se realizó al día 30, 60 y 75.

Diseño Experimental. Se utilizó un Diseño Completamente al Azar (DCA) con un arreglo factorial de 2×2 (2 medios de cultivo × 2 dosis de AIB) con 25 repeticiones por tratamiento.

Análisis Estadístico. Se utilizó un análisis de varianza con separación de medias por el método Duncan ($P \leq 0.05$). Se usó el programa estadístico InfoStat versión 2018.

Experimento 3. Respuesta de los meristemos axilares de aguacate (*Persea americana* Mill.) variedad Criollo a las fitohormonas BAP (6-bencilaminopurina) y AIB (ácido indol-3-butírico).

En este tercer experimento se evaluó el efecto del medio de cultivo Murashige y Skoog (MS) a ½ concentración de sales suplementado con BAP (6-bencilaminopurina) + AIB (ácido indol-3-butírico).

Se evaluaron nueve tratamientos, combinando de 0.00, 1.00 o 2.00 mg/L de BAP con 0.00, 0.50 o 1.00 mg/L de AIB.

Variable evaluada. Se midió el número de nudos formados por explante. El conteo se realizó al día 30 y 60.

Diseño Experimental. Se utilizó un Diseño Completamente al Azar (DCA) con un arreglo factorial de 3×3 (3 dosis de BAP × 3 dosis de AIB) con 25 repeticiones por tratamiento.

Análisis Estadístico. Se utilizó un análisis de varianza con separación de medias por el método Duncan ($P \leq 0.05$). Se usó el programa estadístico InfoStat versión 2018.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Experimento 1. Evaluación de la respuesta de los meristemos axilares al medio de cultivo de Murashige y Skoog (MS) y Lloyd y McCown (WPM).

La contaminación en este experimento no sobrepasó el 15%. A 10 días del establecimiento los explantes presentaron el mayor porcentaje de contaminación, que probablemente fue inducida por hongos y bacterias. Rodríguez *et al.* (1999) en su investigación alcanzaron porcentajes de contaminación hasta del 47%, utilizando embriones inmaduros de aguacate variedades Hass, Suardía, Estación, Catalina y Jaruco.

A los 21 días del establecimiento, se observó una mortalidad menor al 5% en los dos tratamientos. Los meristemos axilares de aguacate iniciaron el desarrollo de nudos a los 30 días del establecimiento (Figura 3).

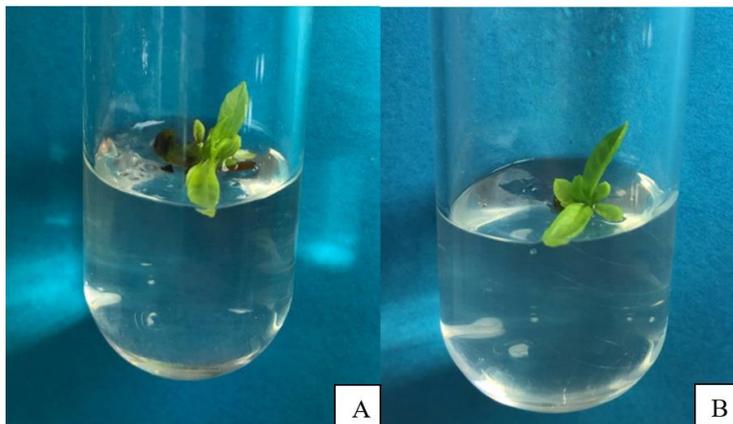


Figura 3. Brotes de aguacate (*Persea americana* Mill.) variedad Criollo a partir de meristemos axilares establecidos *in vitro*. A: Medio de cultivo MS a $\frac{1}{2}$ concentración de las sales. B: Medio de cultivo WPM.

Al día 43 los explantes se pasaron a medio MS suplementado con 0.50 mg/L de BAP + 0.25 mg/L de AIB, se observó desarrollo de nudos en los dos tratamientos. Sin embargo, estos no presentaron diferencia significativa (Cuadro 4). Estos datos concuerdan con Blanco Anleu (2017) en donde no se observó una diferencia significativa a los 28 días del establecimiento utilizando dosis de 0.5 mg/L de BAP y 0.5 mg/L de Ácido Giberélico (AG₃).

Cuadro 4. Número de nudos por meristemo de aguacate (*Persea americana* Mill.) variedad Criollo en etapa de establecimiento *in vitro* como respuesta a los medios de cultivo Murashige y Skoog (MS) a ½ concentración de sales y Lloyd y McCown (WPM).

