

MULTIPLICACION CLONAL *in vitro* DEL AGUACATE (*Persea americana*) cv. 'Fuerte'¹

Ligia Dalsaso *
Eric Guevara *

ABSTRACT

In vitro clonal multiplication of avocado (*Persea americana*) cv. 'Fuerte'. The *in vitro* regeneration and multiplication of avocado, cv. 'Fuerte', through axillary buds and microcuttings of adult grafted plants, was studied. Three growth regulators (BAP, IBA, GA₃) and two culture media (MS, N45K) were evaluated. Good shoot regeneration was obtained with the combination of 2.0 mg/L BAP and 0.5 mg/L IBA in a N45K medium. GA₃ inhibited growth and induced the oxidation of the explants. After elongation of the shoot, the axillary buds developed and formed new shoots. These can be excised and subcultured starting the multiplication process. The use of an antioxidant (PVP) improved the response of the explant in repeated subcultures. Depending on the type of explant, differences were observed in the morphology of the regenerated shoots. Starting with axillary buds, the shoots were morphologically similar to shoots developed from seed. With microcuttings the leaves were broad and the shoot morphology similar to adult trees. In both explants the aptitude to regenerate shoots varied through the year. With microcuttings the elimination of bacterial contaminants was more difficult. The influence of the PVP in the decrease of oxidation, and its influence on the availability of BAP for the explants, are discussed.

INTRODUCCION

El aguacate (*P. americana*) es una especie cultivada en grandes áreas del trópico y subtropico. En la actualidad, su expansión se ha visto limitada por la pudrición radical que causa *Phytophthora cinnamoni*. Por el potencial de exportación y valor alimenticio de la fruta, se ha buscado fomentar su cultivo en zonas superiores a los 1200 msnm, y

evitar el factor limitante del hongo en la zona baja (Hernández, 1983).

Si bien el aguacate ha sido propagado en forma rutinaria por injerto y se ha investigado su propagación por estacas recientemente (Ya'Acov, 1986), las técnicas *in vitro* ofrecen una alternativa rápida de multiplicación de nuevas variedades y patrones (George y Sherrington, 1984). Se ha tenido éxito con material juvenil, pero no con material adulto (Villegas, 1985). La formación de brotes a partir de yemas apicales o laterales induce la menor variabilidad genética y tiene la ventaja de requerir únicamente el alargamiento del brote y la diferenciación de raíces (Hu y Wang, 1983; Villegas, 1985). Se han obtenido resultados positivos en la regeneración de tallos a partir de microestacas

1/ Recibido para publicación el 13 de setiembre de 1988.
* Centro de Investigaciones Agronómicas, Universidad de Costa Rica. San José, Costa Rica. El segundo autor es miembro del Programa de Apoyo Financiero a Investigadores Científicos del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de Costa Rica (CONICIT).

(Nel *et al.*, 1983; González y Salazar, 1984; Young, 1984; Barceló-Muñoz y Pliego-Alfaro, 1986). Sin embargo, no existe una metodología establecida para una propagación efectiva. La obtención de raíces ha sido difícil (Nel y Kotze, 1982; Napoliane, 1984; Barceló-Muñoz y Pliego-Alfaro, 1986) y en forma esporádica (Schroeder, 1980) o bien, en explantes muy jóvenes provenientes de semilla. En algunos casos no se ha tenido acceso a la información (Nel *et al.*, 1983; Young, 1984). En Costa Rica, la Estación Experimental Fabio Baudrit Moreno posee, en su subestación de Fraijanes, una colección importante de variedades de aguacate. Su utilización ha sido muy limitada, por no disponerse de métodos adecuados de propagación. El objetivo del presente trabajo fue investigar la posibilidad de cultivar el aguacate *in vitro* a partir de yemas y microestacas, con el fin de obtener un sistema de multiplicación rápido y eficiente así como la conservación del material obtenido en condiciones asépticas.

MATERIALES Y METODOS

Material vegetal

Se utilizaron plantas adultas e injertadas de la variedad 'Fuerte'. Las plantas adultas están localizadas en la Estación Experimental de Fraijanes. Las plantas injertadas se mantuvieron en el invernadero del Centro de Investigaciones Agronómicas de la Facultad de Agronomía en San Pedro.

Se utilizaron yemas apicales y axilares, así como microestacas. Las primeras, de una dimensión de 3 a 5 mm, están constituidas por el meristemo y dos o tres primordios foliares. Las segundas están formadas por secciones herbáceas del árbol compuestas por un nudo con su yema axilar y porciones de entrenudo de 0,5 cm, tanto en la parte superior como la inferior.

Desinfección

En el caso de las yemas se estableció el siguiente procedimiento: Porciones del vegetal con yemas son colocadas en agua corriendo durante treinta minutos. Luego son inmersas en alcohol de 95° por espacio de un minuto, y enjuagadas repetidas veces con agua destilada. Los fragmentos son posteriormente colocados en una solución con 2 g/L de Difolatán; 2 g/L de Agrimycin y 3 gotas de Tween 80 y en agitación por de 15 minutos. Son nuevamente enjuagados con agua destilada, y colocados en agitación magnética por 20 minutos en una

solución de hipoclorito de sodio al 0,75% con tres gotas de Tween 80. Finalmente, en condiciones asépticas, son lavados tres veces en agua destilada estéril. Las yemas son extraídas y disectadas, dejando el meristemo y dos a tres primordios foliares, y depositadas sobre el medio de cultivo.

En el cultivo de microestacas el procedimiento fue el mismo, con excepción del empleo de cloruro mercurico al 0,15% en vez del hipoclorito de sodio. El tiempo de desinfección varía según la época de cultivo (8 a 20 minutos). Luego de un enjuague en agua destilada estéril, se procede a la disección del material vegetal, removiendo las porciones oxidadas en ambos extremos de la microestaca. Estas son entonces colocadas en agitación durante 45 minutos, en una solución de PVP estéril, preparada de acuerdo al procedimiento descrito por Gupta *et al.* (1980). Finalmente, son enjuagadas tres veces en agua destilada estéril y depositadas sobre el medio de cultivo.

