

## ■ Inducción de brotes de dos cultivares de aguacate *Persea americana* Mill.

A. Ibarra López<sup>1</sup>, A. Gutiérrez Diez<sup>2</sup>, E. A. García Zambrano<sup>2</sup>, M. C. Ojeda Zacarías<sup>1</sup>

<sup>1</sup>. Facultad de Agronomía, Universidad Autónoma de Nuevo León, Unidad Marín, México

<sup>2</sup>. Facultad de Agronomía, Universidad Autónoma de Nuevo León, Campus Ciencias Agropecuarias, Gral. Escobedo, México.

### RESUMEN

Las microestacas de dos cultivares de aguacate, fueron establecidas en medios de cultivo MS, DCR, Yasuda y B5, adicionados con 2.0 mg L<sup>-1</sup> de BAP, 0.3 mg L<sup>-1</sup> de AIB, 2.0 g L<sup>-1</sup> de oxitetraciclina y 2.0 g L<sup>-1</sup> de benomilo. Después de dos semanas de permanecer en estas condiciones, se evaluó el porcentaje de contaminación, oxidación y viabilidad de los explantes. Resultando que el medio de cultivo Yasuda fue el más adecuado en el establecimiento *in vitro*, generando mayor supervivencia de explantes. Los explantes viables fueron subcultivados a los medios de inducción de brotes, los cuales fueron MS, DCR y Yasuda suplementados con 20 % de agua de coco (AC), 2.0 mg L<sup>-1</sup> de BAP, 0.5 mg L<sup>-1</sup> de AG3 y 0.01 mg L<sup>-1</sup> de AIA; 2.0 g L<sup>-1</sup> de caseína hidrolizada (CH), 1.0 mg L<sup>-1</sup> de BAP y 0.3 mg L<sup>-1</sup> de AIB. Se evaluaron las variables número y longitud de brotes, además del número de hojas a las 8, 12 y 16 semanas de permanecer en estas condiciones de cultivo. Los mayores resultados se presentaron en el M3 (Yasuda + AC, BAP, AG3 y AIA), con un promedio de proliferación de brotes de 2.89 por explante a las 16 semanas. Mientras que, el crecimiento de brotes osciló entre 1.26 a 2.01 cm; y el desarrollo de hojas, alcanzó un promedio de 3.18 hojas por brote. La adición de caseína hidrolizada en los diferentes medios de cultivo, no favoreció el desarrollo de brotes en los cultivares utilizados.

Palabras clave: Organogénesis, In vitro, Agua de coco, Caseína hidrolizada.

### INTRODUCCIÓN

El aguacate (*Persea americana* Mill) es un importante cultivo frutal de las zonas tropicales y subtropicales, originario del área de Mesoamérica (Premkumar *et al.*, 2003; Galindo-Tovar *et al.*, 2008). Es un árbol perenne de la familia Lauraceae cultivado por sus frutos los cuales son una fuente balanceada de proteínas, carbohidratos, vitaminas y minerales, pero sobre todo por su alto contenido de aceites (Ben-Ya'acov y Michelson, 1995; Knight, 2002; Chanderbali *et al.*, 2008).

Programas de mejoramiento para incorporar resistencia a enfermedades y otros rasgos deseables en el aguacate, son tardados y minuciosos por su largo período juvenil y heterocigosis (Ben-Ya'acov, 1987; Pliego-Alfaro y Bergh, 1992; Litz *et al.*, 2007; Raharjo *et al.*, 2008). De igual manera se ve afectado el uso de portainjertos a partir de semilla, los cuales no garantizan homogeneidad genética y comportamiento estable en campo (Ben-Ya'acov, 1987; Köhne, 1992). Sin embargo, la propagación clonal de aguacate se ha logrado principalmente por injerto, un proceso costoso y que consume mucho tiempo (Brokaw, 1987). Debido a esto, se deben implementar y desarrollar diversos métodos de propagación deseables para el cultivo de aguacate (Barceló-Muñoz *et al.*, 1999). La micropropagación vegetal en aguacate está enfocada en propagar en masa portainjertos de interés comercial, o para revitalizar material adulto que posteriormente podría multiplicarse por técnicas convencionales (Barceló-Muñoz y Pliego-Alfaro, 2003).

