

1999. Revista Chapingo Serie Horticultura 5: 239-244.

## LA MICROPROPAGACIÓN EN LA MEJORA DE PATRONES DE AGUACATE (*Persea americana* Mill.): PROBLEMAS Y LIMITACIONES

F. Pliego-Alfaro<sup>1</sup>; A. Barceló-Muñoz<sup>2</sup>; E. Simón-Pérez<sup>2</sup>; G. de la Viña-Nieto<sup>1</sup>; C. Sánchez-Romero<sup>2</sup>; R. Perán-Quesada<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Biología Vegetal, Campus de Teatinos s/n. 29071 Málaga. FAX: 34.952.132000.

<sup>2</sup>C.I.F.A. Cortijo de la Cruz, Churriana, 29140 Málaga. España FAX: 34.952.621868. Correo electrónico: laboratorio@olinet.es

### RESUMEN

Las podredumbres de raíz causadas por *Phytophthora cinnamomi* y *Rosellinia necatrix* son un serio problema en las plantaciones de aguacate, y se están haciendo considerables esfuerzos para obtener material tolerante a estas enfermedades. Actualmente, el material seleccionado se propaga por el método de Frolich, una técnica que requiere el injerto en patrón nodriza seguido de la etiolación del brote que se pretende enraizar. El uso de alternativas biotecnológicas puede ser de gran interés en programas de mejora de aguacate. La micropropagación sería de gran utilidad, tanto para la producción a gran escala de patrones clonales como para la multiplicación de genotipos que, tras su revitalización *in vitro*, podrían propagarse por métodos convencionales. El éxito en la micropropagación de especies leñosas va ligado al uso de material juvenil o material adulto revitalizado. Explantos juveniles de aguacate proliferan adecuadamente *in vitro* en presencia de 4,44  $\mu$ M benciladenina; sin embargo, los explantos de origen adulto, obtenidos de árboles revitalizados mediante podas severas, presentan problemas de necrosis apical, lo que hace necesaria la utilización de medios líquidos o de doble-fase para su multiplicación *in vitro*. El enraizamiento del material juvenil se consigue tras incubar los brotes durante 3 días en presencia de ácido indol-3-butírico, 4,92  $\mu$ M, y posterior transferencia a medio sin auxina. Los brotes de origen adulto presentan una baja capacidad de enraizamiento; sin embargo, la utilización de material revitalizado mediante podas severas o microinjertos y la incubación en medios líquidos suplementados con auxina han permitido obtener porcentajes de enraizamiento similares a los del material juvenil (80-90%).

**PALABRAS CLAVE:** *Persea americana*, embriogénesis somática, multiplicación *in vitro*, portainjertos.

**ABREVIATURAS:** Ácido abscísico (ABA), ácido indol-3-acético (AIA), ácido indol-3-butírico (AIB), ácido 2,3,5, triyodobenzoico (TIBA), benciladenina (BA), Murashige y Skoog (MS), polietilenglicol (PEG).

## SUMMARY

Root rots caused by *Phytophthora cinnamomi* and *Rosellinia necatrix* are serious problems in avocado orchards, and considerable efforts are being made to find material tolerant to these diseases. Currently, selected material is being propagated by the Frolich method, a technique which requires grafting in a nurse seedling followed by etiolation of the shoot to be rooted. The use of biotechnology could be of great interest in rootstock avocado breeding programmes. Micropropagation could be very useful for mass production of clonal rootstocks or to revitalise adult material which could later on be multiplied by conventional means. The success in micropropagation of woody perennials is generally linked to the use of juvenile or revitalized adult material. Juvenile avocado explants proliferate adequately *in vitro* in the presence of 4.44  $\mu\text{M}$  benzyladenine; however, explants of adult origin, obtained from trees previously revitalized by severe pruning, show apical necrosis, and liquid or double-phase media are required to overcome this problem. Rooting of juvenile material has been accomplished after incubating the shoots for three days in the presence of 4.92  $\mu\text{M}$  indole-3-butyric acid, followed by transfer to auxin free-medium. Shoots of adult origin show a rather low rooting capacity; however, use of material previously revitalized, by severe pruning or micrografting, and the incubation on auxin supplemented liquid media, has allowed the obtention of rooting percentages similar to those of juvenile material (80-90%).

