



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

FACULTAD DE CIENCIAS AGRÍCOLAS Y PECUARIAS

**MICROPROPAGACIÓN DE PORTAINJERTOS CLONALES DE
AGUACATE**

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

**MAESTRA EN CIENCIAS EN RECURSOS FITOGENÉTICOS
POTENCIALES PARA LA AGRICULTURA**

PRESENTA

ANAYELI RIVERA MENDOZA

CVU/ORCID: 1194462/ <https://orcid.org/0009-0002-5765-6118?lang=en>

DIRECTOR:

DR. LUIS ANTONIO DOMÍNGUEZ PERALES

San Juan Acateno, Teziutlán Puebla Diciembre 2023.



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

FACULTAD DE CIENCIAS AGRÍCOLAS Y PECUARIAS

**MICROPROPAGACIÓN DE PORTAINJERTOS CLONALES DE
AGUACATE**

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

**MAESTRA EN CIENCIAS EN RECURSOS FITOGENÉTICOS
POTENCIALES PARA LA AGRICULTURA**

PRESENTA

ANAYELI RIVERA MENDOZA

CVU/ORCID: 1194462/ <https://orcid.org/0009-0002-5765-6118?lang=en>

DIRECTOR:

DR. LUIS ANTONIO DOMÍNGUEZ PERALES

CODIRECTOR

DR. ALEJANDRO F. BARRIENTOS PRIEGO

ASESORES

M.C. FABIEL VÁZQUEZ CRUZ

DRA. CARMELA HERNÁNDEZ DOMÍNGUEZ

San Juan Acateno, Teziutlán Puebla Diciembre 2023.

La presente tesis titulada **Micropropagación de portainjertos clonales de aguacate** realizada por **Anayeli Rivera Mendoza**, ha sido revisada y aprobada por el siguiente consejo particular, para obtener el Título de:

MAESTRA EN CIENCIAS EN RECURSOS FITOGENÉTICOS POTENCIALES
PARA LA AGRICULTURA

Facultad De Ciencias Agrícolas y Pecuarias

Consejo particular integrado por:

Firma

Director: Dr. Luis Antonio Domínguez Perales

Codirector: Dr. Alejandro F. Barrientos Priego

Asesor: M.C. Fabiel Vázquez Cruz

Asesor: Dra. Carmela Hernández Domínguez

San Juan Acateno, Teziutlán, Puebla, México. Diciembre 2023

DEDICATORIA

Dedico con todo mi corazón este trabajo a mi papá, comencé este camino con él y la termino con su ausencia, sin él no habría logrado llegar hasta esta etapa, sus consejos sobre todo su gran ejemplo, TE EXTRAÑO MUCHO, por siempre en mi corazón, gracias, papá.

A mi mamá tu bendición todos los días me protege y me lleva por el camino del bien.

A mi hermana, mi compañera de vida por estar presente en todo momento, gracias, por tanto.

AGRADECIMIENTOS

A la Benemérita Universidad Autónoma De Puebla.

A la Facultad De Ciencias Agrícolas Y Pecuarias.

A mi director de tesis Dr. Luis Antonio Domínguez Perales por los conocimientos brindados durante la elaboración de este trabajo de investigación.

ÍNDICE	
ÍNDICE DE CUADROS	ix
ÍNDICE DE FIGURAS	x
RESUMEN.....	xi
ABSTRACT	xii
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. OBJETIVOS	3
2.1 Objetivo general	3
2.2 Objetivos particulares	3
III. HIPÓTESIS.....	4
IV. REVISIÓN DE LITERATURA.....	5
4.1. Origen.....	5
4.2. Clasificación taxonómica	5
4.3. Descripción morfológica	6
4.3.1. Hojas.....	6
4.3.2. Árbol.....	7
4.3.3. Ramas.	7
4.3.4. Yemas.	7
4.3.5. Raíz.....	7
4.3.6. Fruto.	7
4.3.7. Floración.	8
4.4. Métodos de propagación	8
4.4.1 Sexual.....	8
4.4.2. Asexual.	9

4.5. Propagación vegetativa	9
4.5.2. Micropropagación.....	10
4.6. Propagación <i>in vitro</i>	11
4.7. Etapas de propagación <i>in vitro</i>	11
4.7.1. Selección y preparación de la planta madre.....	11
4.7.3. Introducción del material seleccionado <i>in vitro</i>	12
4.7.4. Multiplicación de brotes.....	12
4.7.5. Enraizamiento.....	13
4.7.6. Aclimatación.	13
4.8. Medio Murashige & Skoog (MS).	13
4.9. Organogénesis	14
4.10. Hormonas	15
4.10.1. Auxinas.....	15
4.10.2. Giberelinas.	15
4.10.3. Citocininas.....	15
V. MATERIALES Y MÉTODOS	17
5.1. Material genético	17
5.2. Localización del experimento	17
5.3. Materiales y procedimientos generales	17
5.3.1. Condiciones generales del laboratorio.	17
5.3.2. Lavado de material de laboratorio.	17
5.3.3. Cuarto de incubación.....	17
5.4. Establecimiento <i>in vitro</i>	18
5.4.1 Uso de dos agentes desinfectantes para el establecimiento <i>in vitro</i>	18

5.4.5. Descripción de los tratamientos	23
5.4.2. Comparación de medios de cultivo en el establecimiento <i>in vitro</i>	26
VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	28
6.1. Etapa de establecimiento <i>in vitro</i> desinfección con nanopartículas de plata (AgNPs)	28
6.2 Etapa de establecimiento <i>in vitro</i> desinfección con bicloruro de mercurio (HgCl ₂) ..	33
6.3 Comparación de medios de cultivo en el establecimiento <i>in vitro</i> del portainjerto clonal Duke 7	39
VII. CONCLUSIONES	44
VIII. LITERATURA CITADA.....	45

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Composición del medio de cultivo MS.....	14
Cuadro 2. Disposición de tratamientos utilizando el desinfectante NPsAg.....	24
Cuadro 3. Disposición de tratamientos utilizando el desinfectante HgCl ₂	24
Cuadro 4. Composición de los medios de cultivo.	26
Cuadro 5. Cuadrados medios y niveles de significancia para las variables de respuesta a los diferentes factores de variación en la etapa de establecimiento. Diez días después de la siembra	28
Cuadro 6. Cuadrados medios y niveles de significancia para las variables de respuesta a los diferentes factores de variación en la etapa de establecimiento. Diez días después de la siembra	32
Cuadro 7. Cuadrados medios y niveles de significancia para las variables de respuesta a los diferentes factores de variación en la etapa de establecimiento. Diez días después de la siembra.	34
Cuadro 8. Cuadrados medios y niveles de significancia para las variables de respuesta a los diferentes factores de variación en la etapa de establecimiento. Diez días después de la siembra	38

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Colecta de explantes	18
Figura 2. Lavado de explantes con jabón comercial.	19
Figura 3. Desinfección de explantes en la cabina de flujo laminar	20
Figura 4. Bicloruro de mercurio.....	21
Figura 5. Explante seccionado	22
Figura 6. Explante sembrado en medio semisólido MS	23
Figura 7. Porcentaje de supervivencia y pérdida de explantes durante el establecimiento <i>in vitro</i> con tres tipos de portainjertos clonales de aguacate y cuatro concentraciones de NPsAg. Medias con la misma letra son estadísticamente iguales (Tukey $\alpha \leq 0.05$).	29
Figura 8. Porcentaje de incidencia de contaminación por hongos durante el establecimiento <i>in vitro</i> , con tres portainjertos clonales de aguacate y cuatro concentraciones de NPsAg. Medias con la misma letra son estadísticamente iguales (Tukey $\alpha \leq 0.05$).	30
Figura 9. Porcentaje de incidencia de contaminación por hongos durante el establecimiento <i>in vitro</i> , con tres portainjertos clonales de aguacate y cuatro concentraciones de NPsAg. Medias con la misma letra son estadísticamente iguales (Tukey $\alpha \leq 0.05$).	31
Figura 10. Niveles de oxidación en el establecimiento <i>in vitro</i> de tres portainjertos clonales de aguacate con cuatro concentraciones de NPsAg. Medias con la misma letra son estadísticamente iguales (Tukey $\alpha \leq 0.05$).	33
Figura 11. Porcentaje de supervivencia y pérdida de explantes durante el establecimiento <i>in vitro</i> con tres tipos de portainjertos clonales de aguacate y dos concentraciones de HgCl ₂ . Medias con la misma letra son estadísticamente iguales (Tukey $\alpha \leq 0.05$).	35
Figura 12. Porcentaje de incidencia de contaminación por hongos durante el establecimiento <i>in vitro</i> , con tres portainjertos clonales de aguacate y dos concentraciones de HgCl ₂ . Medias con la misma letra son estadísticamente iguales (Tukey $\alpha \leq 0.05$).	36
Figura 13. Porcentaje de incidencia de contaminación por bacterias durante el establecimiento <i>in vitro</i> , con tres portainjertos clonales de aguacate y dos concentraciones de HgCl ₂ . Medias con la misma letra son estadísticamente iguales (Tukey $\alpha \leq 0.05$).	37
Figura 14. Niveles de oxidación en el establecimiento <i>in vitro</i> de tres portainjertos clonales de aguacate con cuatro concentraciones de NPsAg.	39

RESUMEN

La producción de planta de aguacate se basa principalmente en el uso de portainjertos oriundos de semilla, presentando variabilidad genética en la huerta, susceptibilidad a plagas, enfermedades y sequía. El uso de portainjertos clonales resuelve varios de los problemas que enfrenta actualmente el cultivo de aguacate. Las técnicas de propagación clonal resultan costosas y tardadas. La propagación *in vitro* es una opción viable para la multiplicación de progenies sanas y uniformes de estos portainjertos de aguacate. Para el establecimiento *in vitro*, se colectaron explantes de aproximadamente 10 cm, del cv. Duke 7, Zutano y Velvick en una solución estéril de PVPP al 5%, posteriormente se realizó un lavado superficie con jabón comercial con agitación de 5 minutos y otro lavado con alcohol al 70% durante un minuto, en la cabina de flujo laminar se realizaron las desinfecciones con los desinfectantes a probar; nanopartículas de plata en concentraciones de 200, 300, 400 y 500 ppm y Bicloruro de mercurio 0.25% y 0.5%. El tratamiento que mejor respondió para la propagación *in vitro* de portainjertos clonales de aguacate es utilizando el clon Duke desinfectado con nanopartículas de plata a 300 ppm dando 82% de supervivencia. El tratamiento más favorable para utilizar en la propagación *in vitro* con el desinfectante bicloruro de mercurio fue en el que se utilizaron expedientes de portainjerto Velvick con la concentración del 0.25% ya que se obtuvo un mayor porcentaje de supervivencia de lo contrario el mayor porcentaje de pérdida fue con el clon zutano y la concentración al 0.25%, No siempre las concentraciones altas de desinfectante van a favorecer a la supervivencia de explantes *in vitro* pues algunos desinfectantes con efecto abrasivo aumentan la producción de fenoles en los explantes y dando paso a la oxidación, necrosamiento y por consiguiente la pérdida del material vegetal.

Palabras clave: portainjerto, *in vitro*, nanopartículas de plata, bicloruro de mercurio, oxidación.

ABSTRACT

Production avocado plants is mainly based on the use of rootstocks from seed, presenting genetic variability in the orchard, susceptibility to pests, diseases and drought. The use of clonal rootstocks solves several of the problems currently facing avocado cultivation. Clonal propagation techniques are expensive and time-consuming. *In vitro* propagation is a viable option for the multiplication of healthy and uniform progenies of these avocado rootstocks. For *in vitro* establishment, explants of approximately 10 cm were collected from cv. Duke 7, Zutano and Velvick in a sterile 5% PVPP solution, subsequently a surface wash was carried out with commercial soap with stirring for 5 minutes and another wash with 70% alcohol for one minute. disinfections with the disinfectants to be tested; silver nanoparticles in concentrations of 200, 300, 400 and 500 ppm and mercury bichloride 0.25% and 0.5%. The treatment that responded best for the *in vitro* propagation of avocado clonal rootstocks is using the Duke clone disinfected with silver nanoparticles at 300 ppm, giving 82% survival. The most favorable treatment to use in *in vitro* propagation with the disinfectant mercury bichloride was the one in which Velvick rootstock files were used with the concentration of 0.25% since a higher percentage of survival was obtained otherwise the highest percentage of loss It was with the zutano clone and the concentration at 0.25%. High concentrations of disinfectant will not always favor the survival of explants *in vitro* since some disinfectants with an abrasive effect increase the production of phenols in the explants and give way to oxidation. necrosis and consequently the loss of plant material.