La comprensión de los factores que controlan el proceso de desarrollo *in vitro* es esencial para el establecimiento de un sistema eficiente de regeneración (Ahmed, 2002). En aguacate, la regeneración por medio de organogénesis directa ha sido reportada en la literatura, sin embargo, diversos factores pueden afectar significativamente el éxito de este cultivo como: cultivar utilizado, la composición del medio de cultivo, concentración de los reguladores de crecimiento y su interacción con el medio, tipo de explante y su etapa de desarrollo, y época de recolecta del material vegetal (Cooper, 1987; Dalsaso y Guevara, 1988; Zirari y Lionakis, 1994; Castro *et al.*, 1995; Barringer *et al.*, 1996; Barceló-Muñoz *et al.*, 1999; Rodríguez *et al.*, 1999; de la Viña *et al.*, 2001; Vidales-Fernández, 2002; Barceló-Muñoz y Pliego-Alfaro, 2003; Nhut *et al.*, 2008; Zulfiqar *et al.*, 2009; Cortés-Rodríguez *et al.*, 2011).

Por lo anterior, el objetivo de la presente investigación está dirigido hacia la identificación del medio de cultivo y la combinación de reguladores de crecimiento y suplementos, adecuados para las etapas de establecimiento e inducción de brotes en dos cultivares de aguacate (*P. americana* Mill).

### MATERIALES Y MÉTODOS

La presente investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Facultad de Agronomía Unidad Marín, UANL, localizado en la carretera Zuazua-Marín km 17.5, durante el periodo Agosto 2013 a Diciembre 2014.

#### Material vegetal

El germoplasma vegetal fue recolectado de árboles de aguacate en desarrollo, de los cultivares Bacon y Mantequilla provenientes del municipio de Aramberri, N. L., y establecidos en condiciones de invernadero durante el periodo de la investigación.

#### Proceso de desinfección

La pre-desinfección consistió en seleccionar varetas de 10 a 15 cm de longitud en óptimas condiciones y con gran número de yemas axilares, las cuales se lavaron con jabón líquido y se enjuagaron con agua potable. Posteriormente fueron seccionadas en unidades de 2-3 cm aproximadamente.

Con la finalidad de disminuir el porcentaje de fenoles, el material vegetal se colocó en una solución jabonosa por tres lapsos de 10 min c/u y en constante agitación. Seguido de tres enjuagues con agua bidestilada para proceder a colocarlos en una solución fungicida-bactericida compuesta de 2.0 g L<sup>-1</sup> de Agy-Gent Plus 800 (Gowan Mexicana), 1.5 mL L<sup>-1</sup> de Amistar Gold (Syngenta), 2.0 g L<sup>-1</sup> de Antrak 500 PH (Agroquímica Tridente), 800 mg L<sup>-1</sup> de ácido cítrico, 800 mg L<sup>-1</sup> de ácido ascórbico y 30 g L<sup>-1</sup> de sacarosa durante 1.5 horas en agitación, finalizando con un enjuague con agua bidestilada. En estas condiciones el material vegetal fue llevado a la campana de flujo laminar para realizar la desinfección.

La desinfección consistió en la inmersión del material vegetal en etanol 100 % durante 1.0 min, seguido de una inmersión en una solución con blanqueador comercial al 50 % v/v más 0.2 % de Tween-20 durante 20 min. Concluido el tiempo se enjuagó tres veces con agua bidestilada estéril. Inmediatamente el material vegetal se colocó en una solución de PVP (polivinilpirrolidona) 400 mg L<sup>-1</sup> para reducir la oxidación del mismo. Finalmente el material fue seccionado en explantes de 1.0 cm de longitud para ser utilizados posteriormente en los medios de establecimiento.