Medio de cultivo

Durante las tres primeras semanas de cultivo se utilizó el medio de Murashige y Skoog o MS (1962), con 30 g/L de sacarosa. Posteriormente, los explantes fueron transferidos al medio N45K (Margara, 1983), en donde se mantuvieron, renovando cada tres semanas el medio. En cada medio de cultivo utilizado se estudió la influencia de diferentes reguladores de crecimiento: O; 1; 2; 4 y 6 mg/L de 6-bencilaminopurina (BAP); O; 0,5 y 1 mg/L de ácido indol-butírico (AIB) y O; 0,5 y 1 mg/L de ácido giberélico (AG₃).

El pH del medio se ajustó en todos los casos a 5,8. Según el tratamiento éste se solidificó con 1,6 g/L de Gelrite o bien se utilizó en forma líquida con puentes de papel. Todos los ingredientes se agregaron antes del autoclavado. Este se realizó a una presión de 1,5 kg/cm² a 121°C durante 20 minutos.

Condiciones de cultivo

Los explantes fueron depositados inicialmente en tubos de ensayo de 150 x 18 mm y 150 x 25 mm. Cuando se observó alargamiento del material vegetal, se transfirió a frascos tipo Gerber. La incubación de los cultivos se realizó en un cuarto de crecimiento (3500 lux, 22-26°C; fotoperíodo de 12 horas; 60-80% de humedad relativa). Se estudió la respuesta de los explantes a través del grado de oxidación y contaminación de los cultivos, la formación de callo, el crecimiento y la altura de los tallos formados.

RESULTADOS

Cultivos a partir de yemas Interacción de diferentes reguladores en el medio de cultivo inicial. Los primeros ensayos se dirigieron a establecer la necesidad de los reguladores BAP y AG₃, mencionados como necesarios por otros autores (Barceló-Muñoz y Pliego-Alfaro, 1986; Young, 1984). La Figura 1 muestra el efecto de diferentes combinaciones de estos dos reguladores sobre la sobrevivencia de las yemas. En el medio con sólo AG₃ los explantes presentaron una fuerte oxidación, mientras que en presencia de BAP un elevado número de yemas permanecieron verdes. En general, dosis crecientes de BAP estimularon el crecimiento y contrarrestaron parcialmente el efecto oxidativo del AG₃. La mejor respuesta se obtuvo al utilizar 2 mg/L de BAP y en ausencia de AG₃. El Cuadro 1 presenta el efecto de la interacción de diferentes concentraciones de BAP y de AIB. En

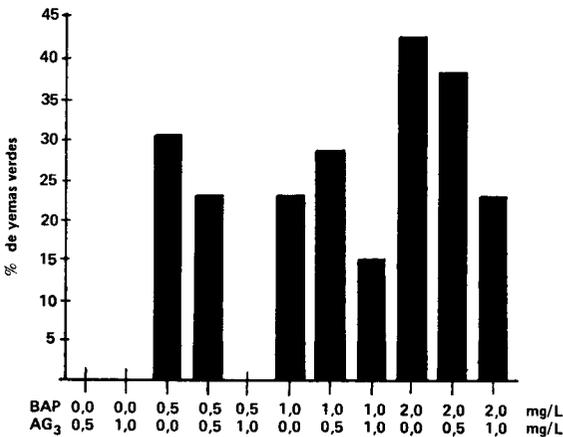


Fig. 1. Efecto de diferentes combinaciones de BAP y AG₃ sobre la sobrevivencia de yemas axilares de *Persea americana* cultivadas *in vitro* durante cuatro semanas.

este experimento el comportamiento de los explantes fue similar en todos los tratamientos, obteniéndose un engrosamiento de la yema, la cual desarrolló una o dos hojas. En éstas se observaron deformaciones, fenómeno que fue menor al utilizarse en forma combinada 2 mg/L de BAP y 0,5 mg/L de AIB, tratamiento con el cual se obtuvo también un menor crecimiento de las hojas.

Transferencia a diferentes medios de cultivo. El cultivo prolongado en el medio inicial provocó, después de dos transferencias, la oxidación y posterior muerte de las yemas. Con el fin de obtener un desarrollo satisfactorio de los explantes, se estudió, después de tres semanas en el medio inicial, la transferencia de los explantes a diferentes medios de cultivo. Los resultados se presentan en el Cuadro 2. En general, cuando las yemas fueron cultivadas en un medio MS, su desarrollo fue inferior, comparado con el obtenido en el medio N45K. En éste último, el mejor resultado fue obtenido con 2 mg/L de BAP y 0,5 mg/L de AIB. Se observó además un menor porcentaje de oxidación de los explantes durante varias transferencias sucesivas, estableciéndose este medio para las transferencias siguientes.

Influencia de diferentes combinaciones de reguladores de crecimiento en transferencias sucesivas. Con base en los resultados obtenidos en el Cuadro 1, se estudió el efecto de dosis mayores de

Cuadro 2. Influencia de la transferencia a dos medios de cultivo diferentes sobre el desarrollo de yemas después de tres semanas de cultivo.

Medio de cultivo	Tratamiento (mg/L)		Explantes verdes (%)	Crecimiento (mm)
	BAP	AIB		
MS	2,0	0,5	25,2	0,29
MS	1,0	0,5	27,9	0,44
N ₄₅ K	2,0	0,5	34,9	1,02
N ₄₅ K	1,0	0,5	31,1	0,52

Cuadro 1. Respuesta de desarrollo de yemas cultivadas en un medio MS con diferentes combinaciones de BAP y de AIB.