Keywords: rootstock, *in vitro*, silver nanoparticles, mercury bichloride, oxidation.

I. INTRODUCCIÓN

El aguacate mexicano es un producto que se consume en 34 países del mundo, con una producción nacional de 2.5 millones de toneladas (SIAP,2022), es líder en su cultivo y exportación a nivel mundial. Michoacán concentra 84.9 por ciento del volumen de producción de aguacate en México, ya que produce más de un millón de toneladas. Otras entidades que tienen participación son: Jalisco, Estado de México, Nayarit, Morelos y Guerrero (SENASICA 2017). Sin embargo, el rendimiento por hectárea es de aproximadamente de 10 t ha⁻¹ (SIAP, 2020), mientras que en otros países rondan entre 15 y 30 t ha⁻¹.

La producción de planta de aguacate se basa principalmente en el uso de portainjertos originados por semilla, que en la mayoría de los casos su origen es desconocido. Los portainjertos de semilla presentan gran variabilidad en las huertas comerciales, lo cual se manifiesta en susceptibilidad a plagas y enfermedades, sequía, alternancia productiva, dificultad en el manejo (Campos, 2012).

Las principales limitantes que enfrenta hoy el cultivo son suelos salinos, presencia de carbonatos, incidencia de la tristeza del aguacate causada por *Phitophora cinnamomi*, el replante y utilización de portainjertos de semilla, hasta algunos años atrás la importancia de utilizar estos portainjertos no fue relevante debido a que las condiciones de mercado eran estables, las condiciones actuales han cambiado y del cultivo han variado el desplazamiento de la zonas con limitantes edáficas, hace que se requiera el uso de portainjertos para hacer más eficientes los rendimientos por consecuencia, urge aumentar los niveles y calidad de la fruta producida por lo cual el uso de un buen portainjerto es un aspecto clave para definir el éxito o fracaso de una plantación (Castro 2008).

Se sabe que varios de los problemas se resuelven con el uso adecuado de portainjertos clonales (Fernández et al., 2011), por lo que existe la posibilidad de utilizar estos aunado a técnicas modernas de propagación clonal (Ernst, 1999). La propagación clonal moderna es un método muy preciso de propagación, que requiere precisión, infraestructura y mucha mano de obra. La micropropagación constituye una opción adecuada para la propagación a

gran escala de progenies genéticamente uniformes y sanas. Por tal razón el objetivo principal de la presente investigación será desarrollar una metodología de propagación *in vitro* óptimo para portainjertos seleccionados de aguacate.

II. OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

Desarrollar una técnica alterna para la etapa de desinfección y multiplicación *in vitro* de portainjertos clonales de aguacate.

2.2 Objetivos particulares

Evaluar el efecto de dos desinfectantes (nanopartículas de plata y bicloruro de mercurio) en la fase de establecimiento *in vitro* de portainjertos seleccionados.

III. HIPÓTESIS

Las nanopartículas de plata reducen la contaminación por hongos, bacterias y reduce la oxidación del explante.

IV. REVISIÓN DE LITERATURA

4.1. Origen

El aguacate es nativo de América. Originario de Mesoamérica, que es la región alta del centro de México y Guatemala (Williams, 1976). Los restos fósiles de aguacate encontrados en el valle de Tehuacán (cueva de Coxcatlán) en el estado de Puebla, México, tienen una antigüedad de 8,000 años (Smith, 1966) antigüedad cercana a los 10,000 años del hombre de Tepexpan, cuyos restos y los de algunos mamuts fueron encontrados en la zona de Tepexpan, en el valle de México. Las razas de aguacate mexicana y guatemalteca se originaron en México y Guatemala. La raza antillana probablemente se originó en el sur de México (Yucatán) y en Centroamérica (el Salvador, Nicaragua).

La lengua náhuatl fue hablada por multitud de pueblos en el México precolombino, habitando principalmente los valles de México y Toluca, pero en América Central los aztecas que ejercían hegemonía ampliaron su territorio, llegando a una zona propicia para el cultivo del aguacate, donde los árboles eran similares pero la fruta tenía características diferentes. La evidencia más antigua de consumo de aguacate se encontró en una cueva en Coxcatlan en la región de Tehuacán en Puebla, México, que data del 7000 al 8000 A.C. (Smith, 1966).

Las culturas antiguas también tenían un buen conocimiento de los aguacates y sus variedades, como se muestra en el Códice Florentino que enumera tres aguacates como se describe: "aoacatl" posiblemente *Persea americana* var. *Drymifolia* (de origen mexicano), "tlacacolaocatl" a *Persea americana* var. *Americana* (variedad Antiliana) y "quילוacatl" a *Persea americana* var. *guatemalensis* (variedad Guatemala) (Sánchez et al., 2001).

4.2. Clasificación taxonómica

Los aguacates pertenecen a la familia Lauraceae, y actualmente hay alrededor de 85 especies del género *Persea*, la mayoría de las cuales se encuentran en el sur de los Estados Unidos (*Persea borbonia*) después de Chile (*Persea lingue*). La única excepción es *Persea indica*, que se encuentra en las Islas Canarias (España) y se puede considerar como *Persea* en otras partes del sur de Asia. Los aguacates son del género *Persea*, subdivididos en dos subgéneros, respectivamente: *Persea* y *Eriodaphne* (Kopp, 1966), siendo la principal forma distintiva peluda en el lado interior de los sépalos, la superficie interior sin pelo para madurar, a

excepción de *Persea pallida*, *Persea rigens* y *Persea cinerascens*. Los aguacates pertenecen a la especie *Persea americana* Mill. pertenecen al género *Persea* y se denominan aguacates verdaderos, de mayor tamaño que los aguacates del segundo subgénero; Además de los aguacates, este grupo incluye: *Persea nubigena* (aguacate de montaña), *Persea steyermarkii* (aguacate de montaña), *Persea schiedeana* (chinini, chinene, chenene, yas, hib), *Persea floccosa* (aguacate cimarrón). Por lo demás, este género (Williams, 1977) incluye *Persea parvifolia* (aguacatillo de Veracruz, México) y *Persea primatogena* (guaslipe de Nicaragua), la última de las cuales ha sido reclasificada en un género no aguacate llamado *Beischmiedia*. Schieber y Zentmyer (1987) propusieron recientemente incluir los géneros *Persea tolimanensis* (mantequilla de mono) y *Persea zentmyeria* de Guatemala. Por otro lado, se encontró en la región de Motozintla, Chiapas, posiblemente una nueva especie que se cree que está más relacionada con los géneros guatemaltecos *Persea nubigena* y *Persea steyermarkii* (Barrientos et al., 1992), entre otros como porque los de la región de Monte Verde de Costa Rica parece pertenecer al subgénero *Persea*. Todas estas especies se encuentran en América Central, principalmente México y Guatemala (Ben-Ya'acov et al., 1995).

4.3. Descripción morfológica

4.3.1. Hojas.

Son simples, entrelazadas, pequeñas y completas. El pecíolo mide de 1.5 a 3.5 cm de largo. Las hojas tienen diferentes formas, desde ovaladas alargadas hasta ovaladas alargadas. Tienen yemas axilares y venas plumosas. Según la raza, la punta es más o menos puntiaguda. La nervadura principal es de color amarillo pálido, las venas son especialmente evidentes en la parte inferior. Las hojas jóvenes son rojizas (contenido de pigmento en las vacuolas) y la epidermis madura, al madurar las hojas se vuelven lisas, rígidas y de un verde calabrés denso (1992). La parte superior está descubierta, la parte inferior es ligeramente peluda. Tiene muchas glándulas transparentes en su superficie. Las hojas varían mucho en tamaño, de 5 a 20 cm de largo y de 3 a 10 cm de ancho (Rodríguez, 1982).

4.3.2. Árbol.

Se suele cubrir de hojas caídas al final del ciclo siempre que se hayan renovado en la rama. Algunas variedades tienen defoliación a corto plazo antes de la floración, lo que significa que crecen fuera de su hábitat, lo que significa que no son adecuadas para esta área. (Calabrese, 1992).

4.3.3. Ramas.

Los brotes jóvenes son numerosos, generalmente delgados y quebradizos, y por lo tanto se rompen cuando muchos frutos se desgastan y cuando se exponen al viento. Ramas jóvenes peludas, adultas lisas, de color verde claro. Los brotes más fuertes alcanzan los 5-7 cm de diámetro por año. Los aguacates son muy sensibles a las quemaduras solares, las sensibilidades varían según la variedad y las heladas también pueden dañar los tejidos (Calabrese, 1992).

4.3.4. Yemas.

Pueden ser apicales o axilares. Las yemas axilares permanecen en estado latente la mayor parte del tiempo o tienden a desprenderse, de tal manera que el crecimiento del aguacate tiene lugar a través de las yemas apicales principalmente (Rodríguez, 1982).

4.3.5. Raíz.

Como la mayoría de las plantas, el sistema de raíces es corto y débil. De hecho, la mayoría de las raíces se encuentran en los primeros 50 centímetros del suelo, por lo que los aguacates necesitan un suelo profundo. La profundidad alcanzada puede ser de 1 a 1.5 m, siendo aún mayor en suelo suelto (Rodríguez, 1982). Las raíces del aguacate se caracterizan por tener muy pocos pelos radiculares, la absorción de agua y nutrientes se da principalmente en las puntas de las raíces por los tejidos primarios, lo que determina la sensibilidad de la planta al exceso de agua, resultando en daños a la planta, asfixiándola e infectándola con hongos. (Scora et al., 2007).

4.3.6. Fruto.

Es un fruto rugoso de color amarillo verdoso y pulpa central muy grande, que es un fruto rugoso de color verde claro a verde oscuro y morado a negro. Hay alrededor de 400 especies,

por lo que puedes encontrar frutos de diferentes formas y pesos, que pueden llegar a pesar entre 150 y 350 g (Sánchez et al., 2001).

4.3.7. Floración.

Las flores son hermafroditas (hermafroditas), radiantes (simétricas), de color amarillo verdoso, pequeñas, por lo que al abrirlas suelen tener de 1 a 1.5 cm de diámetro, con pedúnculos cortos y peludos. Las inflorescencias (racimos) son panículas (racimos) y pueden ser axilares o terminales. Se estima que cada flor tiene alrededor de 200 flores, aunque puede haber más. La flor consiste en una corona con dos o tres hélices. Los estambres consisten en 12 estambres dispuestos debajo o alrededor del ovario. Solo nueve de estos estambres son funcionales. El pistilo tiene un solo ovario, el ovario tiene una probóscide (encima del tallo), es unisexual y tiene un óvulo. En el ápice de la flor hay un botón vegetativo que luego se convierte en una rama (a veces se usa para injertar). Inflorescencias gruesas, cilíndricas, ligeramente aplanadas, de color amarillo verdoso, pilosas, con muchos nudos, también pilosas. Claramente falta la corona del perianto, pero sus partes están dispuestas en dos series, cada una de las cuales consta de tres elementos. Partes externas más grandes. Puede ser de tres pétalos y tres celdas muy similares. (Scora et al., 2007).

4.4. Métodos de propagación

4.4.1 Sexual.

La reproducción sexual tiene lugar a través de un cierto potencial genético a través de la adaptación a condiciones ambientales específicas, lo que asegura la supervivencia de la especie a través de su variación genética. La progenie de plantas que se reproducen sexualmente, fenotípicamente lo suficientemente similares para la identificación de especies, pero no idénticas, exhibe variación genética en el genotipo típico para este caso (Barbat, 2006).