#### Establecimiento *in vitro*

El tipo de explantes utilizados fueron segmentos internodales con una o dos yemas axilares (microestacas), los cuales fueron sembrados en los medios de cultivo MS (Murashige y Skoog, 1962) con macroelementos al 50 %, DCR (Gupta y Durzan, 1985), Yasuda (Yasuda *et al.*, 1985) y B5 (Gamborg *et al.*, 1968), suplementados con vitaminas, 30 (MS, DCR y Yasuda) y 20 g L<sup>-1</sup> (B5) de sacarosa, 2.0 mg L<sup>-1</sup> de 6-bencilaminopurina (BAP), 0.3 mg L<sup>-1</sup> de ácido indol-3-butírico (AIB), 2.0 g L<sup>-1</sup> de oxitetraciclina, 2.0 g L<sup>-1</sup> de benomilo y 4.4 g L<sup>-1</sup> de Phytigel™. El pH se ajustó a 5.5 en el medio B5, 5.7 en MS y Yasuda, y 6.0 en DCR. Los medios de cultivo se solidificaron con 4.4 g L<sup>-1</sup> de Phytigel™ y se esterilizaron a 1.2 kg cm<sup>-2</sup> de presión a 121 °C durante 15 min. Las unidades experimentales fueron incubadas a una temperatura de 26 ± 2 °C bajo un fotoperíodo de 16 h luz y 8 h oscuridad. En esta etapa se evaluó la contaminación, oxidación y viabilidad de los explantes después de dos semanas del establecimiento *in vitro*.

#### Inducción de brotes

Después de 14 días del establecimiento *in vitro*, las microestacas viables se subcultivaron a los medios de cultivo MS con macroelementos al 50 %, DCR y Yasuda, adicionados con vitaminas, 30 g L<sup>-1</sup> de sacarosa y solidificados con 4.4 g L<sup>-1</sup> de Phytigel™; además suplementados de las combinaciones: 20 % de agua de coco (AC), 2.0 mg L<sup>-1</sup> de BAP, 0.01 mg L<sup>-1</sup> de ácido indolacético (AIA) y 0.5 mg L<sup>-1</sup> de ácido giberélico (AG3); o la combinación de 2.0 g L<sup>-1</sup> de caseína hidrolizada (CH), 1.0 mg L<sup>-1</sup> de BAP y 0.3 mg L<sup>-1</sup> de AIB (Cuadro 1). El pH de los medios de cultivo se ajustó a 5.7 (MS y Yasuda) y 6.0 (DCR), y posteriormente se esterilizaron a 1.2 kg cm<sup>-2</sup> de presión a 121 °C durante 15 min. Las microestacas se incubaron bajo las mismas condiciones descritas anteriormente, y se evaluó el número de brotes por explante, longitud de brotes y número de hojas a 8, 12 y 16 semanas después del subcultivo.

**Cuadro 1. Medios de cultivo utilizados para la etapa de inducción de brotes**

Medio basal	AC + BAP + AG3 + AIA	CH + BAP + AIB
MS	M1	M4
DCR	M2	M5
Yasuda	M3	M6

#### Análisis estadístico

El modelo estadístico utilizado para la etapa de inducción de brotes, fue un diseño completamente al azar con un arreglo factorial 2 x 6, donde el factor A son los cultivares y el factor B son los medios de inducción, obteniendo un total de 12 tratamientos con seis repeticiones. Se realizó un análisis de varianza y las diferencias entre las medias de los tratamientos se evaluaron mediante la prueba de Tukey a 5 % de probabilidad. En esta etapa se evaluó el número de brotes por explante, longitud de brotes y número de hojas a 8, 12 y 16 semanas. Los datos se analizaron utilizando el paquete estadístico Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) versión 21.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### Establecimiento aséptico

La contaminación microbiana y el oscurecimiento de explantes son las mayores dificultades para el establecimiento *in vitro* de cultivares de aguacate de la raza Mexicana (Cortés-Rodríguez *et al.*, 2011). El proceso de desinfección del material vegetal tuvo diversos efectos en las variables evaluadas.