Tratamiento (mg/L)		Longitud (mm)	Crecimiento (mm)	Hojas deformes (%)	Oxidación (%)
BAP	AIB				
2,0	0,0	4,88	2,12	18,6	20,3
2,0	0,2	4,44	2,16	15,2	10,2
2,0	0,5	3,96	1,19	7,1	14,3

BAP y de AIB. Experimentos preliminares habían mostrado un mayor crecimiento al emplearse en forma conjunta en el medio de cultivo 6,0 mg/L de BAP y 1,0 mg/L de AIB. Este tratamiento se comparó con el mejor resultado del experimento anterior, evaluándose además el efecto del tiempo de transferencia y un antioxidante (PVP). El Cuadro 3 muestra los datos obtenidos después de nueve semanas de cultivo. Independientemente del tiempo de transferencia, niveles bajos de ambos reguladores (2 mg/L de BAP y 0,5 mg/L de AIB) favorecieron un mayor crecimiento. Con este último tratamiento, asociado a una transferencia semanal, se obtuvo un aumento de volumen importante de la yema, que toma la apariencia de una "roseta" (Figura 2a), en un 67% de los explantes. Al desarrollar esta forma, la yema permanece verde y continúa engrosando, evidencia de crecimiento. La ausencia de esta estructura produjo un cese de crecimiento del explante y posterior necrosis. El desarrollo en forma de roseta de la yema fue casi inexistente con dosis altas de BAP. Fue necesario la presencia de PVP (Cuadro 3) para obtener un mayor porcentaje de formación de rosetas. Con niveles bajos de reguladores, en presencia de PVP y con transferencias a un medio fresco cada tres semanas, se obtuvo también un buen número de estas rosetas (44%), por lo que se escogió este último tratamiento, por presentar mayor facilidad en la manipulación del material vegetal *in vitro*, en relación a una transferencia semanal. La incorporación de PVP en el medio de cultivo se mantuvo durante las primeras cuatro transferencias, ya que posteriormente no se observó la oxidación de los explantes.

Formación de tallo y multiplicación. En presencia de 2 mg/L de BAP y 0,5 mg/L de AIB, las rosetas formadas se alargaron y desarrollaron un tallo al cabo de 16 a 18 semanas de cultivo (Figura 2b), que continuó alargándose rápidamente (Figura 2c). Luego de varias transferencias se observó en este tallo el desarrollo de las yemas axilares y la formación de tallos múltiples (Figura 2d). Estos se dividieron y, al ser colocados nuevamente en un medio fresco, se repitió el mismo patrón, las yemas axilares de los tallos presentes formaron nuevos tallos.

Respuesta de yemas provenientes de plantas injertadas y cultivadas bajo invernadero. Se evaluaron diferentes combinaciones de reguladores en un medio MS adicionado con PVP. El Cuadro 4 resume los resultados obtenidos. El desarrollo de un tallo a partir de estas yemas fue similar al de plantas provenientes de campo (Figura 2). La mejor respuesta correspondió al tratamiento 2 mg/L de BAP y 0,5 mg/L de AIB. Dosis más altas indujeron una fuerte oxidación de los explantes y promovieron la formación de callo. El tratamiento con sólo BAP (1 mg/L) produjo una menor elongación y la formación de callo, aunque un cierto número de yemas (14%) permaneció verde.

Cultivo *in vitro* de microestacas

El uso de cloruro de mercurio al 0,15% produjo, en ensayos preliminares, la oxidación de los explantes. La inmersión de las estacas en una solución con PVP permitió reducir de manera importante la oxidación de las mismas. Después de

Cuadro 3. Influencia de períodos de cultivo cortos (7 días) y largos (21 días) sobre el crecimiento promedio de yemas de aguacate, combinados con un antioxidante en el medio y diferentes combinaciones de reguladores. Datos obtenidos después de nueve semanas*.

Transferencia (días)	PVP*	Tratamiento (mg/L)		Oxidación (%)	Crecimiento (mm)	Formación de rosetas (%)
		BAP	AIB			
7	-	2,0	0,5	23,5	3,46	67
7	-	6,0	1,0	71,4	3,06	0
21	-	2,0	0,5	31,8	2,12	23
21	-	6,0	1,0	68,7	2,05	6
21	+	2,0	0,5	11,8	2,98	44
21	+	6,0	1,0	15,0	2,55	50

* Resultados expresados en base a 25 explantes por tratamiento.

** Ausencia (-) o presencia (+) en el medio de cultivo.

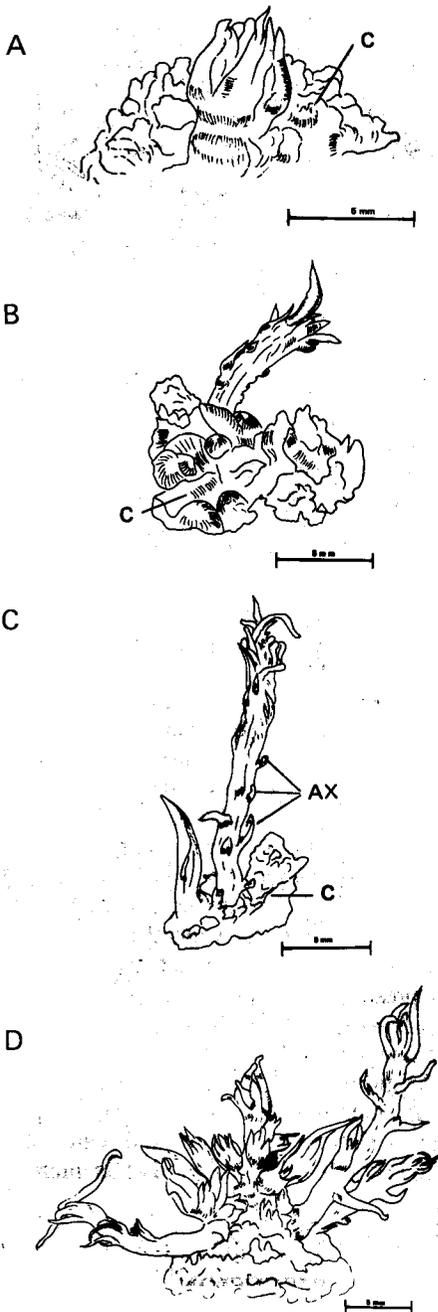


Fig. 2. Etapas de la regeneración y mutiplicación de *Persea americana* a partir de yemas axilares. A) Aumento de volumen y desarrollo de una estructura en "roseta". B) Alargamiento de la yema auxiliar. C) Formación de un tallo e inicio de l crecimiento de las yemas axilares del tallo. D) Desarrollo de nuevos tallos e inicio del proceso de multiplicación. (c = callo; ax = yemas axilares). En todas las figuras la escala representa 5 mm.