Medio de cultivo	Unidades Experimentales	DÍAS			
		30	60	75	85
½ MS	40	1.63 ^{n.s.}	3.65 ^{n.s.}	4.75 ^{n.s.}	5.43 ^{n.s.}
WPM	41	1.15	3.49	4.63	5.66
Valor <i>t</i>		1.65	0.60	0.35	0.67
Probabilidad		0.1028	0.5476	0.7271	0.5077

^{n.s.} No significativo ($P > 0.05$).

Experimento 2. Efecto de la concentración de sales del medio MS, BAP y AIB en el establecimiento *in vitro* de meristemos axilares de aguacate (*Persea americana* Mill.) variedad Criollo.

A los 21 días del establecimiento, en este experimento se observó una mortalidad en promedio del 38% en los cuatro tratamientos. Los meristemos axilares sobrevivientes de aguacate desarrollaron nudos al día 30 del establecimiento (Figura 4).

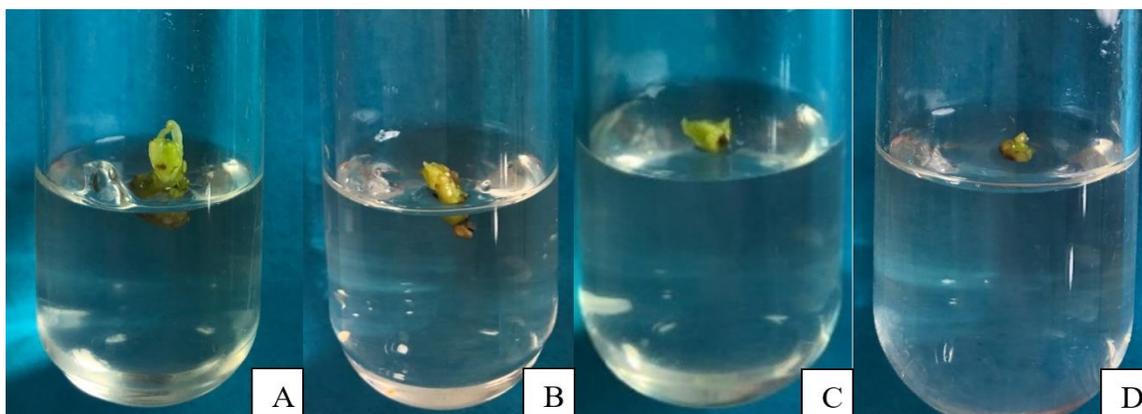


Figura 4. Brotes de aguacate (*Persea americana* Mill.) a partir de meristemos axilares establecidos *in vitro*. A: Medio MS modificado a ½ concentración de sales + 0.5 mg/L de BAP. B: Medio MS modificado a ½ concentración de sales + 0.5 mg/L de BAP y 0.25 mg/L de AIB. C: Medio MS con las sales completas + 0.5 mg/L de BAP. D: Medio MS con las sales completas + 0.5 mg/L de BAP y 0.25 mg/L de AIB.

Para la variable número de nudos al día 30 no hubo efecto del Medio, del AIB ni de la interacción entre ambos. Al día 60 hubo efecto del Medio, pero no del AIB, ni para la interacción entre ambos. Al día 75 no hubo efecto del Medio, del AIB ni de la interacción entre ambos (Cuadro 5). En la variable número de nudos el tratamiento que presentó un mayor promedio fue el medio MS modificado a ½ concentración de sales y suplementado con 0.5 mg/L de BAP (Cuadro 6). Estos datos concuerdan con Dalsaso y Guevara (1988)

en donde dosis crecientes de BAP estimularon el crecimiento y desarrollo de nudos en yemas de aguacate, además de contrarrestar parcialmente el efecto oxidativo del Ácido Giberélico (AG₃). Estudios realizados por Rodríguez *et al.* (1999) presenta similitudes, quienes obtuvieron formación de nudos en los meristemas con la adición de BAP y AG₃.

Cuadro 5. ANOVA de número de nudos por meristemo de aguacate (*Persea americana* Mill.) variedad Criollo en etapa de establecimiento *in vitro* como respuesta a los Medios MS completo y a ½ concentración de sales suplementados con 0.25 mg/L de AIB.