#### Respuesta del proceso de desinfección

La contaminación para los medios utilizados, en los dos cultivares a 14 días de establecido el experimento, fue superior al 50 % en el cultivar Mantequilla. En el caso del cultivar Bacon, la contaminación no rebasó el 45 % en los medios utilizados a excepción del medio de cultivo DCR (66.66 %) (Cuadro 2). Es importante señalar que esta variable se vio afectada por la presencia de hongos y bacterias, los cuales impidieron el desarrollo favorable de al menos 50 % de los explantes. Resultados similares muestra Cooper (1987), con 70 % de contaminación en el cultivar Duke 7, reduciendo el efecto a 16 % con el uso de etanol 100 % y una solución de hipoclorito de sodio (NaClO) 0.5 % durante 30 min. Por su parte Dalsas y Guevara (1988), observaron el alto porcentaje de contaminación por bacterias en microestacas del cultivar Fuerte, donde el uso de bactericida en la desinfección y tratamiento de la planta madre, no fueron efectivos para disminuir la contaminación, por lo que sugieren que el patógeno se encuentra de forma endógena, situado posiblemente en los tejidos vasculares de la porción del tallo. En contribución a lo anterior, Vidales-Fernández (2002), recomienda utilizar la combinación de Agrimycin y benomilo en la pre-desinfección de los explantes, y una desinfección de hasta 40 % v/v de blanqueador comercial y sembrar los explantes en medio de cultivo adicionado con benomilo hasta 2 g L<sup>-1</sup>.

Zulfiqar *et al.* (2009), reportan hasta 72 % de contaminación por hongos y bacterias en microestacas del cultivar Fuerte, recomendando que 1.0 % de NaClO es suficiente para la desinfección del material vegetal sin dañar gravemente al explante.

### Oxidación

En el caso de la oxidación, se hizo presente en los medios de cultivo MS y B5, con resultados que no rebasaron el 7 % (MS), y mayores al 20 % (B5) en ambos cultivares (Cuadro 2). El bajo porcentaje de oxidación en los explantes puede deberse al uso de los diferentes agentes antioxidantes en los procesos de desinfección, como el lavado del material vegetal con agua potable durante 30 min, reportado por Vidales-Fernández (2002), así como el uso de PVP reportado por Dalsaso y Guevara (1988). Investigaciones más recientes sugieren la adición de ácido ascórbico y carbón activado al medio de cultivo para reducir hasta un 70 % el proceso de oxidación (Cortés-Rodríguez *et al.*, 2011).

### Viabilidad

La viabilidad de los explantes se presentó en rangos de 21 a 56 % en los medios de cultivo MS y DCR, en los cultivares utilizados. A diferencia de los anteriores, el medio de cultivo Yasuda demostró una viabilidad en los explantes, entre 41 y 56 % en ambos cultivares. En el medio de cultivo B5, la viabilidad fue superior al 50 % en el cultivar Bacon, pero considerablemente baja en el cultivar Mantequilla (14 %). Cabe señalar que esta variable se vio afectada por el proceso de contaminación y oxidación, que se desarrolló en el tiempo transcurrido después del establecimiento aséptico del material vegetal (Cuadro 2).

**Cuadro 2. Porcentajes de contaminación, oxidación y viabilidad a dos cultivares de aguacate en tres medios de cultivo después de dos semanas del establecimiento in vitro**

Cultivar/Medio	Contaminación	Oxidación	Viabilidad
Bacon			
MS	37.5	6.25	56.25
DCR	66.66	0	33.33
Yasuda	43.58	0	56.41
B5	18.18	27.27	54.54
Mantequilla			
MS	65.9	6.81	27.27
DCR	78.72	0	21.27
Yasuda	58.69	0	41.3
B5	61.76	23.52	14.7

### Inducción de brotes

Explantes viables provenientes de la etapa de establecimiento de ambos cultivares, se subcultivaron a los medios de inducción de brotes, y se evaluaron las variables número de brotes, longitud de brotes (cm) y número de hojas a 8, 12 y 16 semanas después del establecimiento.