Cuadro 4. Efecto de diferentes combinaciones de reguladores sobre la respuesta *in vitro* de yemas provenientes de árboles injertados y cultivados en invernadero. Resultados obtenidos después de 10 semanas de cultivo.

Tratamiento (mg/L)		Explantos verdes (%)	Crecimiento (mm)
BAP	AIB		
1,0	0,0	14,0	2,91
2,0	0,5	17,0	4,64
6,0	1,0	0,0	3,83

cuatro subcultivos repetidos, los explantes se mantuvieron verdes, por lo que no se consideró necesario el uso de este antioxidante en el medio de cultivo.

El Cuadro 5 muestra los resultados cuando se empleó el medio de cultivo y las combinaciones de reguladores utilizadas en el desarrollo de yemas. Después de dos semanas de cultivo se observó la elongación de la yema de la microestaca (Figura 3a y b) y se formó un tallo con hojas de limbo abierto (Figura 3c). Cuando estos tallos, después de tres a seis semanas, alcanzaron un tamaño de 2 a 3 cm fueron a su vez seccionados en pequeñas microestacas. Estas, así como la base del tallo original (compuesto al menos por una yema axilar) se transfirieron a un medio nuevo y desarrollaron a su vez brotes a partir de las yemas axilares (Figura 3d). Se notó una alta formación de callo blando alrededor de las microestacas. Al cabo de once semanas se obtuvo un promedio de 3,5 tallos por cada microestaca inicialmente cultivada.

Otras combinaciones de BAP (1; 2 y 5 mg/L) evaluadas (Cuadro 6) no fueron superiores al tratamiento 2 mg/L de BAP más 0,5 mg/L de AIB.

Epoca de cultivo

Se determinó la influencia del estado fisiológico de la planta madre sobre el desarrollo *in vitro*, colectando material vegetal en diferentes épocas del año. El Cuadro 7 resume algunos de los resultados obtenidos.

En condiciones de campo se observó una alta respuesta de las yemas cuando el árbol inició su crecimiento vegetativo (meses de enero a abril). Al disminuir el crecimiento (mayo) e iniciarse el período floral (junio a agosto) y durante el desarrollo del fruto (setiembre a noviembre) se notó una disminución importante del crecimiento *in vitro* y la ausencia de formación de tallo. Los explantes presentaron también un alto grado de oxidación. Las microestacas no siguieron este comportamiento y presentaron una mejor respuesta en el mes de mayo,

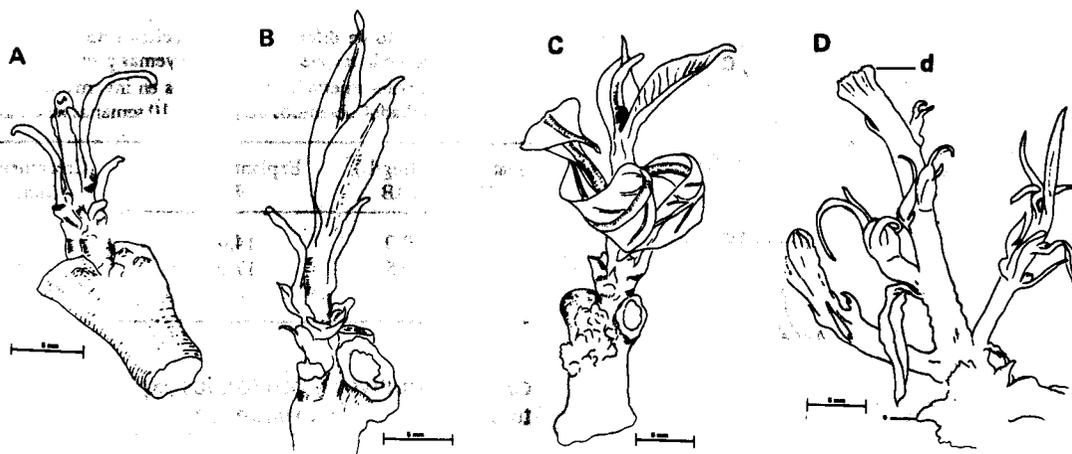


Fig. 3. Etapas del desarrollo de tallos de *Persea americana* a partir de microestacas cultivadas *in vitro*. A) Alargamiento inicial de la yema axilar. B) Expansión de la lámina foliar. C) Desarrollo de un tallo. D) Decapitación y regeneración de brotes laterales. (c = callo; d = decapitación). En todas las figuras la escala representa 5 mm.

Cuadro 5. Respuesta obtenida en microestacas provenientes de plantas injertadas y cultivadas en invernadero la segunda quincena de agosto.

Tratamiento (mg/L) BAP	Explantes AIB	Explantes verdes (%)	Crecimiento (mm)*	Tasa de multiplicación
2,0	0,5	73,5	9,6	3,5

* obtenido después de cinco semanas de cultivo.

Cuadro 6. Influencia de diferentes combinaciones de reguladores sobre la respuesta de microestacas cultivadas en un medio MS, en el mes de octubre. Datos obtenidos después de 11 semanas.