Dado que las plantaciones establecidas varían mucho en cuanto a vigor, longevidad y resistencia al frío y las enfermedades, en la mayoría de los casos el mensaje lo transmiten precisamente los portainjertos de apoyo y, por lo tanto, no pueden garantizar su aceptación ya que el riesgo para tales plantaciones es sustancial ya que las propiedades genéticas de las plantas en estas semillas no son bien conocidas. Por ello, se ha intentado recurrir la

reproducción asexual, que es el único método que puede proporcionar portainjertos (clones) genéticamente idénticos, asegurando condiciones de cultivo óptimas (Losada, 1973).

4.4.2. Asexual.

Mediante la reproducción asexual, a diferencia de la reproducción sexual, los organismos vegetativos colonizan con éxito nichos a los que se han adaptado sus genotipos. Los fenotipos de estos individuos son prácticamente idénticos, lo que da como resultado una población homogénea. Expandir una especie sin afectar su potencial genético (Barbat, 2006).

4.5. Propagación vegetativa

Como cruzamiento y altamente heterocigoto, la propagación de semillas de aguacate produce una progenie que es biológica y morfológicamente diversa. La propagación por propagación vegetativa asegura que la nueva planta exhiba las características deseadas de la planta madre mediante la selección por nutrientes, resistencia a enfermedades, tamaño pequeño y adaptación a condiciones climáticas específicas del suelo y buena expresión de las características de producción y calidad del fruto. Además de permitir la producción a gran escala de plántulas a través de la selección de material genético específico (Harman, 2012)

la propagación vegetativa fue la primera tecnología desarrollada para propagar portainjertos con excelentes propiedades. Sin embargo, existen algunas limitaciones para la reproducción de plántulas de aguacate debido a la síntesis excesiva de compuestos fenólicos, la rápida oxidación y deshidratación de los tejidos, así como la formación de callos sin liberación de raíces libres (Petry et al. 2012).

Los principales factores que afectan el enraizamiento de los esquejes de aguacate son: las características y edad de la planta madre; los tipos de estacas; la época de recolección de las estacas; el uso de reguladores vegetales; el tipo de sustrato; la intensidad de la luz; el calentamiento del medio de enraizamiento; la no remoción de las hojas de las estacas e el etiolamiento de las estacas (Hartmann et al., 2002).

4.5.1. Portainjertos clonales. Actualmente, el método de propagación comercial más común en los principales países productores de aguacate es el injerto de variedades en portainjertos derivados de semillas o el injerto clonal. Este último se refiere a plantas de aguacate clonados

que sean resistentes a los patógenos del suelo, así como a las condiciones de agua y salinidad. Dichos procedimientos causan grandes diferencias en rendimiento, calidad y vigor entre las plantas del jardín. En otros países productores de aguacate, como Estados Unidos, Australia, Israel y Sudáfrica, la derivación clonal se utiliza para el portainjerto porque el clon es el genotipo seleccionado por su mayor rendimiento y viabilidad, además de una mayor tolerancia a la pudrición sexual. *Phytophthora*, siendo esta última una importante ventaja a la hora de trasplantar, además de asegurar la consistencia genética entre plantas (Castro et al., 2013).

4.5.2. Micropropagación.

La micropropagación es el uso de técnicas de cultivo de tejidos para propagar plantas a gran escala, utilizando pequeñas partes de plantas (explantes) en condiciones estériles, con calidad nutricional, sanitaria y de calidad de las plantas micropropagadas. También conserva el gen de interés, proporciona una mayor estabilidad genética y produce material que es más resistente a las enfermedades de la raíz (como la pudrición de la raíz causada por *P. cinnamomi*) y al estrés ambiental, al tiempo que reduce la vida útil (Nhut et al., 2008).

A pesar de los aspectos positivos señalados, la micropropagación en el cultivo del aguacate puede resultar ineficaz debido a la rápida oxidación y necrosis de los explantes. Sin embargo, esta técnica se ha propuesto como un método alternativo para reducir la variación genética de las plántulas. Las plantas de aguacate se pueden recuperar del cultivo de tejidos y células a través del cultivo de brotes y la embriogénesis somática. La siembra de brotes es útil como método alternativo de reproducción para la obtención de materiales propios, especialmente para la selección de nuevos portainjertos. La embriogénesis somática en sí misma es crítica para la manipulación del genoma usando transgénicos y la inducción de mutaciones *in vitro* (Pliego-Alfaro et al., 2013).

Debido a factores como el tipo y la preparación del explante, la planta madre y las condiciones del medio, varios autores han realizado estudios que involucran la micropropagación del aguacate para identificar estrategias para promover la multiplicación, como *in vitro* esta razón puede afectar directamente el éxito o el fracaso de la tecnología. Por lo tanto, es necesario buscar estrategias que promuevan la micro reproducción, como el uso

de hormonas y otras sustancias que promuevan el crecimiento vegetativo, y determinar la edad de las plantas y los órganos vegetales adecuados para cosechar explantes, como brotes terminales, embriones y cigotos, además de explantes tratados con desinfectantes eficaces (George et al., 2008).

4.6. Propagación *in vitro*

El cultivo de tejidos se define como un crecimiento de células vegetales o un tejido aislado de la planta madre en un medio artificial y estéril (Guerra & Costa, 1988). El cultivo de tejidos es una herramienta importante para el estudio del metabolismo, la genética, la filogenética y la fisiología vegetal, la modificación genética de las plantas, la eliminación de patógenos, la conservación de especies de importancia espacial, la restricción y la proliferación de tejidos vegetales (Boxus, 1988).

Con el desarrollo de la tecnología de micropropagación de plantas, la perspectiva de obtener material en cualquier época de año que sea de mejor calidad agronómica, el tiempo y espacio es menor, y al mismo tiempo maximizar el rendimiento utilizando brotes de plantas expandidas. Hoy en día, las técnicas de cultivo de tejidos permiten obtener grandes cantidades de material clonado en poco tiempo y mejorar el control de la higiene, lo que facilita el transporte de materiales en el país de origen y en el extranjero. Además, es posible criar razas con pocos individuos. Hay varios aspectos fundamentales a tener en cuenta al desarrollar esta técnica, como la fuente de cultivo, la selección y esterilización, la composición de los medios de cultivo (Flores-Mora, et al., 2008).

4.7. Etapas de propagación *in vitro*

4.7.1. Selección y preparación de la planta madre.

Para establecer cultivos en condiciones estériles, es necesario obtener cultivos con los nutrientes y niveles de crecimiento adecuados. Para obtener estos cultivos, se recomienda mantener la planta madre, que es un cogollo, en un invernadero bajo condiciones controladas por un período de varias semanas a varios meses. En este entorno, las plantas se cultivan en

condiciones higiénicas óptimas con un control adecuado de los nutrientes y el riego para garantizar un crecimiento vigoroso y libre de enfermedades (Castillo, 2004).

4.7.2. Desinfección de las yemas de la planta y/o desinfección de semillas. Tras seleccionar la planta madre, se procederá a la extracción de las muestras recogidas. Los explantes pueden ser brotes, hojas, raíces, semillas y similares. Los fragmentos de la planta madre se esterilizarán para eliminar las impurezas extrañas antes de la extracción. Los contaminantes más comunes son hongos y bacterias que viven naturalmente en el medio ambiente. Luego de la esterilización del material vegetal, debe almacenarse en condiciones asépticas. Para lograr condiciones asépticas, se trabajará en una cámara de prensa para extraer los cultivos del material vegetal. Estas muestras se colocarán en tubos de cultivo que contengan el medio primario para el control sanitario y de viabilidad, previa esterilización del material con hipoclorito de sodio puro o diluido (agua clorada comercialmente disponible) durante 5 a 15 minutos, seguido de 3 a 4 enjuagues con agua estéril. (Castillo, 2004)

4.7.3. Introducción del material seleccionado *in vitro*.

Después de la esterilización superficial, las semillas o ápices se colocan en un medio estéril, según el material elegido. En una semana o quince días comienza la germinación o regeneración de nuevo tejido vegetal, iniciándose el ciclo de cultivo *in vitro* (Castillo, 2004).

4.7.4. Multiplicación de brotes.

En esta etapa, se espera que los explantes que sobreviven en la etapa 1 y 2 produzcan brotes (axilares o yemas) con pocas hojas. En la base de cada hoja hay un capullo que se desarrolla cuando se expone al medio. Estos brotes deben inocularse periódicamente en medios nuevos subdividiéndolos y reincubando en tubos de cultivo u otros recipientes adecuados. Estas operaciones se realizan en cámaras de flujo laminar o en lugares aislados que permiten mantener condiciones de esterilidad. De esta forma, el número de plantas aumenta con cada división de la semilla o planta (Castillo, 2004).

El número de plantas obtenidas depende de la especie vegetal y de las condiciones medias. Dado que se han optimizado todos los factores de crecimiento, se puede lograr un aumento exponencial en el número de plantas obtenidas por micropropagación (Castillo, 2004).

4.7.5. Enraizamiento.

Se utilizan principalmente explantes individuales de unos 2 cm de tamaño. Los brotes obtenidos en la etapa reproductiva se transfirieron a medios sin reguladores de crecimiento ni hormonas tipo auxina solas. Algunas plantas no tienen que pasar por esta etapa, sus raíces germinan en el mismo sustrato, por lo que la reproducción y el enraizamiento se dan simultáneamente (Castillo, 2004).

4.7.6. Aclimatación.

Los nuevos cultivos de raíces son muy sensibles a los cambios ambientales, por lo que el éxito o el fracaso de todo el proceso depende de la adaptación. En esta etapa, las plantas experimentarán muchos tipos de cambios que les permitirán adaptarse a la vida en condiciones naturales. Cuando los explantes o esquejes se retiran de la maceta, no son aptos para el cultivo en invernadero porque estos ejemplares han echado raíces y crecen en ambientes con alta humedad relativa y muchas veces con estomas (encargados de controlar la transpiración y la pérdida de agua en las plantas) no completamente tolerantes a la disminución de la humedad relativa y, por lo tanto, el proceso es lento para evitar que los explantes se sequen. Por otro lado, crecer en un ambiente tan húmedo también significa riesgo de pérdida de planta al ya que al carecer de una cutícula cerosa bien desarrollada que actúe como una barrera física contra la pérdida de agua en toda la superficie de la planta (Castillo, 2004).

4.8. Medio Murashige & Skoog (MS).

El medio Murashige & Skoog (MS) o MS0 fue inventado por los científicos Toshio Murashige y Folke K. Skoog en 1962 cuando investigaban nuevos reguladores del crecimiento vegetal y se convirtió en el medio más utilizado para el cultivo de tejidos vegetales *in vitro*. Como estudiante de doctorado en Skoog, Murashige se centró inicialmente, sin éxito, en la búsqueda de la hormona de crecimiento contenida en el jugo de tabaco. En cambio, el análisis del jugo de tabaco reveló altas concentraciones de minerales específicos. Una serie de otros experimentos mostró que variar los niveles de estos nutrientes promovió un crecimiento significativo en comparación con las formulaciones existentes. En

particular, se encontró que el nitrógeno promueve el crecimiento del tejido del tabaco en cultivo. (Cuadro 1) (Murashige et al 1962).

Cuadro 1. Composición del medio de cultivo MS

Macronutrientes	Mg L ⁻¹
NH ₄ NO ₃	100
KNO ₃	100
MgSO ₄ .7H ₂ O	100
CaCl.aq	100
KH ₂ PO ₄	100
Micronutrientes	
KI	10
H ₃ BO ₃	10
MnSO ₄ .4H ₂ O	10
ZnSO ₄ .7H ₂ O	10
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	10
CuSO ₄ .5H ₂ O	10

Fuente: Murashige y Skoog (1962)

4.9. Organogénesis

La regeneración de las plantas a partir de la organogénesis *in vitro* solo es posible debido a la inducción de estímulos para ciertas vías metabólicas que desencadenarán cambios en el patrón de crecimiento y desarrollo celular controlados principalmente por la interacción entre los reguladores del crecimiento de las plantas (p. ej., auxinas y citoquininas) y la nutrición mineral (Arya et al 2009). Sin embargo, la respuesta organogénica también puede variar según el genotipo y las condiciones ambientales asociadas con el crecimiento (George et al., 2008). La información sobre los estímulos bioquímicos asociados con los factores nutricionales es la clave del éxito del cultivo *in vitro*. Este método de cultivo se puede aplicar a la multiplicación de individuos seleccionados y la ingeniería genética de plantas leñosas (Brondani et al. 2012).