**KEY WORDS:** *Persea americana*, *in vitro* multiplication, rootstocks, somatic embryogenesis.

## INTRODUCCIÓN

Las podredumbres de raíz causadas por *Phytophthora cinnamomi* y *Rosellinia necatrix* son un serio problema en las plantaciones de aguacate y se están haciendo considerables esfuerzos para obtener material tolerante a estas enfermedades. Sin embargo, mientras *P. cinnamomi* es un patógeno extendido por todo el mundo, *R. necatrix* es un problema específico de las plantaciones del Sur de España, aunque también se ha aislado en otros países como Israel (Sztejnberg, *et al.*, 1983). En California, se han seleccionado varios genotipos que muestran tolerancia a *P. cinnamomi* (Kellan y Coffey, 1985; Köhne, 1992); estos portainjertos se propagan por el método de Frolich (Frolich y Platt, 1972), un procedimiento que requiere injerto en patrón nodriza seguido de etiolación del brote que se pretende enraizar. En el caso de *R. necatrix* la situación es distinta, ya que no se dispone de material tolerante a este hongo.

El uso de alternativas biotecnológicas puede ser de gran interés en programas de mejora de aguacate (Pliego-Alfaro y Bergh, 1992). La micropropagación sería de utilidad para producción a gran escala de plantas clonales, mientras que la inducción de variantes somaclonales podría ser un camino para seleccionar material tolerante a patógenos de suelo (van den Bulk, 1991), especialmente, si tenemos en cuenta que la tolerancia a *P. cinnamomi* ocurre a nivel celular de forma similar a lo observado en la planta completa (Phillips *et al.*, 1991). Por otra parte, la transformación genética permite introducir cambios específicos en el genoma de la célula sin perturbar su constitución genética (Schuerman y Dandekar, 1993), aunque va a ser necesario un conocimiento en profundidad de los

mecanismos de regulación y expresión génica para obtener individuos de alto valor biotecnológico (Jorgensen, 1993). El número de especies leñosas susceptibles de transformación está creciendo rápidamente (Gardner, 1993; Schuerman y Dandekar, 1993). Recientemente, se han transformado embriones somáticos de aguacate con el gen de la  $\beta$ - glucuronidasa, pero no ha sido posible la regeneración de plantas (Cruz-Hernandez *et al.*, 1998).

En este trabajo pretendemos reflejar las contribuciones de nuestro grupo de investigación en la morfogénesis *in vitro* del aguacate, y su utilización para obtener material seleccionado que muestre buen comportamiento frente a las podredumbres radicales.

### **CULTIVO DE ÁPICES CAULINARES**

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

Barceló-Muñoz *et al.*, (1990) utilizaron BA para inducir proliferación de material juvenil de aguacate; así, concentraciones en el rango 4,44-8,88  $\mu$ M inducen una tasa de multiplicación de 2-3X. Dado que la presencia de BA en el medio de multiplicación origina miniaturización de los brotes, se requiere una fase de elongación antes del enraizamiento. Esta elongación se puede conseguir prolongando el período de subcultivo hasta 8 semanas o cultivando los brotes en medio líquido en presencia de dosis más bajas de BA durante dos semanas.

El establecimiento *in vitro* de brotes adultos requiere una reducción de la concentración de macroelementos de la formulación MS y un suplemento de BA (1,3  $\mu$ M) (Pliego-Alfaro *et al.*, 1987). El cultivo de estos brotes en medio sólido con dosis superiores de BA (4,44  $\mu$ M) da lugar a la aparición de necrosis en los ápices de los brotes. Sin embargo, la utilización de un medio de doble fase permite solucionar este problema, aunque tras el cultivo continuado en estas condiciones los brotes muestran síntomas de hiperhidricidad (Pliego-Alfaro, *et al.*, 1987). Para solventar esta anomalía, Barceló-Muñoz *et al.* (1999) han desarrollado un método de multiplicación en el que se alternan el cultivo de brotes durante dos semanas en medio líquido en rotor en presencia de dosis bajas de citoquinina, con el cultivo en medio de doble fase durante seis semanas. Este procedimiento ha permitido multiplicar con éxito material de aguacate en fase adulta de desarrollo.