Factores	DÍAS		
	30	60	75
Medio	n.s.	*	n.s.
AIB	n.s.	n.s.	n.s.
Medio × AIB	n.s.	n.s.	n.s.
Probabilidad	0.6131	0.0121	0.1057
Coefficiente de variación	6.33	3.88	3.57
R ²	0.03	0.20	0.11

n.s. No significativo (P > 0.05).

* Significativo (P ≤ 0.05).

Cuadro 6. Número de nudos por meristemo de aguacate (*Persea americana* Mill.) variedad Criollo en etapa de establecimiento *in vitro* como respuesta a los medios MS completo y a ½ concentración de sales con 0.5 mg/L de BAP.

Medio	DÍAS		
	30	60	75
½ MS	3.33 ^{n.s.}	5.14 a [¥]	6.19 ^{n.s.}
MS	2.82	4.00 b	5.64
Probabilidad	0.6610	0.0021	0.2342
Coefficiente de variación	6.33	3.88	3.57
R ²	0.24	0.25	0.26

n.s. No significativo (P > 0.05).

¥ Los tratamientos con distintas letras en la misma columna son significativamente diferentes, según el método Duncan (P ≤ 0.05).

Experimento 3. Respuesta de los meristemos axilares de aguacate (*Persea americana* Mill.) variedad Criollo a las fitohormonas BAP (6-bencilaminopurina) y AIB (ácido indol-3-butírico).

En este experimento el promedio de porcentaje de contaminación fue del 40%. No se observó mortalidad. Los meristemos axilares presentaron un aumento en su tamaño al día 21, al día 30 del establecimiento estos presentaron desarrollo de nudos.

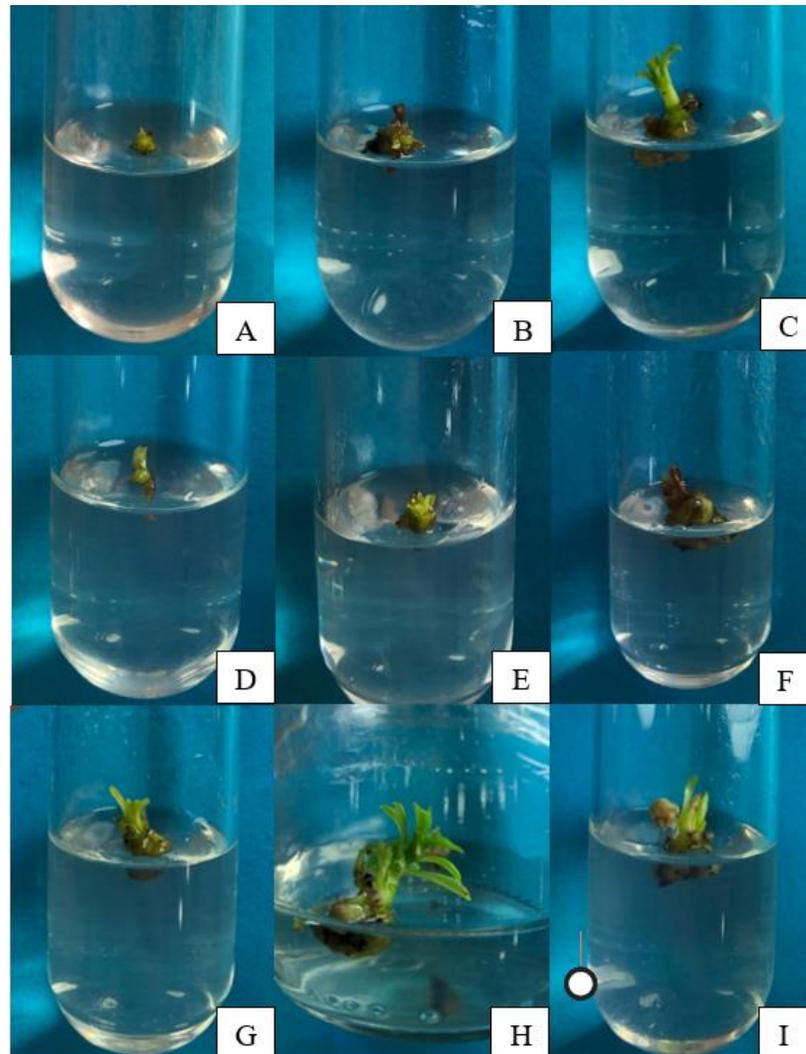


Figura 5. Brotes de aguacate (*Persea americana* Mill.) a partir de meristemos axilares establecidos *in vitro* en medio de cultivo MS modificado a $\frac{1}{2}$ concentración de sales. A: Medio sin fitohormonas. B: 1 mg/L BAP. C: 2 mg/L BAP. D: 0.5 mg/L AIB. E: 0.50 mg/L AIB + 1 mg/L BAP. F: 0.50 mg/L AIB + 2 mg/L BAP. G: 1 mg/L AIB. H: 1 mg/L AIB + 1 mg/L BAP. I: 1 mg/L AIB + 2 mg/L BAP.