Tratamiento (mg/L) BAP	Oxidación AIB (%)	Crecimiento (mm)	Formación de tallo (%)	
1,0	0,0	20,0	1,02	0
2,0	0,0	80,0	0,89	6,7
2,0	0,5	33,3	0,82	0
5,0	0,0	100,0	1,02	0

época en que la yema no respondió. Sin embargo, no se obtuvo el desarrollo de un tallo, posiblemente por la inhibición de la yema en dicho período.

La respuesta de plantas cultivadas en invernadero fue diferente cualquiera que fuere el tipo de material vegetal utilizado. Sin embargo, igual que con los árboles situados en condiciones de campo, existió una variación en la respuesta. En julio, época de crecimiento activo, se observó el mayor número

de tallos formados, el cual disminuyó progresivamente hasta noviembre, mes en el que se incrementó nuevamente.

Paralelamente a las fluctuaciones en el crecimiento vegetativo, se presentaron variaciones en la contaminación. En yemas fue principalmente causada por hongos del género *Colletotrichum*. El grado de infección dependió de las condiciones ambientales, y se ha podido controlar modificando el proceso de desinfección (incremento en la concentración y el tiempo de exposición al agente desinfectante) del material vegetal en función del clima. En el caso de las microestacas, el principal problema presentado fue la contaminación por bacterias (no identificadas), de difícil eliminación tanto en condiciones de campo como en invernadero. Los ensayos dirigidos a aumentar las concentraciones de cloruro de mercurio no han dado resultados satisfactorios. El uso de hipoclorito de calcio al 9% no impidió la contaminación de todas las microestacas.

DISCUSION

Establecimiento de los cultivos

La utilización de plantas jóvenes injertadas con yemas provenientes de árboles adultos constituye una buena estrategia para obtener material para el cultivo *in vitro* (Franclet, 1979). Al cultivar estas plantas en invernadero se puede tener un control más riguroso en el aspecto sanitario y nutricional. El

Cuadro 7. Efecto de la época sobre la respuesta de yemas provenientes de árboles de campo y de invernadero, al utilizar 2,0 mg/L de BAP y 0,5 mg/L de AIB en el medio de cultivo.

Tipo de explante	Procedencia	Mes	Crecimiento (mm)*	Formación de tallo
yemas	campo	enero	3,13	+
		marzo	2,13	+
		mayo	1,81	-
		julio	0,24	-
	invernadero	marzo	3,21	+
		setiembre	4,83	-
microestacas	campo		Explantos verdes (%)**	Formación de tallo***
		mayo	88,8	0
		enero	0,0	0
	invernadero	julio	100,0	100,0
		agosto	77,8	64,7
		octubre	81,8	0,0
		noviembre	94,8	37,0
		enero	25,0	25,0

* Crecimiento promedio obtenido después de las primeras seis semanas de cultivo

** Resultado después de tres semanas de cultivo.

*** Resultado obtenido al cabo de cinco semanas de iniciado el experimento.

comportamiento similar *in vitro* de yemas provenientes de campo e invernadero resultó especialmente interesante, ya que la mayoría de los estudios *in vitro* indican una mayor dificultad en el cultivo de material vegetal proveniente de árboles adultos (Bonga, 1982; Pliego-Alfaro y Murashige, 1987).

En el caso de las microestacas, el alto porcentaje de contaminación por bacterias ha sido el principal obstáculo para su establecimiento *in vitro*. La manifestación tardía de la bacteria, su exclusiva aparición en aguacate, su presencia en el medio a partir del corte del explante y su inefectivo control con el uso de diferentes desinfectantes sugieren, según Debergh y Maene (1984), su presencia en forma endógena en la planta. El uso de Agrimycin, tanto en pretratamiento en la desinfección como en aspersión a la planta madre varios días antes de su establecimiento *in vitro*, no han logrado tampoco disminuir la presencia de la bacteria, lo que sustenta esta posibilidad de su presencia endógena. Pero el hecho de que en yemas aisladas ello no constituyó un problema importante, indica que este patógeno debe situarse principalmente en los intersticios de la epidermis de la porción del tallo, en donde es difícil eliminarlo sin afectar seriamente el explante. Nuevos ensayos se han dirigido a inducir la manifestación temprana de la bacteria para así poder evaluar otros métodos de control. A diferencia de las

yemas, el proceso de desinfección causó una fuerte oxidación de las estacas. El pretratamiento con PVP redujo y hasta suprimió este proceso deteriorativo de las microestacas, por lo cual se estableció su uso en forma rutinaria. Otros ensayos realizados utilizando el PVP incorporado al medio de cultivo no han dado resultados satisfactorios, aunque en experimentos en curso sí se han observado resultados positivos en el desarrollo del tallo.

Efecto de diferentes reguladores en el medio inicial de cultivo

La inhibición del desarrollo de las yemas solas y la promoción de la oxidación al usar AG₃ solo o en combinación con BAP contrasta con lo obtenido por Young (1984), quien notó un estímulo inicial por parte de este regulador. Es probable que en este caso influya el estado fisiológico del explante. La utilización de AG₃ en la fase de establecimiento *in vitro* inhibe generalmente el crecimiento, en particular del tallo (George y Sherrington, 1984). El BAP, en una concentración de 2 mg/L, permitió el desarrollo de la yema. Pero, aplicado como único regulador, favoreció principalmente un engrosamiento del explante, atribuible a una alta división celular *de novo*. Dosis inferiores no fueron concluyentes en cuanto a la respuesta obtenida, mientras que dosis elevadas (6 mg/L) sólo permitieron un desarrollo

limitado del explante (engrosamiento sin formación de rosetas). La aplicación conjunta de BAP y AIB favoreció el alargamiento del explante. Este mejor desarrollo, comparado con los otros tratamientos, puede explicarse por un mejor equilibrio en la relación citoquinina-auxina (Skoog y Miller, 1957). La presencia de auxinas en el medio de cultivo estimuló el alargamiento de las células formadas, el desarrollo de hojas de menor tamaño (Evans, 1984), así como la formación de rosetas, que originan posteriormente un tallo.