4.10. Hormonas

El número de fitohormonas involucradas en todas las respuestas morfológicas durante la formación de la planta es relativamente pequeño. Aunque son pequeños en número (menos de diez), están presentes en todas las plantas terrestres y acuáticas de agua dulce con una amplia variedad de formas, hábitats, ciclos y formas de vida, posiblemente terrestres, arbustos y árboles mesófilos. Todas las especies se distribuyen en las familias de plantas más diversas (Jordan & Casarreto 2006).

4.10.1. Auxinas.

Las auxinas son un grupo de hormonas vegetales naturales que regulan muchos aspectos del crecimiento y desarrollo de las plantas. La forma predominante en las plantas es el ácido indol acético (IAA), que es muy activo en ensayos biológicos y se encuentra comúnmente en concentraciones a nanoescala. Otras formas naturales de auxinas son el ácido 4-cloroindol acético (4-ClIAA), el ácido fenilacético (PAA), el ácido indolbutírico (IBA) y el ácido indolopropiónico (Ludwig-Müller & Cohen 2002).

4.10.2. Giberelinas.

La giberelina (GA) es una hormona de crecimiento de origen diterpenoide tetracíclica que está involucrada en varios procesos de desarrollo de las plantas. Aunque hay más de 100 especies de plantas, solo unas pocas son biológicamente activas. Las giberelinas fueron descubiertas en plantas en la década de 1930, cuando científicos japoneses aislaron de plantas de arroz un estimulante del crecimiento proveniente de un hongo parásito, lo que provocaba que las plantas de arroz explotaran o treparan. El ingrediente activo fue aislado del hongo *Gibberella fujikuroi* por Eiichi Kurosawa en 1926 y lo denominó "giberelina". El efecto del hongo en las plantas infectadas fue un aumento significativo en la altura, a pesar de una reducción significativa en el rendimiento de semillas. El mayor aumento se debió a los altos niveles de este factor de crecimiento producidos por el ataque de hongos (Malonek et al. 2005).

4.10.3. Citocininas.

Son fitohormonas esenciales para el funcionamiento ideal de varios procesos ligados al crecimiento y desarrollo de las especies y relacionados a la acción de varios genes. Son

derivados de adenina base que muestran varias sustituciones en su posición N6, y la adenina en sí misma no tiene actividad hormonal. El reconocimiento de que las citoquininas pueden corresponder a fitohormonas comenzó en la década de 1950 con el descubrimiento de la kinetina, un artefacto de la degradación del ADN en espermátidas de arenque esterilizados en autoclave. Su actividad hormonal se reveló rápidamente al inducir una variedad de morfologías en tabaco y otras especies de tejidos *in vitro* en presencia de auxinas en comparación con altos niveles de citoquininas. La auxina induce la germinación en tejidos de explantes de meristemas, mientras que con bajas concentraciones de auxina y/o en combinación con altas concentraciones de auxina, la formación de grupos de células desorganizadas (tejido cicatricial) y en raíces de mayor gradiente. Auxina (Skoog y Miller 1965). Posteriormente descubrieron citoquininas naturales en varias especies (así como en procariotas), de las cuales la más común y abundante era la zeatina y sus nucleósidos, que se encontraban originalmente en los granos de maíz (*Zea mays*) (Letham, 1973). Además de la zeatina, se han encontrado otros compuestos con efectos similares en el endospermo líquido del coco o "agua de coco". (Caplin & Steward 1948).

V. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Material genético

Se utilizaron portainjertos clonales de aguacate los cuales se describen a continuación:

Duke 7: Derivado del cv Duke, considerado como resistente a tristeza del aguacatero, además de que aumenta la productividad.

Velvick: Reduce la incidencia de antracnosis en postcosecha.

5.2. Localización del experimento

El experimento se llevó a cabo en los laboratorios e invernaderos de la Facultad de Ciencias Agrícolas y Pecuarias, ubicada en Universidad 59, Primera, San Juan Acateno, Pue.

5.3. Materiales y procedimientos generales

5.3.1. Condiciones generales del laboratorio.

Las áreas de trabajo (cámara de incubación, el área de subcultivo y el área de preparación de medios de cultivo) se desinfectaron previamente con una solución de fenol al 2 %. Para las siembras y subcultivos se utilizó una cabina de flujo laminar horizontal. El material de laboratorio como pinzas, bisturís y cajas Petri que fueron utilizadas en la cabina de flujo laminar se esterilizaron mediante inmersión en etanol 70 % y flameo con mechero de alcohol.

5.3.2. Lavado de material de laboratorio.

Todo el material de laboratorio se esterilizó durante 30 minutos a una temperatura de 121 °C en una autoclave.

5.3.3. Cuarto de incubación.

Para la incubación de los explantes y brotes, estos se colocaron bajo un ambiente de 16 horas luz y ocho horas de oscuridad (luz artificial), y una temperatura entre 25 ± 2 °C.

5.4. Establecimiento *in vitro*

5.4.1 Uso de dos agentes desinfectantes para el establecimiento *in vitro*

5.4.1.1 Manejo de planta madre.

Se monitoreo el desarrollo fisiológico de las plantas madre en el invernadero, se dio manejo agronómico correspondiente de fertilización y manejo de plagas y enfermedades.

Se colectaron brotes jóvenes, yemas apicales (figura 1) de 6 cm, los cuales para su traslado se sumergieron en una solución antioxidante de polivinilpolipirrolidona (PVPP) al 5 %.



Figura 1. Colecta de explantes

Estos explantes se lavaron con detergente biodegradable durante 5 minutos (Figura 2) y se enjuagaron con agua corriente, posteriormente se les dio un lavado con alcohol al 70 % durante un minuto de agitación constante.



Figura 2. Lavado de explantes con jabón comercial.

5.4.1.2. **Desinfección de material vegetal.**

Los explantes lavados se llevaron a una desinfección superficial con nanopartículas de plata (NPsAg), el producto que se utilizó fue Silver de la marca Sigma-Aldrich®, que son nanopartículas de plata esféricas de <100 nm. Las concentraciones que se utilizaron para la desinfección fueron 200, 300, 400 y 500 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ durante 10 minutos.

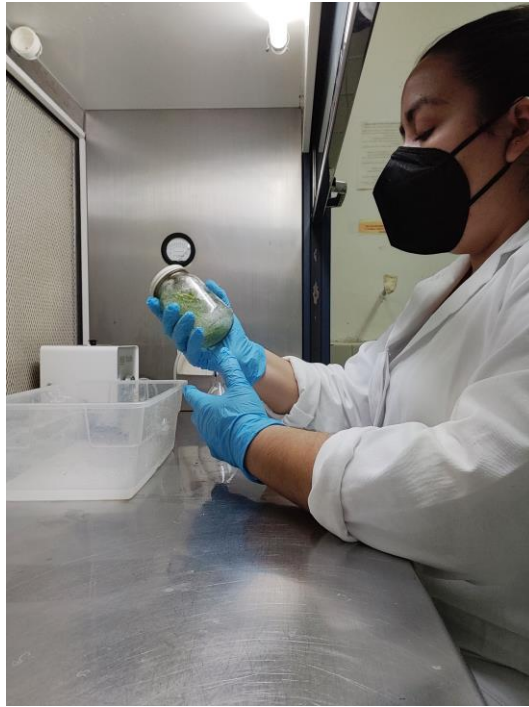


Figura 3. Desinfección de explantes en la cabina de flujo laminar

Para el segundo experimento se utilizó el desinfectante bicloruro de mercurio (HgCl_2) (Figura 4) en concentraciones de 0.25 y 0.5 % durante diez minutos. Posteriormente se enjuagaron con una solución estéril de polivinilpirrolidona (PVPP) al 5 %.

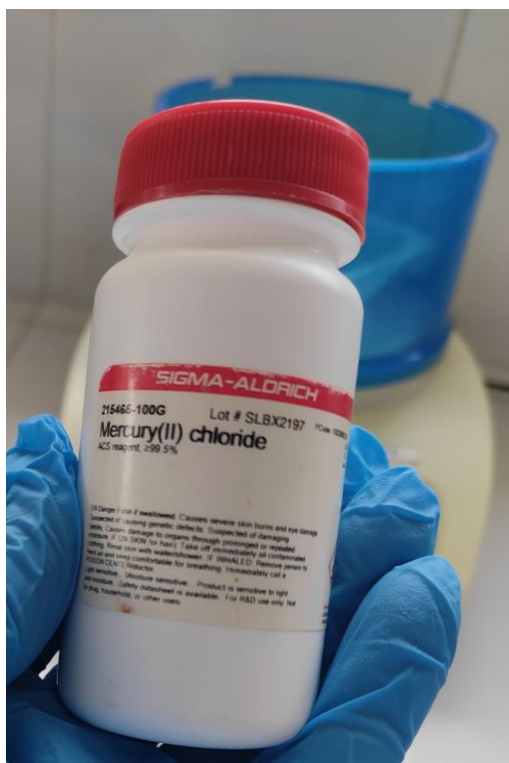


Figura 4. Biclورو de mercurio

5.4.1.3. Siembra de explantes.

Cada explante se manejó de forma individual, seccionando el explante, dejando cada uno de aproximadamente 2 cm (Figura 5).



Figura 5. Explante seccionado

Cada uno se sembró de forma individual en tubos de ensaye con 10 mL de medio semisólido de establecimiento constituido por sales minerales del medio basal MS (Murashigue & Skook) suplementado con sacarosa $30 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, Myo-inositol $10 \text{ mL}\cdot\text{L}^{-1}$, Tiamina $1.0 \text{ mL}\cdot\text{L}^{-1}$, Bencilaminopurina (BAP) $1.0 \text{ mL}\cdot\text{L}^{-1}$, AIB (ácido indolbutírico) $1.5 \text{ mL}\cdot\text{L}^{-1}$ y polivinilpirrolidone (PVPP) $0.5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, carbón activado $0.5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ y como medio gelificante se utilizó agar $3.1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$



Figura 6. Explante sembrado en medio semisólido MS

5.4.5. Descripción de los tratamientos.

Se establecieron dos experimentos el primero con el agente desinfectante NPsAg en concentraciones de 100, 200, 400 y 500 mg·L⁻¹ cada clon (Duke 7 y Velvick) cuatro explantes por tratamiento, dando un total de ocho tratamientos como se muestra en el cuadro 2.

Cuadro 2. Disposición de tratamientos utilizando el desinfectante NPsAg

Tratamientos	Clon	Concentración (ppm)
1	Duke 7	200
2	Duke 7	300
3	Duke 7	400
4	Duke 7	500
5	Zutano	200
6	Zutano	300
7	Zutano	400
8	Zutano	500
9	Velvick	200
10	Velvick	300
11	Velvick	400
12	Velvick	500

Ppm: partes por millón

El segundo experimento con el agente desinfectante HgCl₂ en concentraciones de 0.25 y 0.50 % cada clon (Duke 7, Zutano y Velvick) cuatro explantes por tratamiento, dando un total de seis tratamientos (Cuadro 3).

Cuadro 3. Disposición de tratamientos utilizando el desinfectante HgCl₂.

Tratamiento	Clon	Concentración (%)
1	Duke 7	0.25
2	Duke 7	0.5
3	Zutano	0.25
4	Zutano	0.5
5	Velvick	0.25
6	Velvick	0.5

5.4.1.4. Diseño experimental.

El diseño experimental utilizado fue un completamente al azar con arreglo factorial 3x4 con cuatro repeticiones, la unidad experimental se conformó por cuatro explantes en cada uno de los tratamientos. Los factores a evaluar fueron los tres clones Duke 7, Zutano y Velvick con las cuatro concentraciones (200, 300, 400 y 500 ppm) del desinfectante NPsAg.