Microestaquillas juveniles de aguacate no requieren auxina para enraizar (Pliego-Alfaro, 1988), sin embargo, una breve exposición a 4,92  $\mu$ M AIB ha tenido efectos positivos en la formación de raíces (Barceló-Muñoz *et al.*, 1990). García-Gómez *et al.* (1994) cuantificaron los niveles de auxina en forma libre (AIA) y conjugada (AIA-aspartato) durante el enraizamiento de microestaquillas juveniles de cv. Topa-Topa, tratadas, o no, con AIB. En los brotes utilizados como control, los niveles de AIA permanecieron constantes durante el

proceso de enraizamiento, mientras que en los tratados con AIB, el contenido endógeno de AIA se duplicó durante los seis primeros días. El tratamiento de estos brotes con TIBA, un inhibidor del transporte polar de auxina, indujo un ligero descenso de los niveles de auxina libre e inhibió la formación de raíces. El contenido endógeno del conjugado AIA-aspartato aumentó en las microestaquillas control y en las tratadas con AIB antes de la diferenciación de los primordios radiculares y después disminuyó progresivamente. Sin embargo, en las microestaquillas tratadas con TIBA no se observó incremento de los niveles de AIA-aspartato. Estos resultados muestran que debe ocurrir un aumento en los niveles de AIA durante las primeras fases del enraizamiento, mientras que la formación del conjugado sería un mecanismo para detoxificar el exceso de auxina libre.

Además de la formación de conjugados, la actividad peroxidasa juega un importante papel en la regulación de los niveles de auxina durante el proceso de enraizamiento (Berthon *et al.*, 1989). Los trabajos de García-Gómez *et al.* (1995) han mostrado que en aguacate, la actividad peroxidasa de la hoja (fracción soluble, y unida a pared celular) permanece constante durante el proceso de enraizamiento; sin embargo, la actividad peroxidasa (fracción soluble) en la parte basal de los brotes se duplicó después de 3 días y permaneció a niveles elevados hasta el final del proceso de enraizamiento. Los estudios histológicos llevados a cabo para localizar esta actividad enzimática mostraron que estaba presente en todos los tejidos de la estaquilla, aunque los haces vasculares y la epidermis daban las reacciones más fuertes. Las peroxidasas están implicadas en el proceso de formación de la pared celular (Lampert, 1986), así como en la formación de células de xilema (Miller *et al.*, 1985); por consiguiente, las peroxidasas, durante el enraizamiento *in vitro* de aguacate, podrían estar implicadas tanto en la oxidación de conjugados de auxina, tal y como se ha observado en *Populus tremula* (Plüss *et al.*, 1989), como en los procesos de formación de paredes celulares y xilogénesis inherentes a la diferenciación de raíces.

Los brotes de origen adulto son difíciles de enraizar. Subcultivos sucesivos en medio de multiplicación han mejorado la capacidad de enraizamiento de brotes de otras especies (Sriskandarajan *et al.* 1982), pero no de aguacate (Pliego-Alfaro *et al.* 1987). Sin embargo, el injerto de yemas adultas en semillas germinadas *in vitro* ha dado lugar a brotes con mejor capacidad de enraizamiento. En el caso del portainjerto Duke-7, el 50% de los brotes injertados enraizó frente al 0% de los controles no injertados. El reinjerto de los brotes adultos (hasta 3 veces) no mejoró la capacidad de enraizamiento (Pliego-Alfaro y Murashige, 1987). Sin embargo, en el caso del portainjerto G.A.-13, Barceló-Muñoz, (1995) fue capaz de obtener un 90% de enraizamiento de los brotes adultos tras 16 injertos sucesivos en material juvenil. Sorprendentemente, tanto en el caso del portainjerto Duke 7 como en el del G.A.-13, los brotes adultos rejuvenecidos mostraban una pobre respuesta a las condiciones que favorecían la multiplicación del material en estado juvenil.