### Número de brotes

El análisis de varianza demostró diferencia significativa en la formación de brotes de ambos cultivares, en los tiempos evaluados. De acuerdo a la comparación de medias se tiene que el medio M3 (Yasuda + AC, BAP, AG3 y AIA), es el más favorable con valores promedio de 1.72, 1.85 y 2.89 brotes, sig.  $p \leq 0.05$ ; mientras que se presentaron valores intermedios en los medios M2, M4 y M6, con promedios de 1.26 hasta 2.08 brotes por explante (Cuadro 3). Resultados similares se han obtenido en el mismo tipo de explante, pero con modificaciones en la cantidad de reguladores de crecimiento, en diferentes cultivares, época de desarrollo, así como tipo y concentración de sales en el medio de cultivo; considerando que todos son constantes en el uso de BAP (0.1 hasta 5.0 mg L<sup>-1</sup>) adicionado al medio de cultivo (Cooper, 1987; Dalsaso y Guevara, 1988; Barceló-Muñoz *et al.*, 1999; Vidales-Fernández, 2002; Zulfiqar *et al.*, 2009; Cortés-Rodríguez *et al.*, 2011). Sandoval-Prando *et al.* (2014), mencionan que los reguladores de crecimiento desempeñan un papel clave en el desarrollo cualitativo y cuantitativo de los brotes.

Estos resultados al igual que investigaciones previas, indican que el BAP, juega un importante papel en la inducción de brotes y su longitud en explantes de aguacate (Barceló-Muñoz y Pliego-Alfaro, 2003; Zulfiqar *et al.*, 2009; Cortés-Rodríguez *et al.*, 2011; Sandoval-Prando *et al.*, 2014). Sin embargo, Barceló-Muñoz y Pliego-Alfaro (2003) y Cortés-Rodríguez *et al.* (2011), mencionan que altas concentraciones de este regulador no solo reducen el número de brotes formados, sino que además detiene el crecimiento de los mismos.

Sandoval-Prando *et al.* (2014), indican que el uso de agua de coco en el medio de cultivo, normalmente no es suficiente para promover una multiplicación satisfactoria, por lo que sugieren su combinación con BAP y AG3.

**Cuadro 3. Comparación de medias sobre el efecto de los medios de inducción en el número de brotes a 8, 12 y 16 semanas**

Medio	Número de brotes		
	8	12	16
M1	1.16 b	1.16 b	1.39 b
M2	1.57 ab	1.73 ab	2.08 ab
M3	1.72 a	1.85 a	2.89 a
M4	1.26 ab	1.24 ab	1.26 b
M5	1.15 b	1.29 ab	1.37 b
M6	1.36 ab	1.52 ab	1.64 b

†Medias con la misma letra en cada columna no muestran diferencia significativa, Tukey sig.  $p \leq 0.05$ .