Para el segundo experimento de desinfección se utilizó un diseño experimental completamente al azar con arreglo factorial 3x2 con cuatro repeticiones, cada unidad experimental se conformó por cuatro explantes en cada uno de los tratamientos, los factores a evaluar fueron los tres clones Duke 7, Zutano y Velvick y las dos concentraciones del desinfectante (0.25 y 0.50 %) HgCl₂.

$$Y_{ij} = \mu + T_i + E_{ij}$$

$$i = 1, 2, 3, \dots, t$$

$$j = 1, 2, 3, \dots, r$$

Donde:

t= número de tratamientos

r= número de repeticiones

μ = efecto medio general

T_i= efecto atribuido al i-ésimo tratamiento

E_{ij}= término del error aleatorio

5.4.1.5. Variables a evaluar.

Diez días después de realizada la siembra se llevó a cabo la evaluación de manera visual para observar la existencia de contaminación de patógenos tanto para hongos como para bacterias dando un valor de 0 en ausencia y 1 cuando hay presencia de contaminación. La oxidación fenólica se midió mediante un valor cualitativo tomando en cuenta dos aspectos, la oxidación directamente del explante, y segundo, la liberación de fenoles en el medio de cultivo (oscurecimiento del medio de cultivo). Se utilizó una escala de uno a tres siendo el número 1 para baja oxidación, el número 2 cuando el 50 % del explante se encuentra necrosado y 3 cuando el explante se encuentra completamente oxidado.

5.4.1.5. Análisis estadístico

Los datos recabados fueron analizados por medio de una ANOVA y la prueba de comparación de DHS de Tukey, con el paquete estadístico SAS versión 9.0.

5.4.2. Comparación de medios de cultivo en el establecimiento *in vitro*

Para este experimento de comparación de medios de cultivo se utilizó el portainjerto clonal Duke 7, la colecta y lavado fue igual que la del experimento anterior. La desinfección se hizo con bicloruro de mercurio con una concentración de 0.5% por diez minutos de agitación en la cabina de flujo laminar.

5.4.2.1. Siembra de explantes

Una vez realizada la desinfección se procedió a seccionar con un bisturí el material vegetal, retirando hojas grandes y dañadas por la agitación, hasta dejar un cada explante de aproximadamente 3cm, se sembró en tubos de ensaye con 10 mL de medio semisólido según cada tratamiento.

5.4.2.2. Descripción de tratamientos

Como tratamientos se utilizaron tres diferentes medios de cultivo MS (Murashige y Skoog 100 %, MS al 50 % y WPM (Woody Plant Medium) adicionados con sacarosa 30 g·L⁻¹, myo-inositol 10 mL·L⁻¹, Tiamina 1.0 mL·L⁻¹, Bencilaminopurina (BAP) 1.0 mL·L⁻¹, AIB (ácido indolbutílico) 1.5 mL·L⁻¹ y polivinilpirrolidone (PVPP) 0.5g·L⁻¹, Carbon activado 0.5 g·L⁻¹ y como medio gelificante se utilizó agar 3.1 g·L⁻¹. Se sembraron 3 explantes con 4 repeticiones por tratamiento.

5.4.2.3. Variables a evaluar

5.4.2.4. Días a brotación

A partir de la siembra se observaron todos los días cada explante y se registró la fecha en que comenzó a brotar la primera hoja, así se calcularon los días a brotación de los explantes.

5.4.2.5 Porcentaje de brotación

El porcentaje de brotación se calculó con los datos obtenidos 30 días después de la siembra, tomando como 100% el total de explantes sembrados de tratamiento y así contabilizando el total de explantes con brote.

5.4.2.6. Longitud del brote

Posterior a 30 días de la brotación se midió la longitud del brote colocando una escala en centímetros en el tubo de ensayo.

5.4.2.7. Hongos y bacterias

A los 10 días de realizado el establecimiento *in vitro* se realizó la evaluación de manera visual para observar la existencia de contaminación de patógenos ya sean hongos o bacterias dando un valor de 0 sin presencia de contaminación y 1 cuando hay presencia de contaminación por algún agente patógeno

5.4.2.8. Oxidación del explante

Para la evaluación de la oxidación fenólica se utilizó un valor cualitativo tomando en cuenta dos aspectos, primero la oxidación o necrosamiento en el explante, y segundo, la presencia de fenoles en el medio (oscurecimiento del medio de cultivo). Se utilizó una escala de uno a tres (1= baja, 2= media 50 % del explante necrosado y 3= alta).

5.4.2.9. Supervivencia

De acuerdo con la presencia o ausencia de patógenos u oxidación alta que limiten la supervivencia del explante es como se evaluó la supervivencia o pérdida del explante *in vitro*.

5.4.2.10. Diseño experimental

Se utilizó un diseño completamente al azar con cuatro repeticiones por tratamiento, cada unidad experimental se conformó por cuatro tubos con un explante cada uno.

5.4.2.11. Análisis estadístico

Los resultados obtenidos se analizaron por medio de una ANOVA y la prueba de comparación de DHS de Tukey, con el paquete estadístico SAS versión 9.0.

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Etapa de establecimiento *in vitro* desinfección con nanopartículas de plata

(AgNPs)

De acuerdo con los resultados del análisis de varianza (Cuadro 4) del efecto de cuatro concentraciones de AgNPs y de tres tipos de portainjertos clonales de aguacate Duke 7, Zutano y Velvick, el cuadro muestra diferencias altamente significativas para la variable supervivencia en el factor clon y concentración, respecto a la interacción clon*concentración se encontraron diferencias significativas, para la misma variable. Para la variable contaminación por hongo en el factor clon y en la interacción clon*concentración se observan diferencias altamente significativas, mientras que en el factor concentración se encontraron diferencias significativas. En la variable contaminación por bacteria, no hubo diferencias significativas en el factor de variación clon, sin embargo, tanto en el factor de concentración y la interacción clon*concentración se encontraron diferencias altamente significativas.

Cuadro 4. Cuadrados medios y niveles de significancia para las variables de respuesta a los diferentes factores de variación en la etapa de establecimiento. Diez días después de la siembra

F.V.	G.L.	Supervivencia	C. Hongo	C. Bacteria
Clon	2	0.089 **	0.107 **	0.016 ns
concentración	3	0.064 **	0.024*	0.128 **
Clon * Concentración	6	0.026*	0.448 **	0.0745 **
Error	36	0.0092	0.2426	0.2957
Total	47			
C.V.				
Media				

F.V.: Fuentes de Variación; G.L.: Grados de libertad. C.V.: coeficiente de variación; Variables: C. hongo: contaminación por hongo, C. Bacteria: Contaminación por bacteria. ** altamente significativo, * significativo y ns: no significativo.

La figura 7 muestra la comparación de medias de la variable supervivencia y pérdida de explantes desinfectados con AgNPs, en tres portainjertos clonales de aguacate: Duke 7, Zutano y Velvick con cuatro diferentes concentraciones de nanopartículas de plata: 200, 300, 400 y 500 ppm.

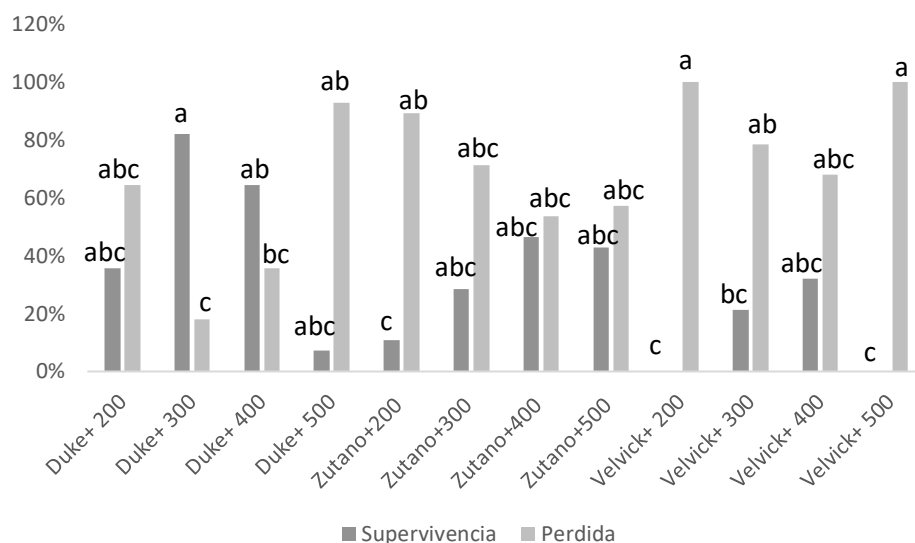


Figura 7. Porcentaje de supervivencia y perdida de explantes durante el establecimiento *in vitro* con tres tipos de portainjertos clonales de aguacate y cuatro concentraciones de NP_sAg. Medias con la misma letra son estadísticamente iguales (Tukey $\alpha \leq 0.05$).

El tratamiento con el portainjerto Duke 7+ 300 ppm de AgNPs obtuvo mayor porcentaje de supervivencia con el 83% contrario al tratamiento con el portainjerto Velvick con las concentraciones de 200 y 500 ppm mostraron el 100% de perdida, Bello-Bello et al., (2023) afirma que una alternativa para eliminar los contaminantes es el uso adecuado de concentraciones de NP_sAg, ya que tienen la capacidad de eliminar hongos, bacterias y virus, sin ocasionar efectos que limiten el desarrollo de los explantes. Actualmente en la biotecnología el uso de los nanomateriales ha incrementado debido al prometedor efecto antimicrobiano altamente eficiente, entre los materiales más estudiados se encuentran las nanopartículas de plata (Villarreal-Gómez, 2021).

La figura 8 muestra la incidencia de hongos, resultado del establecimiento de explantes de tres portainjertos clonales Duke 7, Zutano y Velvick desinfectados con cuatro concentraciones de NP_sAg 200, 300, 400 y 500 ppm, se observa que el tratamiento que mostro mayor contaminación por hongos fue del 96% para portainjerto Velvick con 500 ppm de NP_sAg por el contrario los tratamientos con el portainjerto Duke con las

concentraciones 300 y 500 ppm mostraron menor incidencia de hongos 4% siendo diferentes significativamente al tratamiento con el porcentaje de incidencia más alto.

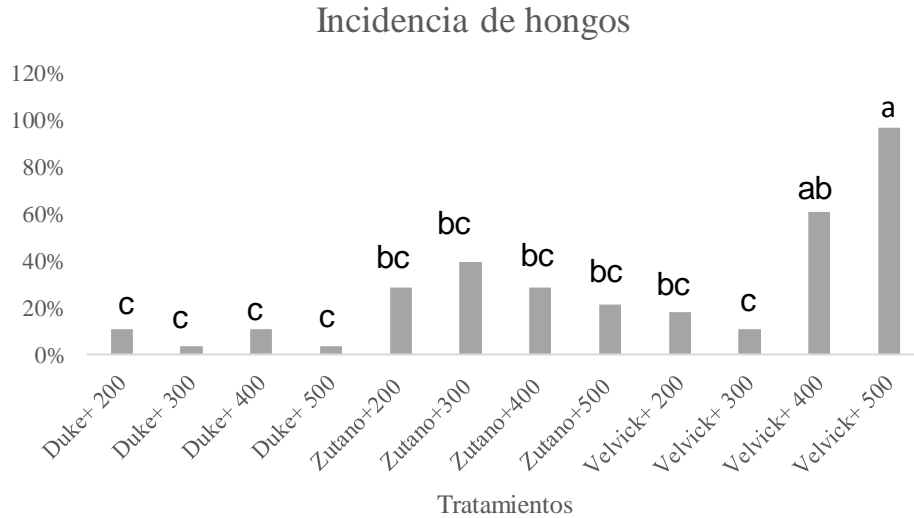


Figura 8. Porcentaje de incidencia de contaminación por hongos durante el establecimiento *in vitro*, con tres portainjertos clonales de aguacate y cuatro concentraciones de NPsAg. Medias con la misma letra son estadísticamente iguales (Tukey $\alpha \leq 0.05$).

Los resultados obtenidos por Cooper (1987), con el portainjerto Duke 7 con 70% de contaminación, redujo el efecto de contaminación a 16% con el uso de etanol 100% y una solución de hipoclorito de sodio (NaClO) 0.5% durante 30 min.

En la figura 9 se muestra la contaminación por bacterias en los tres portainjertos Duke 7, Zutano y Velvick donde se evaluaron cuatro concentraciones de NPsAg 200, 300, 400 y 500, dando un total de doce tratamientos. El tratamiento que mostró mayor incidencia o contaminación por bacterias fue el tratamiento con el portainjerto Velvick+ 200 ppm (100%), contrario al tratamiento Velvick+400 ppm donde se obtuvo 0% de contaminación por bacterias, igualmente el tratamiento Duke 7 +300 ppm mostró un porcentaje bajo de contaminación por bacteria.