Hood y Libby (1978) han propuesto que la metilación de genes reguladores puede estar implicada en los procesos de maduración y rejuvenecimiento mientras que Huang *et al.* (1990) sostienen que las sustancias que se transmiten a través de la unión de injerto deben ser suficientemente pequeñas y resistentes a degradación enzimática, y que el ADN circular de bajo peso molecular abundante en plastos, mitocondrias y núcleo podría ser un buen candidato.

La textura del medio de cultivo juega un papel muy relevante en el enraizamiento del

material adulto. Así, mientras en medio sólido el enraizamiento de brotes procedentes de árboles adultos revitalizados mediante podas severas no supera el 30%, la utilización de medio líquido en rotor (5 rpm) durante los tres días en que los brotes son expuestos a auxina eleva el porcentaje de enraizamiento al 85% (Barceló-Muñoz, 1995).

De la Viña *et al.* (1999) han estudiado el efecto de la concentración de sacarosa y los niveles de CO<sub>2</sub> en la fisiología de plantas juveniles. Con una concentración de sacarosa 87,6 µM, el contenido de Rubisco disminuyó de forma drástica en relación a las plantas que crecían en presencia de 14,6 µM sacarosa y este descenso se incrementó en atmósfera enriquecida en CO<sub>2</sub>; sin embargo, tras el transplante a invernadero, la tasa de supervivencia de las plantas que habían crecido en presencia de baja sacarosa/alto CO<sub>2</sub> no fue superior a la de las plantas que habían crecido en presencia de alta sacarosa/bajo CO<sub>2</sub> (70%). Estos datos sugieren que la mejora de crecimiento obtenida elevando la concentración de CO<sub>2</sub> *in vitro* no es suficiente para incrementar la tasa de supervivencia obtenida en la fase de aclimatación; esto podría ser debido a la relativamente baja cantidad de reservas de azúcares presente en estas plantas. En este línea, Capellades (1991) observó una mejora en la supervivencia de plantas micropropagadas de rosa, tras ser cultivadas en presencia de una alta concentración de sacarosa, a pesar de que en estas condiciones se disminuía la tasa de fotosíntesis. Por otra parte, la inoculación con hongos formadores de micorriza favorece la aclimatación de material micropropagado. En plantas juveniles, la inoculación con *Glomus fasciculatum* mejoró el sistema radicular, incrementó la relación brote/raíz y aumentó de forma considerable la absorción de macronutrientes (N,P,K) (Vidal *et al.*, 1992). La inoculación con *Glomus deserticola* dió también excelentes resultados en este tipo de material (Azcón-Aguilar *et al.*, 1992) así como en el portainjerto RR-86 (un árbol procedente de semilla de 2 años de edad y que había mostrado cierta tolerancia a *P. cinnamomi*). En este caso la longitud del brote se triplicó en las plantas micorrizadas, observándose también un drástico incremento del área de hoja (de la Viña *et al.*, 1996).

### **APLICACIONES DEL CULTIVO DE ÁPICES CAULINARES EN LA MULTIPLICACIÓN DE PORTAINJERTOS TOLERANTES A PATÓGENOS DE SUELO**

En la actualidad se está evaluando la tolerancia a *Rosellinia necatrix* de plantas de semilla procedentes de genotipos seleccionados en los bancos de germoplasma de Ixtapan de la Sal y Coatepec Harinas (México) así como de la Estación Experimental La Mayora (España). El material juvenil seleccionado se propagará siguiendo la metodología de Barceló-Muñoz *et al.* (1990) para realizar estudios adicionales en relación con su tolerancia a *Rosellinia necatrix*. Paralelamente, se están realizando prospecciones, para localizar árboles escape, en zonas del Sur de España infectadas con este patógeno. Estos árboles adultos tras ser sometidos a podas severas se propagarán siguiendo la metodología de Barceló-Muñoz *et al.* (1999).