#### Longitud de brotes

De acuerdo al análisis de varianza, se presentó diferencia significativa en la longitud de brotes de ambos cultivares a 12 y 16 semanas después del establecimiento *in vitro*. La comparación de medias demostró de igual manera que el medio M3, resultó ser el más favorable para el crecimiento de los brotes, con valores promedio de 1.3 y 2.01 cm respectivamente, sig.  $p \leq 0.05$ . Sin embargo, el medio M2 presentó valores muy cercanos al medio anterior a 12 y 16 semanas, con promedios de 1.21 y 1.54 cm respectivamente. En todos los casos, los medios M1 y M5 son los menos favorecedores en el crecimiento de los brotes formados (Cuadro 4). Estos resultados coinciden con trabajos anteriores donde se reporta un crecimiento de 0.89 hasta 2.5 cm en diferentes cultivares de aguacate, utilizando los medios de cultivo MS con macroelementos modificados y DF (Dixon y Fuller, 1976); ambos con la presencia de BAP en concentraciones de 0.5 a 5.0 mg L<sup>-1</sup> (Dalsaso y Guevara, 1988; Rodríguez *et al.*, 1999; Zulfqar *et al.*, 2009; Cortés-Rodríguez *et al.*, 2011). Vidales-Fernández (2002), menciona que la reducción de los macroelementos en el medio MS resulta benéfico para el desarrollo de brotes, pero induce una reducción de los mismos y por consecuencia una menor cantidad de yemas axilares. Esto puede sugerir el bajo crecimiento de los brotes en los tratamientos utilizados, ya que el medio MS se utilizó con macroelementos al 50 %, mientras que el Yasuda es una modificación del MS con macroelementos al 25 % y vitaminas de Gamburg; el medio DCR difiere en la cantidad de nitrato de amonio y nitrato de potasio y además se complementa con la adición de nitrato de calcio.

**Cuadro 4. Comparación de medias sobre el efecto de los medios de inducción en la longitud de brotes a 8, 12 y 16 semanas**

Medio	Longitud de brotes (cm)		
	8	12	16
M1	1.04 a	1.05 b	1.16 b
M2	1.21 a	1.21 ab	1.54 ab
M3	1.26 a	1.3 a	2.01 a
M4	1.16 a	1.15 ab	1.28 b
M5	1.04 a	1.05 b	1.16 b
M6	1.16 a	1.15 ab	1.17 b

†Medias con la misma letra en cada columna no muestran diferencia significativa, Tukey sig.  $p \leq 0.05$ .

#### Número de hojas

En la formación de hojas en los brotes de ambos cultivares, se presentó diferencia significativa en los tiempos evaluados. La comparación de medias demostró que los medios M2 y M3, favorecen el desarrollo de hojas a ocho semanas, con valores promedio de 2.04 y 2.09 hojas respectivamente, sig.  $p \leq 0.05$ . En cuanto que a 12 y 16 semanas, el medio M3 tiene los mejores resultados, 2.26 y 3.18 hojas por brote respectivamente. Fue evidente el bajo efecto del medio M1 en el desarrollo de hojas en ambos cultivares, con valores que no superan 1.31 hojas por brote (Cuadro 5). Estos resultados son bajos comparándolos con lo reportado por Zirari y Lionakis (1994), para los cultivares Topa-Topa, Fuerte, Hass y Duke con valores de 3.9 hasta 8.25 hojas por explante, utilizando material etiolado y no etiolado en medio MS de doble fase. De igual forma, de la Viña *et al.* (2001), obtuvieron valores de hasta 4.8 hojas por microestaca en el cultivar RR-86, utilizando el medio de cultivo MS con 50 % de macroelementos y 1.3  $\mu$ M de BAP. Dalsaso y Guevara (1988), aportaron que las microestacas del cultivar Fuerte, presentan hojas muy desarrolladas de lámina totalmente extendida, a diferencia de utilizar yemas axilares, las cuales separadas de la porción del tallo, quedan libres de las correlaciones que estas tenían con el tejido e inician un proceso morfogenético diferente, modulado por la capacidad interna y el medio de cultivo.

**Cuadro 5. Comparación de medias sobre el efecto de los medios de inducción en el número de hojas a 8, 12 y 16 semanas**

Medio	Número de hojas		
	8	12	16
M1	1.19 b	1.21 c	1.31 b
M2	2.04 a	2.06 ab	2.24 ab
M3	2.09 a	2.26 a	3.18 a
M4	1.43 ab	1.38 bc	1.61 b
M5	1.28 b	1.26 c	1.34 b
M6	1.72 ab	1.73 abc	1.16 b

†Medias con la misma letra en cada columna no muestran diferencia significativa, Tukey sig.  $p \leq 0.05$ .