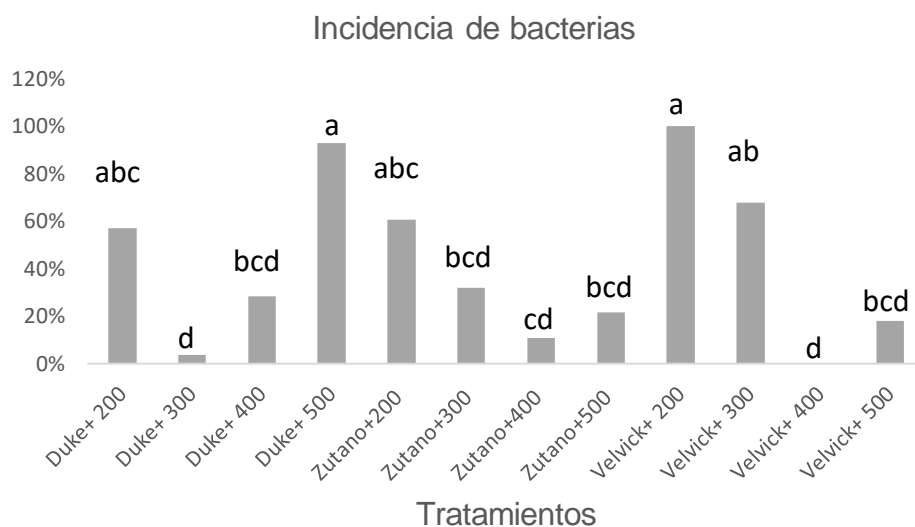


Figura 9. Porcentaje de incidencia de contaminación por hongos durante el establecimiento *in vitro*, con tres portainjertos clonales de aguacate y cuatro concentraciones de NPsAg. Medias con la misma letra son estadísticamente iguales (Tukey $\alpha \leq 0.05$).

Bello-Bello et al., (2023) asegura que, las NPsAg se han utilizado para disminuir la contaminación por diferentes agentes que compiten por luz, nutrientes y espacio en el cultivo *in vitro* y las especies en donde se han encontrado resultados favorables son: pino (*Araucaria excelsa* R. Br.) var. Glauca, vainilla (*Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews), almendro x melocotonero (*Prunus amygdalus* L. x *Prunus pérsica* L.) y clavel (*Dianthus caryophyllus* L.).

En el cuadro 5 se observan los resultados del análisis de varianza del efecto de cuatro concentraciones de AgNPs y de tres tipos de portainjertos clonales de aguacate Duke 7, Zutano y Velvick, donde se muestran diferencias altamente significativas para la variable oxidación alta (OA) en interacción con el factor de variación clon, en la interacción clon*concentración se observó diferencias significativas para la misma variable. Para la variable oxidación media (OM), no se encontraron diferencias significativas para el factor de variación clon y concentración, sin embargo en su interacción clon*concentración se

observaron diferencias significativas. Respecto a la variable oxidación baja (OB) solo muestra diferencias significativas el factor clon y concentración.

Cuadro 5. Cuadrados medios y niveles de significancia para las variables de respuesta a los diferentes factores de variación en la etapa de establecimiento. Diez días después de la siembra

F.V.	G.L.	OA	OM	OB
Clon	2	0.463 **	0.002 ns	0.053 *
Concentración	3	0.1489 ns	0.016 ns	0.042 *
Clon * Concentración	6	0.3828*	0.017 *	0.022 ns
Error	36	0.007	0.006	0.011
Total	47			
C.V.		7.7	7.4	8.32
Media		1.08	1.09	1.26

F.V.: Fuentes de Variación; G.L.: Grados de libertad. C.V.: coeficiente de variación; Variables: OA: oxidación alta, OM: oxidación media, OB: oxidación baja. ** altamente significativo, * significativo y ns: no significativo.

En la figura 10 se muestran las comparaciones de medias de los resultados para las variables oxidación alta media y baja s donde se evaluaron tres diferentes portainjertos Duke 7, Zutano y Velvick, con cuatro concentraciones de NPsAg 200, 300, 400 y 500 ppm, dando un total de 12 tratamientos el tratamiento que mostro mayor porcentaje de oxidación alta fue el tratamiento con el clon Duke 7 + 500 ppm, el tratamiento que mostro menor porcentaje de oxidación alta fue el tratamiento Zutano+300ppm, el tratamiento que mostro mayor porcentaje de oxidación baja fue el tratamiento Duke 7 + 300 ppm. Las nanopartículas de plata debido a su efecto abrasivo, cuando la concentración no es la óptima para la especie puede tener efectos adversos en la propagación *in vitro* ya que la liberación de iones Ag+ genera estrés oxidativo y más adelante apoptosis o muerte celular (Bello-Bello et al., 2023) y por consecuencia la muerte del explante.

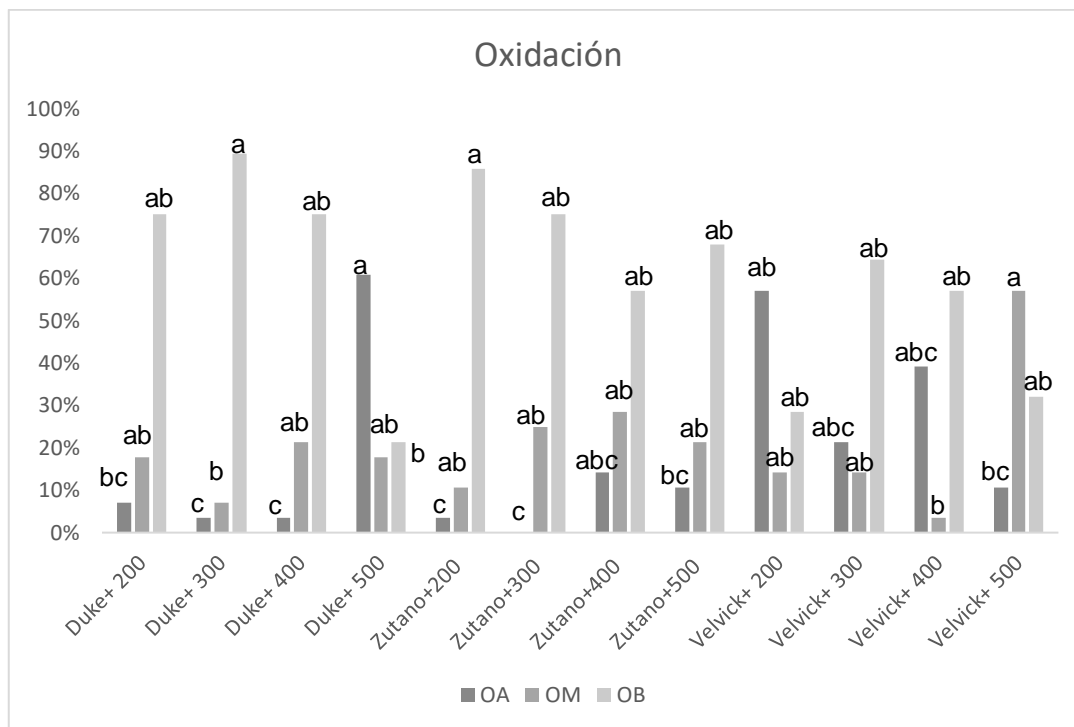


Figura 10. Niveles de oxidación en el establecimiento *in vitro* de tres portainjertos clonales de aguacate con cuatro concentraciones de NPgAg. Medias con la misma letra son estadísticamente iguales (Tukey $\alpha \leq 0.05$).

Thao et al. (2015) mencionan que las NPgAg son una alternativa que puede inhibir la percepción de etileno durante el cultivo de tejidos vegetales en algunas especies. Las NPgAg tienen un modo de acción que reduce los efectos del etileno en los cultivos *in vitro*, que es debido a la liberación de iones de plata que compiten con los iones Cu^+ y que se unen a los receptores a etileno, el cual es un cofactor y que interactúa con el etileno en el citosol alrededor de las membranas externas del retículo endoplásmico formando un complejo de etileno-cofactor (Manh-Cuong et al., 2021).

6.2 Etapa de establecimiento *in vitro* desinfección con bicloruro de mercurio (HgCl_2)

En el cuadro 6 se observan los resultados del análisis de varianza del efecto de dos concentraciones de HgCl_2 y de tres tipos de portainjertos clonales de aguacate Duke 7, Zutano y Velvick, donde se observan diferencias significativas para la variable supervivencia en el

factor de variación clon*concentración. La variable contaminación por hongo no mostro diferencias con ningún factor de variación, contrario a las variables contaminación por bacteria donde se observó diferencias altamente significativas para los tres factores de variación clon, concentración y clon*concentración.

Cuadro 6. Análisis de varianz y niveles de significancia para las variables evaluadas a los diferentes factores de variación en la etapa de establecimiento. Diez días después de la siembra.

F.V.	G.L.	Supervivencia	C.Hongo	C.Bacteria
Clon	2	0.011 ns	0.001 ns	0.104 **
Concentración	1	0.011 ns	0.00003 ns	0.065 **
Clon * Concentración	2	0.99**	0.006 ns	0.139 **
Error	18	0.015	0.002	0.2957
Total	23			
C.V.		10.62	5.31	5.72
Media		1.16	1.02	1.08

F.V.: Fuentes de Variación; G.L.: Grados de libertad, C.V.: Coeficiente de Variación. Variables: C. hongo: contaminación por hongo, C. Bacteria: Contaminación por bacteria. ** altamente significativo, * significativo y ns: no significativo.

La supervivencia de los explantes en la propagación *in vitro* dependen de factores como lo son la contaminación por hongos y bacterias, la alta concentración de fenoles en estos provocando el retraso o la muerte de estos. En la figura 11 se muestra la comparación de medias en tres portainjertos Duke 7, Zutano y Velvick, con los cuales se desinfectaron con tres concentraciones diferentes de HgCl₂ 0.25% y 0.5%, la combinación de estos dio como resultado 6 tratamientos, donde se observa que no existe diferencia entre tratamientos, sin embargo el tratamiento Velvick+ 0.25% de HgCl₂ obtuvo el 65% de supervivencia y 35% de perdida de explantes, y el tratamiento Zutano+ 0.25% solo tuvo el 4% de supervivencia y el 96% de perdida.

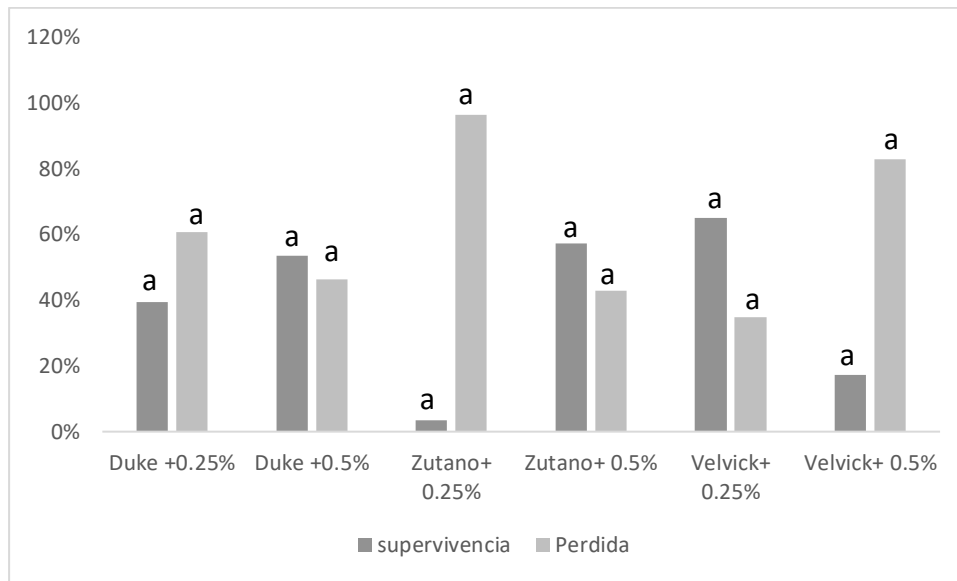


Figura 11. Porcentaje de supervivencia y pérdida de explantes durante el establecimiento *in vitro* con tres tipos de portainjertos clonales de aguacate y dos concentraciones de HgCl₂. Medias con la misma letra son estadísticamente iguales (Tukey $\alpha \leq 0.05$).