En la variable número de nudos al día 30 hubo efecto del BAP, pero no del AIB, ni de la interacción entre ambos. Al día 60 no hubo efecto en la interacción, pero sí en los tratamientos por separado BAP y AIB (Cuadro 7). En la variable número de nudos los mejores tratamientos fueron los suplementados con 1 mg/L de BAP y 1 mg/L de AIB (Cuadro 8 y 9). Peixoto *et al.* (2010) en su investigación reportan un promedio de cuatro nudos por meristemo en cítricos, utilizando distintas combinaciones de dosis de reguladores de crecimiento como BAP y AG₃. Estos datos nos indican que tanto BAP como AIB en concentraciones relativamente bajas son capaces de inducir un elevado número de nudos por meristemo en su etapa de crecimiento.

Cuadro 7. ANOVA de número de nudos por meristemo de aguacate (*Persea americana* Mill.) variedad Criollo en etapa de establecimiento *in vitro* como respuesta a las fitohormonas BAP y AIB.

Factores	DÍAS	
	30	60
BAP	*	*
AIB	n.s.	*
BAP × AIB	n.s.	n.s.
Probabilidad	0.0055	0.0032
Coefficiente de variación	6.98	6.22
R ²	0.28	0.30

^{n.s.} No significativo ($P > 0.05$).

* Significativo ($P \leq 0.05$).

Cuadro 8. Número de nudos por meristemo de aguacate (*Persea americana* Mill.) variedad Criollo en etapa de establecimiento *in vitro* como respuesta a BAP suplementado en medio MS a ½ concentración de las sales minerales.

BAP mg/L	DÍAS	
	30	60
0.00	2.31 b [¥]	3.81 b
1.00	4.70 a	5.78 a
2.00	3.78 a	4.90 ab
Probabilidad	0.0004	0.0031
Coefficiente de variación	6.98	6.22
R ²	0.28	0.29

[¥] Los tratamientos con distintas letras en la misma columna son significativamente diferentes, según la prueba DUNCAN ($P \leq 0.05$).

Cuadro 9. Número de nudos por meristemo de aguacate (*Persea americana* Mill.) variedad Criollo en etapa de establecimiento *in vitro* como respuesta a AIB suplementado en medio MS con ½ concentración de las sales minerales.

AIB mg/L	DÍAS	
	30	60
0.00	3.21 ^{n.s.}	4.35 b [¥]
0.50	3.60	4.45 b
1.00	3.97	5.69 a
Probabilidad	0.4020	0.0334
Coefficiente de variación	6.98	6.22
R ²	0.28	0.29

^{n.s.} No significativo ($P > 0.05$).

[¥] Los tratamientos con distintas letras en la misma columna son significativamente diferentes, según la prueba DUNCAN ($P \leq 0.05$).

4. CONCLUSIONES

- Los medios de cultivo MS y WPM presentaron efecto en el desarrollo de brotes, sin embargo, no se observó diferencia significativa entre ambos, lo cual indica que se pueden establecer meristemos de aguacate en cualquiera de los dos.
- Se obtuvo un mayor efecto en el desarrollo de nudos y brotes en el medio MS a $\frac{1}{2}$ concentración de sales suplementado con 0.5 mg/L de BAP sin AIB.
- Los meristemos axiles presentaron un mayor número de nudos en el medio de cultivo MS a $\frac{1}{2}$ concentración de sales suplementado con 1.00 mg/L de BAP o 1.00 mg/L de AIB.

5. RECOMENDACIONES

- Utilizar dosis mayores de BAP en combinación con AIB para promover un elevado número de brotes.
- Continuar con el desarrollo de los explantes *in vitro* hasta la aclimatación.
- Establecer los meristemos de aguacate en medio MS a ½ concentración de sales suplementado con dosis de 0.50 o 1.00 mg/L de BAP.