Los resultados en cuanto a la formación de tallos a partir de microestacas son similares a los obtenidos con yemas aisladas, excepto en la formación de rosetas. Este factor probablemente sea debido a la influencia de la porción de tallo sobre el desarrollo de la yema en la microestaca, como ha sido observado por otros autores (Febvre, 1981). El mejor resultado obtenido coincidió con el tratamiento utilizado para cultivar yemas individuales (2 mg/L de BAP y 0,5 mg/L de AIB). Otras concentraciones de BAP (1; 2 y 5 mg/L) no dieron respuesta en cuanto a formación de tallo, debido posiblemente a la época de recolección del material. Schall (1987) al utilizar microestacas provenientes del cultivar 'Fuerte' obtuvo formación de tallo con concentraciones de 1 a 2 mg/L de BAP para yemas en estado de reposo y con niveles de 5 a 10 mg/L en el caso de material en crecimiento. Sin embargo, estos dos últimos tratamientos, no dieron, en las condiciones de este experimento, respuesta de crecimiento de las yemas, lo que indica posibles diferencias fisiológicas del material vegetal empleado, aunque se origine de la misma variedad.

Es importante señalar que no se ha obtenido respuesta en la formación de tallo a partir de microestacas de campo. El uso de plantas injertadas permite entonces el rejuvenecimiento del material, haciendo posible su regeneración *in vitro* y evidencia modificaciones importantes en la fisiología de la planta original (Pliego-Alfaro y Murashige, 1987).

Desarrollo del explante y multiplicación

La evolución de la yema hacia la formación de una roseta es importante. Es sólo posterior a la aparición de ésta que se observa un alargamiento del explante, el cual origina, varias semanas después, un tallo. Por su morfología, este tallo se asemeja al obtenido de una semilla sexual (Ferrer, 1980), lo que indica un proceso de rejuvenecimiento. Estimulados por la presencia de BAP (Margara, 1983), las yemas axilares de estos tallos se desarrollan. En este momento, el meristema apical cesa su crecimiento.

Al estimular el desarrollo de las yemas axilares, el BAP se opone a la dominancia apical (Crabbé, 1987) y permite la formación de nuevos tallos, que se pueden separar e iniciar entonces el proceso de multiplicación. Este proceso es común a muchas especies (Quoirin *et al.*, 1978).

La permanencia de estas nuevos ejes adheridos al tallo principal tendieron a inhibir el crecimiento de éste, llegando inclusive a necrosarse. Es probable que los niveles de BAP utilizados favorecieron la proliferación de yemas pero en detrimento del crecimiento de las mismas (Leopold y Noodén, 1984), por lo que será necesario disminuir en forma gradual el nivel de citoquininas antes de transferir los tallos a la fase de enraizamiento.

El desarrollo de un tallo a partir de la yema de la microestaca fue similar al obtenido cultivando yemas aisladas. Sin embargo, existen tres diferencias importantes: en primer lugar, el tiempo de respuesta de formación de tallo en las microestacas fue de dos a tres semanas, mientras que el de las yemas aisladas fue de 16 a 18 semanas. En segundo lugar, las microestacas respondieron de manera más uniforme que las yemas, lo cual señala la importancia de la participación de la porción de tallo de las microestacas y sugiere que en el cultivo de yemas aisladas se evidencia mucho más el gradiente morfogénico que se presenta a lo largo del eje de la planta (Crabbé, 1987). Por último, mientras que el tallo desarrollado a partir de una yema aislada se parece en su morfología a aquel tallo proveniente de una semilla sexual (Ferrer, 1980), el de la microestaca presenta hojas muy desarrolladas de lámina totalmente expandida (Figuras 3b y c). Esto sugiere que, separada del tallo, una yema individual queda libre de las correlaciones que tenía con éste y por lo tanto puede iniciar un proceso morfogénico diferente, modulado en parte por su capacidad interna y por el medio de cultivo.

Efecto del subcultivo de los explantes

De los diferentes medios evaluados al transferir los explantes a un medio fresco, se notó una menor oxidación y un mayor desarrollo de los explantes en el medio N45K, probablemente debido a su bajo contenido de amonio. Este compuesto resulta tóxico para muchas especies arbóreas cuando se encuentra en altas cantidades en el medio (Margara, 1983; Beauchesne, 1981). La transferencia al mismo medio inicial (medio MS) produce una alta oxidación y posterior necrosis de los explantes, lo que evidencia la influencia de la concentración de sales minerales sobre el desarrollo del explante.

Daguin (1984) observó que, en presencia de altos niveles de sales en el medio y particularmente de amonio, plantas de *Salix babylonica* presentaron una menor formación de haces vasculares, un aumento importante del tamaño de las células y una menor rigidez de las paredes. Estos cambios se atribuyen a una desviación del metabolismo hacia el ciclo de Krebs y a la formación de compuestos nitrogenados en detrimento de la vía de las pentosas y de la formación de lignina. Finalmente, si estas alteraciones persisten se produce el desarrollo anormal de la planta y su muerte.

La disminución de la concentración de BAP y AIB en los tres primeros subcultivos no favoreció el desarrollo de la yema, por lo que se deben mantener los niveles inicialmente utilizados. Sin embargo, es necesario estudiar su efecto a largo plazo, ya que la necrosis del ápice del tallo principal durante la fase de multiplicación evidencia necesidades posteriores del cultivo.

La influencia del tiempo entre dos transferencias es igualmente crítico (Cuadro 3). En concentraciones altas de BAP, transferencias semanales y a los 21 días limitaron la formación de rosetas, hecho que se puede atribuir a un efecto inhibitorio del regulador. Este efecto se acentuó en la transferencia semanal y disminuyó cuanto más se prolongó el intervalo de subcultivo. En el caso de una transferencia a los 21 días es posible que se favorezca la absorción y metabolización de BAP por el explante (Laloue *et al.*, 1981), lo cual permite su desarrollo posterior. Se ha observado un efecto remanente en la aplicación de citoquininas, el cual puede persistir en el subcultivo siguiente (Gawer, 1976), por lo que períodos prolongados entre dos transferencias evitan un posible efecto acumulativo con el empleo de altas concentraciones.