Olivera-Gonzales (2017) asegura que en de *Perezia pinnatifida* propagada *in vitro* desinfectada con bicloruro de mercurio al 0.1%, obtuvo el 100% de desinfección a 5 y 10 min. de exposición con porcentajes de supervivencia de 100 y 90% respectivamente.

La incidencia de hongos se debe principalmente a patógenos endófitos es decir huéspedes que se encuentran en la planta y no logra erradicarlos completamente el desinfectante usado, en la figura 12 se observa la comparación de medias de los tratamientos ya descritos anteriormente, muestran que no hay diferencia entre tratamientos pues obtuvieron menos del 14% de incidencia de hongos el tratamiento Velvick +0.5% difiriendo de los tratamientos Duke+ 0.5%, Zutano+0.5% y Velvick +0.2% no hubo contaminación por hongos.

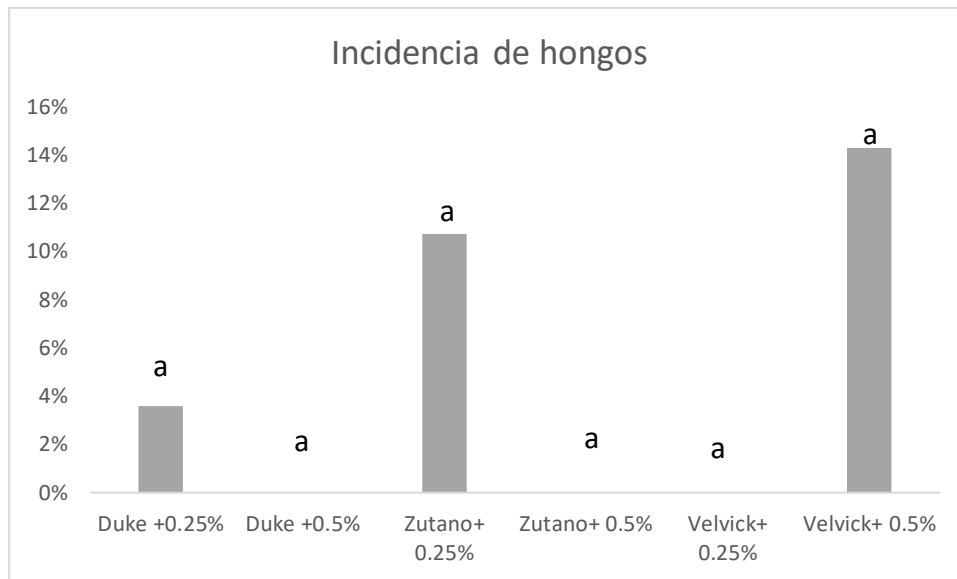


Figura 12. Porcentaje de incidencia de contaminación por hongos durante el establecimiento *in vitro*, con tres portainjertos clonales de aguacate y dos concentraciones de HgCl_2 . Medias con la misma letra son estadísticamente iguales (Tukey $\alpha \leq 0.05$).

Jimenez-Bonilla (2018) asegura que para el establecimiento *in vitro* de arándano nativos, se recomendó la desinfección con una solución de bicloruro de mercurio (HgCl_2) al 0.175% durante 6 minutos.

Al analizar los seis tratamientos para la variable incidencia por bacterias se observa diferencia significativa entre el tratamiento Zutano + 0.25% de HgCl_2 y los tratamientos restantes ya que los demás se observó menos de 13% de contaminación por bacteria incluso en algunos tratamientos como Duke 7 +0.25%, Velvick 0.25% mostraron 0% de incidencia por bacterias (Figura 13).

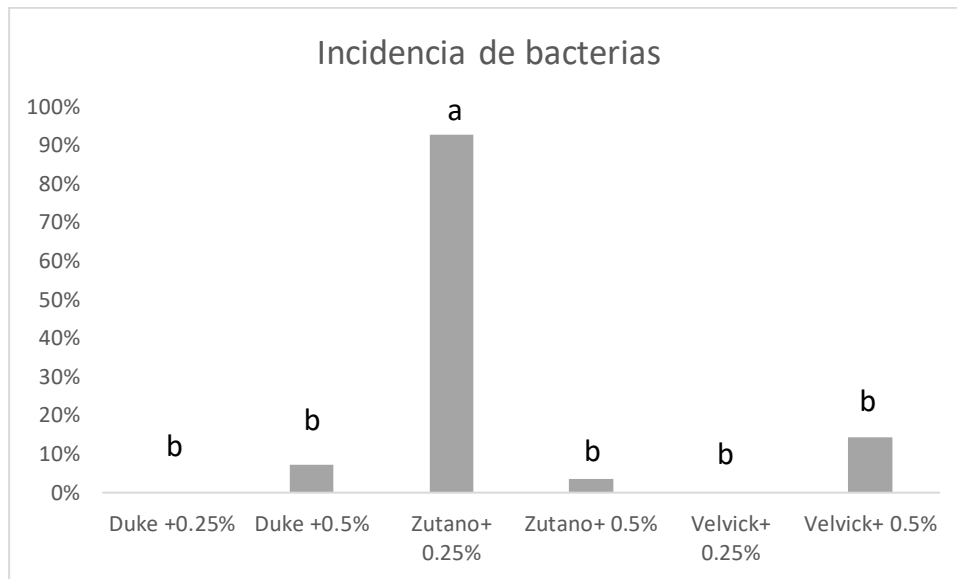


Figura 13. Porcentaje de incidencia de contaminación por bacterias durante el establecimiento *in vitro*, con tres portainjertos clonales de aguacate y dos concentraciones de $HgCl_2$. Medias con la misma letra son estadísticamente iguales (Tukey $\alpha \leq 0.05$).

Estos resultados coinciden con los publicados por Beltran et al. (2014) donde mencionan que el mercurio a una concentración de 0.2% por 20 minutos de inmersión obtuvo una mayor efectividad en el control de la contaminación de bacterias endógenas y en la reducción de los efectos colaterales sobre los explantes de yemas de *A. perutilis* Hemsley.

El estado fisiológico de los explantes está relacionado con la oxidación durante el establecimiento de la propagación *in vitro*, es decir, que la edad ontogenética está relacionada a la acumulación y presencia de compuestos fenólicos en el vegetal (Concepción et al. 2005), en el cuadro 7 se muestran el análisis de varianza del efecto de dos concentraciones de $HgCl_2$ y de tres tipos de portainjertos clonales de aguacate Duke 7, Zutano y Velvick, se observa diferencia altamente significativa en la variable oxidación alta (OA) en el factor de variación concentración, y sin diferencias significativas tanto en el factor de variación clon y clon*concentración. En lo que respecta a oxidación media (OM) no muestra diferencias significativas en ninguno de los factores de variación, en la variable oxidación baja

(OB)muestra diferencias significativas en interacción con el factor de variación clon*concentración y sin diferencias en interacción con los factores clon y concentración.

Cuadro 7. Cuadrados medios y niveles de significancia para las variables de respuesta a los diferentes factores de variación en la etapa de establecimiento. Diez días después de la siembra

F.V.	G.L.	OA	OM	OB
Clon	2	0.235 ns	0.008 ns	0.003 ns
Concentración	1	0.001 **	0.002 ns	0.001 ns
Clon * Concentración	2	0.146 ns	0.215 ns	0.066 *
Error	18	0.16	0.019	0.017
Total	23			
C.V.		11.3	12.33	11.03
Media		1.13	1.11	1.18

F.V.: Fuentes de Variación; G.L.: Grados de libertad. C.V.: coeficiente de variación, Variables: OA: oxidación alta, OM: oxidación media, OB: oxidación baja. ** altamente significativo, * significativo y ns: no significativo.

En la figura 14 se presentan los resultados de las comparaciones de medias donde se encontraron diferencias significativas para la variable oxidación alta (OA) en el tratamiento Zutano+ 0.25 % de HgCl₂ con el 75 % de explantes totalmente necrosados por la oxidación, sin embargo, en la variable oxidación baja (OB) no mostro diferencias significativas entre los tratamientos. Concepción et al. (2005) afirmaron que el PVPP 0.5 % es el antioxidante adecuado para emplear en el cultivo de tejidos *in vitro* de yemas de guayaba, pues permitió que un 24.4 % de los explantes estuvieran poco fenolizados y que el 68.9 % estuviera medianamente oxidados.

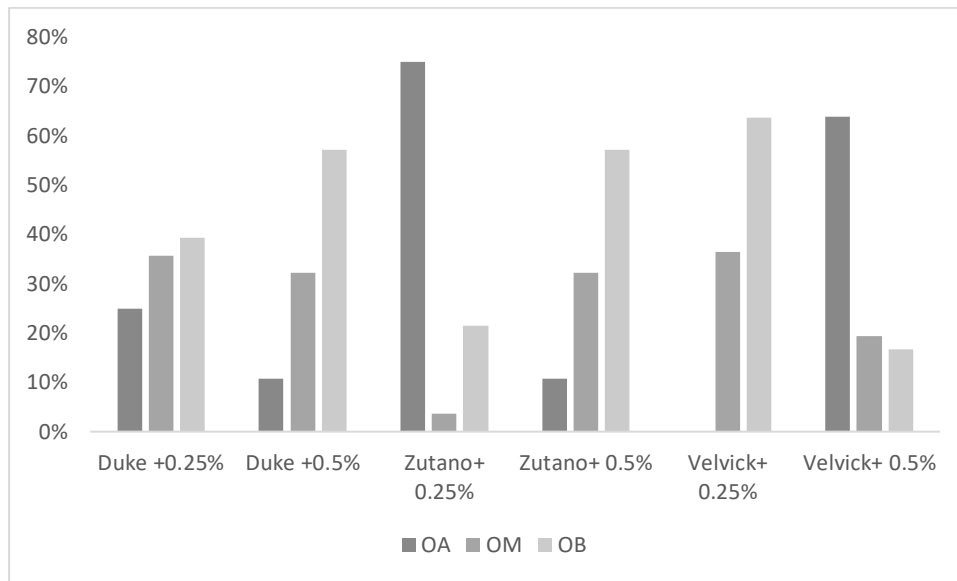


Figura 14. Niveles de oxidación en el establecimiento *in vitro* de tres portainjertos clonales de aguacate desinfectados con cuatro concentraciones de NPsAg.

6.3 Comparación de medios de cultivo en el establecimiento *in vitro* del portainjerto clonal Duke 7

De acuerdo con el análisis de varianza (Cuadro 8), no se encontraron diferencias para las variables días a brotación, % de brotación, longitud de brote y supervivencia del explante, en las distintas variantes del medio de cultivo.

Cuadro 8. Cuadrados medios y niveles de significancia para las diferentes variables utilizando variantes en el medio de cultivo para el establecimiento *in vitro* de Duke7.

F.V.	G.L.	Días a Brotación	% Brotación	Long Brote (cm)	Supervivencia
Medio de cultivo	2	9.42 ns	0.22 ns	7.07 ns	0.83 ns
Error	9	19.82	0.16	0.98	0.05
Total	11				
C.V.		16.48	41.93	8.4	18.24

F.V.: Fuentes de Variación; G.L.: Grados de libertad. C.V.: coeficiente de variación. ** altamente significativo, * significativo y ns: no significativo.

En el cuadro 9 se muestra el resultado el análisis de varianza para las variables contaminación (hongo y bacteria) donde se observó la presencia o ausencia, y oxidación del explante (alta, media y baja) de acuerdo con el análisis visual realizado. No se encontraron diferencias significativas en las distintas variantes del medio de cultivo.

Cuadro 9. Cuadrados medios y niveles de significancia para las diferentes variables utilizando variantes en el medio de cultivo para el establecimiento *in vitro* de Duke7.