### **EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA**

La obtención de callo embriogénico ha sido previamente descrita en aguacate (Mooney y van Staden, 1987; Pliego-Alfaro y Murashige, 1988). Para inducir este tipo de callo son requerimientos esenciales la utilización de embriones cigóticos inmaduros y la

incorporación de la auxina picloram. Perán-Quesada y Sánchez-Romero (datos no publicados) han obtenido cultivos embriogénicos de los cultivares Hass, Anaheim y Duke 7. Los callos embriogénicos proliferan mejor en medio líquido que en sólido; sin embargo, en medio líquido el material degenera más rápidamente por lo que es recomendable alternar ambos tipos de medio o, si se pretende mantener los callos durante un largo periodo de tiempo, utilizar únicamente medio sólido. La maduración de los embriones ocurre en oscuridad después de transferir los callos embriogénicos a medio sin auxina pero suplementado con leche de coco (10%). Sin embargo, a pesar de que se forman estructuras blanco-opacas de considerable tamaño (10-20 mm), la formación de brotes o raíces sólo ocurre en raras ocasiones.

Los intercambios hídricos entre el embrión y su medio juegan un papel fundamental en el proceso de maduración (Adams y Rinne, 1980). Así, se ha visto que la incorporación al medio de cultivo de sustancias osmóticamente activas o de ABA, tiene efectos beneficiosos en el proceso de maduración del embrión (Finkelstein y Crouch, 1986; Roberts, 1991). Estas sustancias osmóticamente activas no causan necesariamente un incremento del contenido de ABA endógeno (Morris *et al.*, 1988) o inducen los mismos cambios en el contenido hídrico (Welbaum *et al.*, 1990). Según Benech Arnold *et al.* (1991), ABA endógeno y agentes osmóticos en el medio pueden actuar de manera complementaria para impedir la germinación precoz. En mango, Pliego-Alfaro *et al.* (1996a) han mostrado que altas concentraciones de ABA (750-1750  $\mu\text{M}$ ), manitol (7,5-12,5%) o baja temperatura (7.5°C) detienen el desarrollo de embriones nucelares. En cultivos embriogénicos de esta especie, la incorporación de ABA y manitol al medio de cultivo mejora la calidad de los embriones somáticos obtenidos (Pliego-Alfaro, 1996b). En la actualidad estamos estudiando los efectos del ABA, PEG y manitol, en el proceso de maduración de embriones somáticos de aguacate para mejorar la tasa de conversión en plantas. Paralelamente se trabaja en la puesta a punto de un protocolo para la obtención de callo embriogénico a partir de tejido nucelar.

### **APLICACIONES DE LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA EN LA OBTENCIÓN DE MATERIAL TOLERANTE A PATÓGENOS DE SUELO**

Las enzimas hidrolíticas  $\beta$ -1-3 glucanasa y quitinasa juegan un importante papel en reacciones de defensa frente a patógenos fúngicos debido a sus efectos en la degradación de paredes celulares de hongos (Jach *et al.*, 1995). Punja y Raharjo (1996) han incrementado la tolerancia a distintos patógenos fúngicos de zanahoria usando un gen de quitinasa de tabaco, pero no tuvieron éxito cuando utilizaron un gen de quitinasa de petunia. Estos autores concluyeron que el tipo de quitinasa expresado, el patógeno fúngico y la especie en cuestión afectan a la respuesta final. Por otra parte, parece aceptado que la sobreexpresión simultánea de quitinasa y glucanasa es muy efectiva en el incremento de la tolerancia a patógenos (Jach *et al.*, 1995; Zhu *et al.*, 1994).

Experimentos de control biológico realizados en aguacate han puesto de manifiesto que *Trichoderma* spp. son hongos antagonistas efectivos en el control de *Rosellinia necatrix* (Freeman *et al.* 1986; Szejnberg *et al.*, 1987). Este efecto antagonista de *Trichoderma* ha sido confirmado por miembros de nuestro grupo de trabajo (Dr. Monte, Universidad de Salamanca; Dr. Llobell, Universidad de Sevilla y Dr. Lopez-Herrera, CSIC, La Mayora, Málaga) mediante experimentos en los que se utilizaron cultivos en placa de ambos

patógenos. En la actualidad están en marcha los trabajos encaminados a aislar los genes de *Trichoderma* responsables de este efecto antagonista para transformar callo embriogénico y obtener plántulas con mayor tolerancia a *Rosellinia necatrix*.

### AGRADECIMIENTOS

Nuestros trabajos de investigación sobre aguacate han sido financiados por el Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria, Proyectos INIA 8186, INIA SC-98-042 y la Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología (CICYT), Proyecto AGF 95-0588-C02-01.