La incorporación de PVP en pretratamiento o al medio de cultivo contrarrestó este efecto y disminuyó la oxidación de los explantes (Cuadro 3). Esta sustancia absorbe los polifenoles a través de un enlace de hidrógeno e inhibe así la polifenol oxidasa, evitando la necrosis y posterior muerte del explante (Compton y Preece, 1986). A su vez, los antioxidantes absorben otras sustancias del medio de cultivo, en particular los reguladores de crecimiento. Esto sugiere también una liberación paulatina, en particular del BAP, favoreciendo igualmente el desarrollo de roseta con niveles de 6 mg/L de BAP. Aún así, el efecto positivo del uso de concentraciones más bajas de reguladores (2 mg/L de BAP y 0,5 mg/L de AIB) se demostró en una mayor formación de rosetas, independientemente

del tiempo de transferencia. Sin embargo, el hecho que en la transferencia semanal (sin PVP) se obtuvo un mayor número de rosetas, comparado con los resultados obtenidos con los explantes transferidos cada tres semanas, permite suponer que el uso de niveles bajos es limitante en transferencias realizadas a los 21 días, debido ya sea a una metabolización elevada de los reguladores o bien a una degradación en el medio (Laloue *et al.*, 1981). El uso de PVP tanto en concentraciones altas como bajas de BAP, al contrarrestar la oxidación y mantener un suministro continuo de reguladores, resulta entonces positivo.

En la fase de multiplicación, la oxidación progresiva de los explantes después de tres subcultivos y finalmente su muerte, como fue también observado en yemas, constituyó el factor limitante. Pliego-Alfaro y Murashige (1987) señalan problemas similares, además de una abscisión de las hojas previo a la necrosis. Por ello, se iniciaron experimentos tendientes a disminuir progresivamente la concentración de citoquininas en el medio. Los resultados obtenidos, aunque parciales, señalan un efecto favorable sobre los explantes, pero el proceso oxidativo permanece. A pesar de ello, algunos explantes provenientes de microestacas se han logrado conservar en cultivo en fase de multiplicación por un período de 262 días, llegándose a obtener 20 tallos de un explante por subdivisión del mismo.

Respuesta del material según la época de recolección

La variación observada se originó de las condiciones internas del explante y de la fenología del árbol. Existe, dependiendo de la época de recolección a partir del material madre, una potencialidad diferencial de un material vegetal en su respuesta de crecimiento. Esto implica la necesidad de niveles diferentes de reguladores según el estado fisiológico del vegetal para que éste pueda crecer (Crabbé, 1987).

Lo anterior se aplica bien a la respuesta *in vitro* del aguacate a partir de diferentes tipos de explantes (Cuadro 7) y explicaría la falta de crecimiento observado en ciertas épocas. Al estar las plantas a una menor elevación y mayor temperatura, el crecimiento ocurrió en épocas diferentes. Es así que la floración tuvo lugar en los meses de enero a febrero. Esto sugiere la necesidad de determinar los diferentes requerimientos, en particular de reguladores, en función del momento de iniciar el cultivo aséptico; o, por el contrario, de establecer material *in vitro* del

aguacate sólo en ciertos períodos, en los que se haya observado una respuesta positiva al tratamiento empleado.

RESUMEN

Se estudió la regeneración y multiplicación *in vitro* de *Persea americana* cv. 'Fuerte' por medio de yemas axilares o de microestacas. Se determinó el efecto de diferentes concentraciones de reguladores (BAP, AIB, AG₃) y dos combinaciones de sales minerales, MS y N45K, sobre la respuesta de los explantes. El mejor crecimiento y la formación de tallo se obtuvieron al utilizar 2,0 mg/L de BAP y 0,5 mg/L de AIB, tanto a partir de yemas como de microestacas. El medio N45K produjo una menor oxidación de los explantes y favoreció su desarrollo. Los tallos obtenidos se subcultivaron formando nuevos tallos a partir de yemas axilares. Estos fueron seccionados y cultivados separadamente. Se observaron diferencias en la respuesta según la época de recolección del material. Además, dependiendo del tipo de explante, se presentaron diferencias morfológicas en los tallos regenerados. El uso de antioxidantes (PVP) mejoró la respuesta en los subcultivos sucesivos. Las microestacas presentaron una mayor dificultad para la eliminación de patógenos. Se discute el efecto del uso de antioxidantes en el medio y las diferencias observadas en la respuesta de los explantes utilizados.