6. LITERATURA CITADA

- Anacafé. 2018. Características del cultivo de aguacate. [Consultado 2018 Nov 28]. https://www.anacafe.org/glifos/index.php/Cultivo_de_aguacate
- Barceló-Muñoz A, Encina C, Pérez E, Pliego F. 1999. Micropropagation of adult avocado. Málaga, España. [consultado el 19 de jul. de 2019]. <file:///D:/OneDrive%20-%20Zamorano/Documents/Tesis/Documentos%20en%20web/Barceló%20muñoz%201999.pdf>
- Ben-Ya'acov, A. 1987. Avocado rootstock-scion relationships. Israel. [consultado el 19 de jul. de 2019]. <http://209.143.153.251/wac1/wac1-p030.pdf>
- Bernal J, Díaz C. 2008. Tecnología para el cultivo del aguacate. Rionegro, Antioquia, Colombia; Centro de investigación Rionegro. 48 p. [consultado el 31 de jul. de 2019]. <https://conectarural.org/sitio/sites/default/files/documentos/tecnologacultivoaguacate.pdf>
- Blanco Anleu JA. 2017. Establecimiento *in vitro* de Aguacate (*Persea americana* Mill.) variedad Criollo. Honduras: Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano. 3 p. [consultado el 06 de mayo de 2019]. <https://bdigital.zamorano.edu/bitstream/11036/6080/1/CPA-2017-022.pdf>
- Dalsaso L, Guevara E. 1988. Multiplicación clonal *in vitro* del aguacate (*Persea americana*) cv. "Fuerte". San José, Costa Rica. [consultado el 22 de jul. de 2019]. <file:///D:/OneDrive%20-%20Zamorano/Documents/Tesis/Documentos%20en%20web/Dalsaso.pdf>
- DANE, Departamento Administrativo Nacional de Estadística. 2015. El cultivo del aguacate (*Persea americana* Miller.), fruta de extraordinarias propiedades alimenticias, curativas e industriales. Colombia. [consultado el 19 de jul. de 2019].

https://www.dane.gov.co/files/investigaciones/agropecuario/sipsa/Bol_Insumos_ocr_2015.pdf

- FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2013. FAOSTAT Base de datos. [consultado el 22 de mayo de 2019]. https://revistas.unal.edu.co/index.php/acta_agronomica/article/view/61474/67735
- Ibarra López A. 2015. Organogénesis de cuatro cultivares de aguacate (*Persea americana* Mill.). México: Universidad Autónoma de Nuevo León. 2-23-47-40 p. [consultado el 24 de jul. de 2019]. <http://eprints.uanl.mx/11012/1/1080212629.pdf>
- 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 el 29 de agosto de 2019]. 5(7):654-660. <http://www.scielo.br/pdf/pab/v45n7/04.pdf>
- Pliego-Alfaro F, Muñoz B, Pérez S, De la Viña N, Sánchez C, Perán, R. 1999. La micropropagación en la mejora de aguacate (*Persea americana* Mill.): problemas y limitaciones. Málaga, España. [consultado el 19 de jul. de 2019]. http://www.avocadosource.com/WAC4/WAC4_p239.pdf
- Restrepo C, Gómez F, Gil A, Torres A, Urrea A. 2017. *In vitro* propagation of avocado (*Persea americana* Mill.) cv. Hass through morphogenesis. *Acta agronómica*, vol. 67, no. 1, 2018. Universidad Nacional de Colombia Sede Palmira. [Consultado 2019 mayo 29]. https://revistas.unal.edu.co/index.php/acta_agronomica/article/view/61474/67735
- Rodríguez N, Capote M, Zamora V. 1999. Cultivo *in vitro* del aguacatero (*Persea americana* Mill.). *Revista Chapingo Serie Horticultura*. [consultado el 23 de jul. de 2019]. 5: 231-237. http://www.avocadosource.com/wac4/wac4_p231.pdf
- Solís M. 2011. Manual de aguacate buenas prácticas de cultivo variedad Hass. San José, Costa Rica. [consultado el 15 de mayo de 2019]. <http://www.mag.go.cr/bibliotecavirtual/F01-4259.pdf>
- Zulfiqar B, Abbasi N, Ahmad T, Ahmed I. 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.* [Consultado el 25 de jul. de 2019]. 41(5): 2333-2346. <https://pdfs.semanticscholar.org/6857/306dc3a9af5f8ef7c2f0fd7e77868e05e3a3.pdf>