### LITERATURA CITADA

- ADAMS, C.A.; RINNE, R.W. 1980. Moisture content as a controlling factor in seed development and germination. *International Review of Cytology* 68: 1-8.
- ARRILLAGA, I.; MARZO, T.; SEGURA, J. 1991. Micropropagation of juvenile and adult *Sorbus domestica* L. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 27: 341-348.
- AZCON-AGUILAR, C.; BARCELÓ, A.; VIDAL, M.T.; DE LA VIÑA, G. 1992. Further studies on the influence of mycorrhizae on growth and development of micropropagated avocado plants. *Agronomie* 12: 837-840.
- BARCELÓ-MUÑOZ, A. 1995. Micropropagación de aguacate (*Persea americana* Mill.). Aspectos histológicos del proceso de vitrificación. Tesis doctoral. Facultad de Ciencias. Universidad de Málaga. Málaga, España.
- BARCELÓ-MUÑOZ, A.; PLIEGO-ALFARO, F.; BAREA, J.M. 1990. Micropropagación de aguacate (*Persea americana* Mill.) en fase juvenil. *Actas de Horticultura* 1: 503-506.
- BARCELÓ-MUÑOZ, A.; SIMÓN-PÉREZ, E.; LOPEZ-ENCINA, C.; PLIEGO-ALFARO, F. 1999. Micropropagation of adult avocado (*Persea americana* Mill.). *Plant Cell Tissue and Organ Culture* (En prensa).
- BENECH ARNOLD, R.L.; FENNER, M.; EDWARDS, P.J. 1991. Changes in germinability, ABA content and ABA embryonic sensitivity in developing seeds of *Shorghum bicolor* (L.) Moench induced by water stress during grain filling. *New Phytologist* 118: 339-347.
- BERTHON, J.Y.; MALDINEY, R.; SOTTA, B.; GASPAR, T.; BOYER, N. 1989. Endogenous levels of plant hormones during the course of adventitious rooting in cuttings of *Sequoiadendron giganteum* (Lindl.) *in vitro*. *Biochimie Physiologie Pflanzen* 184: 405-412.
- CAPELLADES, M.; LEMEUR, R.; DEBERGH, P. 1991. Effects of sucrose on starch accumulation and rate of photosynthesis in *Rosa* cultured *in vitro*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 25: 21-26.
- CRUZ-HERNANDEZ, A.; WITJAKSONO; LITZ, R.E.; GOMEZ-LIM, M. 1998. *Agrobacterium tumefaciens* -mediated transformation of embryogenic avocado cultures and regeneration of somatic embryos. *Plant Cell Reports* 17: 497-503.
- DE LA VIÑA, G.L.; AZCÓN-AGUILAR, C.; AZCÓN, R.; BAREA, J.M.; BARCELÓ, A.; PLIEGO-ALFARO, F. 1996. Effects of arbuscular mycorrhizas in the acclimatization of micropropagated avocado plants, pp. 491-494. *In: Mycorrhizas in Integrated Systems. From Genes to Plant Development*. C.Azcón-Aguilar, J.M. Barea, (eds.). Directorate General XII Science, Research and Development, B-1049 Bruselas.