LITERATURA CITADA

- BARCELO-MUÑOZ, A.; PLIEGO-ALFARO, F. 1986. *In vitro* propagation of the avocado rootstock G.A-13. In International Congress of Plant Tissue and Cell Culture. Minneapolis, Estados Unidos, Universidad de Minesota. p. 278.
- BEAUCHESNE, G. 1981. Les milieux minéraux utilisés en culture *in vitro* et leur incidence sur l'apparition de boutures d'aspect pathologique. C.R. Acad. Agric. 67:1389-1397.
- BONGA, J.M. 1982. Vegetative propagation in relation to juvenility, maturity and rejuvenation. In Tissue Culture in Forestry. Ed. by J.M. Bonga and D.J. Durzan. La Haya, Martinus Nijhoff Publishers. p. 387-412.
- COMPTON, M.E.; PREECE, J.E. 1986. Exudation and explant establishment. Newsletter A.P.T.C.A. 50:9-18.
- CRABBE, J. 1987. Aspects particuliers de la morphogenese caulinaire des végétaux ligneux et introduction á leur étude quantitative. Bruxelles, Belgica, I.R.S.I.A. 116 p.
- DAGUIN, F. 1984. Caractérisation d'un phénomène d'hypolignification chez *Salix babylonica* L. en culture *in vitro*. Role de l'azote ammoniacal. Tesis Ph.D. Clermont-Ferrand, France, Universidad de Clermont II. 98 p.
- DEBERGH, P.; MAENE, L. 1984. Pathological and physiological problems related to the *in vitro* culture of plants. Parasitica 40(2-3):69-75.
- EVANS, M.L. 1984. Function of hormones at the cellular level of organization. In Hormonal regulation of development. II. The functions of hormones from the level of the cell to the whole plant. Ed. by K. Scott. Springer-Verlag, Berlin. p. 23-79.
- FEBVRE, E. 1981. Contribution á l'étude du développement de boutures de saule (*Salix babylonica* L.) cultivées *in vitro*. Influence de différentes températures de culture; induction d'une dormance et conséquences morphogènes. Tesis Ph.D. Clermont-Ferrand, France, Universidad de Clermont II. 150 p.
- FERRER, M. 1980. Estudio sobre la germinación de la semilla y desarrollo de la plántula de *Persea americana* Mill. Tesis Lic. San José, Escuela de Biología, Universidad de Costa Rica. 75 p.
- FRANCKET, A. 1979. Rajeunissement des arbres adultes en vue de leur propagation végétative. In Micropropagation d'arbres forestiers. Etudes et Recherches. Ed. pour AFOCEL. Nancy, AFOCEL. p. 3-18.
- GAWER, M. 1976. Signification physiologique de l'accumulation du glucoside de benzylaminopurine dans des tissus et des cellules de tabac cultivés *in vitro*. Tesis Ph.D. Orsay, France, Universidad de Orsay. 106 p.
- GEORGE, E.; SHERRINGTON, P.D. 1984. Plant propagation by tissue culture. Londres, Exergetics. 709 p.
- GONZALEZ, A.; SALAZAR, A. 1984. Root induction and vegetative development from avocado plantules (*Persea americana* Mill.). California Avocado Society Yearbook 68:167-171.
- GUPTA, P.K.; NADGIR, A.; MASCARENHAS, A.F.; JAGAN-NATHAN, V. 1980. Tissue culture of forest trees: clonal multiplication of *Tectona grandis* L. (teak) by tissue culture. Plant Science Letters 19:259-268.
- HERNANDEZ, R.L. 1983. Día de demostración sobre el cultivo del aguacate. Alajuela, Estación Experimental Fabio Baudrit Moreno, Universidad de Costa Rica. 12 p. (mimeografiado).
- HU, C.Y.; WANG, P.J. 1983. Meristem, shoot tip and bud culture. In Handbook of plant cell culture. Techniques for propagation and breeding. Ed. by D.A. Evans *et al.* New York, MacMillan Publishing. v. 1, p. 177-227.
- LALOUÉ, M.; PETHE-TERRINE, C.; GUERN, J. 1981. Uptake and metabolism of cytokinins in tobacco cells: studies in relation to the expression of their biological activities. In Metabolism and molecular activities of

- cytokinins. Ed. by J. Guern and C. Peaud-Leonoel. Berlin, Springer-Verlag. p. 80-96.
- LEOPOLD, A.C. y NOODEN, L.D. 1984. Hormonal regulatory systems in plants. *In* Hormonal Regulation of Development. II. The functions of hormones from the level of the cell to the whole plant. Ed. by K. Scott. Berlin, Springer-Verlag. p. 1-22.
- MARGARA, J. 1983. Bases de la multiplicación vegetativa. Les méristèmes et l'organogenese. Versailles, Paris, INRA. 262 p.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15:473-497.
- NAPOLIANE, J. 1984. Results in propagation of subtropical trees and shrubs. *Revista di Agricoltura Subtropicale e tropicale* 1:139-151.
- NEL, D.D.; KOTZE, J.M. 1982. Tissue culture avocado: progress report. *Yearbook South African Avocado Grower's Association* 5: 68-70. *Tomado de Horticultural Abstracts* 53(3):2130.
- NEL, D.D.; KOTZE, J.M.; SNYMAN, C.P. 1983. Progress in tissue culture of avocado. *Yearbook South African Avocado Growers Association* 6:90-91. *Tomado de Horticultural Abstracts* 53(12):8909.
- PLIEGO-ALFARO, F.; MURASHIGE, T. 1987. Possible rejuvenation of adult avocado by grafting onto juvenile rootstocks *in vitro*. *HortScience* 22(6):1321-1324
- QUOIRIN, M.; LEPOIVRE, P.; BOXUS, P. 1978. Un premier bilan de 10 années de recherches sur les cultures de meristèmes et la multiplication *in vitro* de fruitiers ligneux. C.R. Recherches 1976-1977. Rapport. Synth. Station Cult. Fruitières et marichères. Gembloux. p. 83-106.
- SCHALL, S. 1987. La multiplication de l'avocatier (*Persea americana* Mill.) cv. Fuerte par microbouturage *in vitro*. *Fruits* 42(3): 171-176.
- SCHROEDER, C.A. 1980. Avocado *in vitro*. *California Avocado Society Yearbook*. 64: 139-141. *Tomado de Horticultural Abstracts* 52(4):2526.
- SKOOG, F.; MILLER, C. 1957. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured *in vitro*. *Symposia of the Society for Experimental Biology*. 11:118-131.
- VILLEGAS, A. 1985. Micropropagación de frutales. *In* Fundamentos teórico-prácticos del cultivo de tejidos vegetales. Ed. por V.M. Villalobos. México, FAO. 231 p.
- YA'COB, B. 1986. Avocado rootstocks selection in Israel. *In* Congreso de Horticultura ASHS-Región Tropical. (32., San José, 1986). Resúmenes. San José, Costa Rica. p. 455.
- YOUNG, M.J. 1984. Avocado callus and bud culture. *Proceedings Florida State Horticultural Society* 96:181-182. *Tomado de Horticultural Abstracts* 55(11):9034.