## CONCLUSIONES

En la etapa de establecimiento, los medios de cultivo MS, DCR y Yasuda permitieron el desarrollo de los explantes, sin embargo, el medio Yasuda favoreció la mayor viabilidad. Mientras que en la etapa de inducción de brotes, el medio M3 (Yasuda + AC, BAP, AG3 y AIA) fue el más satisfactorio para iniciar la proliferación y longitud de brotes, así como el desarrollo de hojas en los tiempos evaluados, en ambos cultivares.

## LITERATURA CITADA

- Ahmed, M. F. 2002. Studies on the tissue culture and potential for the development of a genetic transformation system for avocados (*Persea americana* Mill). Ph.D. Thesis, Univ. of Sydney, Australia.
- Barceló-Muñoz, A., López-Encina, C., Simón-Pérez, E., Pliego-Alfaro, F. 1999. Micropropagation of adult avocado. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 58: 11-17.
- Barceló-Muñoz, A., Pliego-Alfaro F. 2003. Micropropagation of avocado (*Persea americana* Mill). En: Jain, S. M., K. Ishii (eds), Micropropagation of Woody Trees and Fruits, 519-542.
- Barringer, S. A., Yasseen, Y. M., Splittstoesser, E. W. 1996. In vitro multiplication and plantlet establishment of avocado. *In vitro Cellular Dev. Biol. Plant*, 32(2): 119-121.
- Ben-Ya'acov, A. 1987. Avocado rootstock-scion relationships. *South Afric. Avocado Growers Assoc. Yrbk.*, 10: 30-32.
- Ben-Ya'acov, A., Michelson, E. 1995. Avocado rootstocks. *Horticultural Reviews*. John Wiley & Sons, Inc., New York.
- Brokaw, W. H. 1987. Avocado clonal propagation. *Proc. Int. Plant Prop. Soc.*, 37: 97-103.
- Castro, M., Oyanedel, E., Cautin, R. 1995. In vitro shoot proliferation in avocado (*Persea americana* Mill) induced by CPPU. Proceedings of the World Avocado Congress III. p. 223-226.
- Chanderbali, A. S., Albert, V. A., Ashworth, V. E., Clegg, M. T., Litz, R. E., Soltis, D. E., Soltis, P. S. 2008. *Persea americana* (avocado): bringing ancient flowers to fruit in the genomics era. *BioEssays*, 30: 386-389.
- Cooper, P. A. 1987. Advantages in the micropropagation of avocado (*Persea americana* Mill). *Acta Horticulturae*, 212 (2): 571-575.
- Cortés-Rodríguez, M. A., López-Gómez, R., Martínez-Pacheco, M. M., Suárez-Rodríguez, L. M., Hernández-García, A., Salgado-Garciglia, R. 2011. In vitro propagation of Mexican race avocado (*Persea americana* Mill var. *drymifolia*). *Acta Hort*, 923: 47-52.
- Dalsaso, L., Guevara, E. 1988. Multiplicación clonal *in vitro* del aguacate (*Persea americana*) cv. "Fuerte". *Agronomía Costarricense*, 13 (1): 61-71.
- De la Viña, G., Barceló-Muñoz, A., Pliego-Alfaro, F. 2001. Effect of culture media and irradiance level on growth and morphology of *Persea americana* Mill microcuttings. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 65: 229-237.
- Dixon, A., Fuller, K. W. 1976. Effect of syntetic auxin levels on *Phaseolus vulgaris* L. *Physiological Plant Pathology*, 11: 287-292.
- Galindo-Tovar, M. E., Ogata-Aguilar, N., Arzate-Fernández, A. M. 2008. Some aspects of avocado (*Persea americana* Mill) diversity and domestication in Mesoamerica. *Genet Resour Crop Evol*, 55: 441-450.
- Gamborg, O. L., Miller, R. A., Ojima, K. 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp. Cell Res*, 50: 148-151.
- Gupta, P. K., Durzan, D. J. 1985. Shoot multiplication from mature trees of Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*) and sugar pine (*Pinus*