- DE LA VIÑA, G.; PLIEGO-ALFARO, F.; DRISCOLL, S.P.; MITCHELL, V.; PARRY, M.A.; LAWLOR, D.W. 1999. Effects of CO<sub>2</sub> and sugars on photosynthesis and composition of avocado leaves grown *in vitro*. *Plant Physiology and Biochemistry* 37: 1-9.
- FINKELSTEIN, R.R.; CROUCH, M.L. 1986. Rapeseed embryo development in culture on high osmoticum is similar to that in seeds. *Plant Physiology* 81: 907-912.
- FREEMAN, S.; SZTEJNBERG, A.; CHET, I. 1986. Evaluation of *Trichoderma* as a biocontrol agent for *Rosellinia necatrix*. *Plant and Soil* 94: 163-170.
- FROLICH, E.F.; PLATT, R.G. 1972. Use of the etiolation technique in rooting avocado cuttings. *California Avocado Society Yearbook* 55: 97-109.
- GARCÍA-GÓMEZ, M.L.; SANCHEZ-ROMERO, C.; BARCELÓ-MUÑOZ, A.; HEREDIA, A.; PLIEGO-ALFARO, F. 1994. Levels of endogenous indole-3-acetic acid and indole-3-acetylaspatic acid during adventitious rooting in avocado microcuttings. *Journal Experimental Botany* 45: 865-870.
- GARCIA-GÓMEZ, M.L.; SANCHEZ-ROMERO, C.; BARCELÓ-MUÑOZ, A.; HEREDIA, A.; PLIEGO-ALFARO, F. 1995. Peroxidase activity during root formation in avocado microcuttings. *Canadian Journal of Botany* 73: 1522-1526.
- GARDNER, R.C. 1993. Gene transfer into tropical and subtropical crops. *Scientia Horticulturae* 55: 65-82.
- GEORGE, E.F., 1993. *Plant Propagation by Tissue Culture. I. The Technology.* Exegetics Ltd., Edington, England.
- HOOD, J.V.; LIBBY, W. J. 1978. Continuing effects of maturation state in radiata pine and a general maturation model, pp.220-232. *In: Propagation of Higher Plants by Tissue Culture-A Bridge between Research and Application*, K.W. Huges, R. Henke, R. Constantin, (eds.). Oak Ridge, USDOE.
- HUANG, L-CH.; CHIU, D-S.; MURASHIGE, T.; VAN GUNDY, R.; MAHDI, EL F.M.; NAGAI, K.; PLIEGO-ALFARO, F. 1990. Rejuvenation of trees and other perennials for restoration of rooting competence, pp. 251-264. *In: Tecnicas e Aplicacoes da Cultura de Tecidos de Plantas*, A. C. Torres, L. S. Caldas, (eds.) Brasilia, ABCTP/EMBRAPA-CNPQ.
- JACH, G.; GÖRNHARDT, B.; MUNDY, J.; LOGEMANN, J.; PINDSFORF, E.; LEAH, R.; SCHELL, J.; MAAS, C. 1995. Enhanced quantitative resistance against fungal disease by combinatorial expression of different barley antifungal proteins in transgenic tobacco. *Plant Journal* 8: 91-109.
- JORGENSEN, R. 1993. The modification of horticultural plant phenotypes by direct gene transfer. *Scientia Horticulturae* 55: 1-4.
- KELLAM, M.K.; COFFEY, M.D., 1985. Quantitative comparison of the resistance to *Phytophthora* root rot in three avocado rootstocks. *Phytopathology* 75: 230-234..
- KÖHNE, J.S., 1992. Field evaluation of "Hass" avocado grown on Duke-7, G6 and G755C rootstocks. *Proceedings II World Avocado Congress*, Riverside, USA. pp. 301-303.
- LAMPORT, D.T.A. 1986. Roles for peroxidase in cell wall genesis, pp. 199-208. *In: Molecular and Physiological Aspects of Plant Peroxidases.* H. Greppin, C. Penel, Th. Gaspar (eds.) University of Geneve, Geneve, Switzerland.
- MILLER, A.R.; CRAWFORD, D.L.; ROBERTS, L.W. 1985. Lignification and xilogenesis