- lambertiana*). Plant Cell Reports, 4: 177-179.
- Knight, R., Jr, J. 2002. History, distribution and uses. En: Whaley, A. W., B. Schaffer, B. N. Wolstenholme (eds) *The avocado: botany, production and uses*. CABI, Wallingford, p. 1-14.
- Köhne, J. S. 1992. Field evaluation of "Hass" avocado grown on Duke-7, G6 and G755C rootstocks. En: Lovatt, C., Holthe, P. A., Arpaia, M. L. (eds.). Proceedings of the Second World Avocado Congress, Vol. 1. University of California, Riverside, California, p. 301-303.
- Litz, R. E., Raharjo, S. H. T., Gómez-Lim, M. A. 2007. Avocado. En: Pua, E. C., M. R. Davey (eds.) *Transgenic crops V. Biotechnology in agriculture and forestry*. Springer, Berlin, p. 167-187.
- Murashige, T., Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15: 473-497.
- Nhut, D. T., Thi, N. N., Khiet, B. L. T., Luan, V. Q. 2008. Peptone stimulates *in vitro* shoot and root regeneration of avocado (*Persea americana* Mill). *Scientia Horticulturae*, 115: 124-128.
- Pliego-Alfaro, F., Bergh, B. O. 1992. Avocado. En: Hammerschlag, F. A., R. E. Litz (eds) *Biotechnology of perennial fruit crops*. CAB International, Wallingford, pp 323-333.
- Premkumar, A., Pliego-Alfaro, F., Quesada, M. A., Mercado, J. F., Barceló-Muñoz, M. A. 2003. Influence of sucrose concentrations on *in vitro* rooting, growth, endogenous sugars and ex vitro survival of juvenile avocado. *J. Hort. Sci. Biotechnol.*, 78(1): 46-50.
- Raharjo, S. T., Witjaksono, Y., Gómez-Lim, M., Padilla, G., Litz, R. 2008. Recovery of avocado (*Persea americana* Mill) plants transformed with the antifungal plant defensin gene PDF1.2. *In vitro Cell. Dev. Biol. Plant*, 44: 254-262.
- Rodríguez, N. N., Capote, M., Zamora, V. 1999. Cultivo *in vitro* del aguacatero (*Persea americana* Mill). *Revista Chapingo Serie Horticultura*, 5: 231-237.
- Sandoval-Prando, M. A., Chiavazza, P., Faggio, A., Contessa, C. 2014. Effect of coconut water and growth regulator supplements on *in vitro* propagation of *Corylus avellana* L. *Scientia Horticulturae*, 171: 91-94.
- Vidales-Fernández, I. 2002. Efecto de los reguladores de crecimiento en los procesos de organogénesis y embriogénesis somática de aguacate (*Persea americana* Mill). Tesis. Universidad de Colima, Tecomán, Colima, México.
- Yasuda, T., Fujii, Y., Yamaguchi, T. 1985. Embryogenic callus induction from *Coffea arabica* leaf explants by benzyladenine. *Plant Cell Physiol.*, 26(3): 595-597.
- Zirari, A., Lionakis, S. M. 1994. Effect of cultivar, explant type, etiolation pretreatment and the age of plant material on the *in vitro* regeneration ability of avocado (*Persea americana*). *Acta Horticulturae*, 365: 69-76.
- Zulfiqar, B., Abbasi, N. A., Ahmad, T., Hafiz, I. A. 2009. Effect of explant sources and different concentrations of plant growth regulators on *in vitro* shoot proliferation and rooting of avocado (*Persea americana* Mill) cv. "Fuerte". *Pak. J. Bot.*, 41(5): 2333-2346.



# ACTAS • PROCEEDINGS

## VIII CONGRESO MUNDIAL DE LA PALTA 2015

del 13 al 18 de Septiembre. Lima, Perú 2015

[www.wacperu2015.com](http://www.wacperu2015.com)