- in *Lactuca* pith explants cultured *in vitro* in the presence of auxin and cytokinin: A role for endogenous ethylene. *Journal Experimental Botany* 36: 110-118.
- MOONEY, P.A.; VAN STANDEN, 1987. Induction of embryogenesis in callus from immature embryos of *Persea americana* Mill. *Canadian Journal Botany* 65: 622-626.
- MORRIS, P.C.; WEILER, E.W.; MADDOCK, S.E.; JONES, M.G.K.; LENTON, J.R.; BOWLES, D.J. 1998. Determination of endogenous abscisic acid levels in immature cereal embryos during *in vitro* culture. *Planta* 173:110-116.
- PHILLIPS, D.; WESTE, G.; HINCH, J.M. 1991. Resistance to *Phytophthora cinnamomi* in callus derived from three avocado cultivars. *Canadian Journal Botany* 69: 2026-2032.
- PLIEGO-ALFARO, F. 1988. Development of an *in vitro* rooting bioassay using juvenile-phase stem cuttings of *Persea americana* Mill. *Journal Horticultural Science* 63: 295-301.
- PLIEGO-ALFARO, F.; BERGH, B.O., 1992. Avocado, pp. 323-333. *In: Biotechnology of Perennial Fruit Crops*. F.A. Hammerschlag, R.E. Litz, (eds.). CAB International, Wallingford.
- PLIEGO-ALFARO, F.; LITZ, R.E.; MOON, P.A.; GRAY, D.J., 1996a. Effect of abscisic acid, osmolarity and temperature on *in vitro* development of recalcitrant mango nucellar embryos. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 44: 53-61.
- PLIEGO-ALFARO, F.; LÓPEZ-ENCINA, C.; BARCELÓ-MUÑOZ, A. 1987. Propagation of avocado rootstocks by tissue culture. *South African Avocado Growers' Association Yearbook* 10: 36-39.
- PLIEGO-ALFARO, F.; MONSALUD, M.J.R.; LITZ, R.E.; GRAY, D.J.; MOON, P.A. 1996b. Effect of abscisic acid, osmolarity and partial desiccation on the development of recalcitrant mango somatic embryos. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 44: 63-70.
- PLIEGO-ALFARO, F.; MURASHIGE, T., 1987. Possible rejuvenation of adult avocado by graftage onto juvenile rootstocks *in vitro*. *HortScience* 22: 1321-1324.
- PLIEGO-ALFARO, F.; MURASHIGE, T. 1988. Somatic embryogenesis in avocado (*Persea americana* Mill.) *in vitro*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 112: 61-66.
- PLUSS, R.; TITUS, J.; MEIER, H. 1989. IAA-induced adventitious root formation in greenwood cuttings of *Populus tremula* and formation of 2-indolenone-3-acetylaspatic acid, a new metabolite of exogenous applied indole-3-acetic acid. *Physiologia Plantarum* 75: 89-96.
- PUNJA, Z.K.; RAHARJO, S.H.T. 1996. Response of transgenic cucumber and carrot plants expressing different chitinase enzymes to inoculation with fungal pathogens. *Plant Disease* 80: 995-1005
- ROBERTS, D.R. 1991. Abscisic acid and mannitol promote early development, maturation and storage protein accumulation in somatic embryos of interior spruce. *Physiologia Plantarum* 83: 247-257.
- SCHUERMAN, P.L.; DANDEKAR, A.M. 1993. Transformation of temperate woody crops: Progress and potentials. *Scientia Horticulturae*, 55: 101-124.
- SRISKANDARAJAN, S.; MULLINS, M.G.; NAIR, Y. 1982. Induction of adventitious rooting *in vitro* in difficult-to-propagate cultivars of apple. *Plant Science Letters* 24: 1-9.

- SZTEJNBERG, A.; FREEMAN, S.; CHET, I.; KATAN, J. 1987. Control of *Rosellinia necatrix* in soil and in apple orchard by solarization and *Trichoderma harzianum*. *Plant Disease* 71: 365-369.
- SZTEJNBERG, A.; OMARY, N.; PINKAS, Y., 1983. *Dematophora* root rot on avocado trees in Israel and development of a diagnostic method. *Phytoparasitica* 11: 238-239 (Abstract).
- VAN DEN BULK, R.W., 1991. Application of cell and tissue culture and *in vitro* selection for disease resistance breeding- a review. *Euphytica* 56: 269-285.
- VIDAL, M.T.; AZCÓN-AGUILAR, C.; PLIEGO-ALFARO, F.; BAREA, J.M. 1992. Mycorrhizal inoculation enhances growth and development of micropropagated plants of avocado. *HortScience* 27: 785-787.
- WELBAUM, G.E.; TISSAOUI, T.; BRADFORD, K.J. 1990. Water relations of seed development and germination in muskmelon (*Cucumis melo* L.). III. Sensitivity of germination to water potential and abscisic acid during development. *Plant Physiology* 92: 1029-1037.
- ZHU, Q.; MAHER, E.A.; MASOUD, S.; DIXON, R.A.; LAMB, C.J., 1994. Enhanced protection against attack by constitutive co-expression of chitinase and glucanase genes in transgenic tobacco. *Bio/Technology* 12: 807-912.