F.V.	G.L.	Oxidación				
		Hongo	Bacteria	Alta	Media	Baja
Medio de cultivo	2	0.01 _{ns}	-	0.61 _{ns}	0.01 _{ns}	0.71 _{ns}
Error	9	0.004	-	0.009	0.008	0.4
Total	11					
C.V.		6.75	-	43.96	8.7	16.35

F.V.: Fuentes de Variación; G.L.: Grados de libertad. C.V.: coeficiente de variación. ** altamente significativo, * significativo y ns: no significativo.

En el cuadro 10, sobre comparación de medias, no se encontraron diferencias significativas para la variable días a brotación. Para la variable porcentaje brotación estadísticamente no hubo diferencias, sin embargo, el mayor porcentaje se observó en el medio de cultivo MS 100. En la variable longitud de brote hubo diferencias significativas, donde la mayor longitud se observó en los medios MS 100 y WPM. Respecto a la supervivencia del explante, se encontraron diferencias significativas, siendo los medios MS 50 y MS 100 con los mayores porcentajes. En aguacate se había demostrado que la reducción de los macronutrientes en medio MS al 50% de su concentración era benéfica (Barcelo-Muñoz et al. 1999), contrario con los resultados que obtuvimos, donde la mejor supervivencia y brotación se obtuvo en medio MS al 100%. Ibarra-Lopez et al., (2016) mencionan que en cultivares de aguacate de la raza mexicana *Persea americana* var. *drymifolia* Schltdl. & Cham, obtuvieron una supervivencia del 22 al 37% utilizando los medios de cultivo MS y DCR. Otros autores como Barrientos-Priego et al., 2020, atribuye que el efecto del Triacantanol con la concentración de $10\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ en un medio de cultivo descrito por Yasuda et al, (1985) favorece en crecimiento y desarrollo de brotes de aguacate con los portainjertos Duke 7 y Velvick.

Cuadro 10. Comparación de medias para las variables Días a brotación, % de Brotación, Long de Brote y supervivencia utilizando variantes en el medio de cultivo para el establecimiento *in vitro* de Duke7.

Medio	Días a Brotación	% Brotación	Long Brote (cm)	Supervivencia
MS 50	25.83 a	50 a	10.34 b	95 % a
MS 100	26.47 a	80 a	12.16 a	100% a
WPM	28.75 a	50 a	12.94 a	45% b
Media	27	41.93	8.4	18
DMSH	8.7	0.79	1.96	0.45
CV	16.4	0.95	11.81	1.25

MS 50= medio basal Murashige y Skoog al 50%, MS 100= medio basal Murashige y Skoog al 100%, WPM= Woody Plant Medium. Valores con la misma letra dentro de la misma columna no presentan diferencias significativas (Tukey $\alpha=0.05$) DMSH= Diferencia mínima significativa honesta. C.V.= Coeficiente de variación.

En la comparación de medias para la variable oxidación de explante (Cuadro 11), se dividió en alta, media y baja. En la oxidación alta se observaron diferencias, en donde el medio de cultivo WPM presentó la oxidación más alta. En la oxidación media no hubo diferencias significativas, mientras que para la oxidación baja se observaron diferencias en los medios de cultivo MS 50 y MS 100, siendo los que menos oxidación presentaron en los tejidos. Barrientos-Priego (2020) señala que al utilizar el medio de cultivo descrito por Yasuda et al, (1985) suplementado con Bencidaednina y ácido Naftalenacetico con diferentes concentraciones de TDZ observaron que no hubo crecimiento de brotes de aguacate, al cabo de una semana, sin embargo, los explantes se tornaron color café oscuro, característico de un explante altamente oxidado, aun cuando se realizó un subcultivo afectando la supervivencia de los explantes.

Cuadro 11. Comparación de medias para la variable oxidación del explante (Alta, Media, y Baja) utilizando variantes en el medio de cultivo para el establecimiento *in vitro* de Duke7.

Medio de cultivo	Alta	Media	Baja
MS 50	0 b	0.05 a	0.95 a
MS 100	0 a	0 a	0.04 a
WPM	0.4 a	0.1 a	0.5 b
Media	0.22	1.05	1.27
DMSH	0.19	0.18	0.41
CV	43.96	8.79	16.35

MS 50= medio basal Murashige y Skoog al 50%, MS 100= medio basal Murashige y Skoog al 100%, WPM= Woody Plant Medium. Valores con la misma letra dentro de la misma columna no presentan diferencias significativas (Tukey $\alpha=0.05$) DMSH= Diferencia mínima significativa honesta. C.V.= Coeficiente de variación.

En el cuadro 12, se observa la comparación de medias para la variable contaminación, donde hubo diferencias para la presencia de hongos el medio de cultivo WPM y para bacterias no hubo diferencias significativas, es decir, no hubo presencia de este agente contaminante. Por su parte, Ibarra-López et al., (2016) utilizó los medios de cultivo MS y DCR obtuvo más del 50 % de explantes contaminados por hongos y bacterias en explantes de aguacate por lo cual estas variables resultaron afectadas debido a la contaminación y oxidación de los explantes. En el trabajo de Ancasi-Espejo (2016), en el establecimiento *in vitro* de plátano (*Musa paradisiaca* L) concluye que al adicionar ácido ascórbico y ácido cítrico en el medio MS se obtiene un menor grado de oxidación (26 %) al ser comparado con el tratamiento donde se utiliza carbón activado y medio MS, donde obtuvo un 60 % de oxidación. Gutiérrez et al., (2019) proponen modificaciones al protocolo de establecimiento de yemas axilares de *Colocasia esculenta* y asegura que la reducción del tamaño del explante inicial contribuyó a la disminución de las pérdidas en más de un 20% por contaminación de hongos y bacterias, sin embargo, en este trabajo el tamaño del explante no representó problema en contaminación y oxidación de los mismos.

La presencia de agentes contaminantes como bacterias y hongos en el cultivo *in vitro*, puede deberse a varios factores, entre los cuales destacan la asociación del explante a su medio, así

como las condiciones de la siembra y el origen del material vegetal; de ahí la importancia de establecer el material vegetal adecuado para usarlo como explante (Ancasi-Espejo et al., 2016).

Cuadro 12. Comparación de medias para la variable contaminación por hongos y bacterias utilizando variantes en el medio de cultivo para el establecimiento in vitro de Duke7.

Medio de cultivo	Hongo	Bacteria
MS 50	0 a	0 a
MS 100	0 a	0 a
WPM	0.1 a	0 a
Media	1.03	1
DMSH	0.13	0
CV	6.7	0

MS 50= medio basal Murashige y Skoog al 50%, MS 100=medio basal Murashige y Skoog al 100%, WPM= Woody Plant Medium. Valores con la misma letra dentro de la misma columna no presentan diferencias significativas (Tukey $\alpha=0.05$) DMSH= Diferencia mínima significativa honesta. C.V.= Coeficiente de variación.

VII. CONCLUSIONES

El tratamiento que mejor respondió para el establecimiento *in vitro* de portainjertos clonales de aguacate, el utilizando el clon Duke 7 desinfectado con NPsAg a 300 ppm pues se obtuvo un 82% de supervivencia.

El tratamiento más favorable para utilizar en la propagación *in vitro* con el desinfectante bicloruro de mercurio fue en el que se utilizaron explantes del portainjerto Velvick con la concentración del 0.25% ya que se obtuvo un mayor porcentaje de supervivencia de lo concentración el mayor porcentaje de perdida fue con el clon zutano y la concentración al 0.25%.

No siempre las concentraciones altas de desinfectante favorecen la supervivencia de explantes *in vitro* pues algunos desinfectantes con efecto abrasivo aumentando la producción de fenoles en los explantes, dando paso a la oxidación, necrosamiento y por consiguiente la pérdida del material vegetal.

Es importante evaluar el comportamiento de los diferentes portainjertos clonales de aguacate, con otros medios de cultivo para utilizar el adecuado y así propagar de manera efectiva la especie deseada.

VIII. LITERATURA CITADA

- Arya, I. D., Sharma, S., Chauhan, S., Arya, S. (2009). Micropropagation of superior Eucalyptus hybrids FRI-5 (*Eucalyptus camaldulensis* Dehn x *E. tereticornis* Sm) and FRI14 (*Eucalyptus torelliana* F.V. Muell x *E. citriodora* Hook): a commercial multiplication and field evaluation. *African Journal of Biotechnology*, 8(21), p. 5718-5726 <https://doi.org/10.5897/AJB09.822>
- Barbat, T. (2006). La multiplicación de las plantas. *Horticultura Internacional*, 1, 32-43. ISSN 1134-4881
- Barceló-Muñoz, A., Encina, C.L., Simón-Pérez, E. et al. Micropropagation of adult avocado. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 58, 11–17 (1999). <https://doi.org/10.1023/A:1006305716426>
- Barrientos-Priego, Alejandro & Arellano, Greg & García-Villanueva, Eduardo & Remigio, Carlos & Cerón-Mendoza, José & Sierra-Zurita, D.. (2020). Uso de triacantanol y thidiazuron en el crecimiento de brotes de aguacate (*Persea americana* Mill.) ‘Velvick’ Y ‘Duke 7’..
- Bello-Bello, Jericó Jabín, & Spinoso-Castillo, José Luis. (2023). Utilización de nanopartículas de plata en la micropropagación de plantas. *Mundo nano. Revista interdisciplinaria en nanociencias y nanotecnología*, 16(30). <https://doi.org/10.22201/ceiich.24485691e.2023.30.69692>
- Beltrán Pedroza, D. M., & Mesa López, N. (2014). El dicloruro de mercurio como desinfectante en la micropropagación del comino (*Aniba perutilis* Hemsley). *Revista Colombiana de Biotecnología*, 16(1), 203-209. <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v16n1.44302>.
- Ben-Ya’acov, A., & Barrientos, P. (2003). The *Persea* germplasm resources potential as discovered during an international collection project. *In Proceeding of the 5th World Avocado Congress, Malaga, Spain* 1, pp. 21-26).

<https://cuisinedobox.com/Vegan/75769427-The-persea-germplasm-resources-potential-as-discovered-during-an-international-collection-project.html>

Boxus, P. D., Le Mercier N., (1988). Difficulties in the establishment of axenic *in vitro* cultures of field collected coffee and cacao germplasm. *Acta Horticulturae* 225: 67-75. https://www.actahort.org/books/225/225_7.htm

Brondani, G. E.; Abreu-Tarazi, M. F. 2012. Preprocambial cells are niches for pluripotent and totipotent stem-like cells for organogenesis and somatic embryogenesis in the peach palm: a histological study. *Plant Cell Reports*, 8(31) 1495-1515. <https://doi.org/10.1007/s00299-012-1264-6>.

Calabrese F. 1992. El aguacate. S.A. mundi-prensa libros. pp 221-250. Doi: 9788471143907

Caplin, S. M., & Steward, F. C. (1948). Effect of Coconut Milk on the Growth of Explants From Carrot Root. *Science* (New York, N.Y.), 108(2815), 655–657. <https://doi.org/10.1126/science.108.2815.655>

Castillo M. A. (2004). Propagación de plantas por cultivo *in vitro*: una biotecnología que nos acompaña hace mucho tiempo. Unidad de Biotecnología, INIA Las Brujas. Pp:8. <http://www.ainfo.inia.uy/digital/bitstream/item/410/1/111219220807102417.pdf>.

Castro, M., & Fassio, C. (2015). Innovación, desarrollo y transferencia de tecnología de plantines clonales de palto em Chile. In Congreso Mundial De La Palta (8), 34-36. http://www.avocadosource.com/WAC8/Section_02/CastroM2015.pd

Concepción, O., Nápoles, L., Pérez, A. T., Peralta, N., Hernández, M., & Trujillo, R. (2005). Efecto de tres antioxidantes en el cultivo *in vitro* de ápices de guayaba (*psidium guajava* L.). Relación entre el origen del explante y el contenido de compuestos fenólicos. *Cultivos Tropicales*, 26(1), 33-39. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=193215916005>

Cooper, P. A. 1987. Advantages in the micropropagation of avocado (*Persea americana* Mill). *Acta Horticulturae*. 212(2):571-575. <https://doi.org/10.4236/ajps.2017.811197>.

- Flores-Mora, D. M., Jiménez-Bonilla, V., & Chacón-Cerdas, R. (2008). Cultivo de tejidos en *Ficus carica* con miniestacas. *Agronomía Mesoamericana*, 20(2), 319–325. <https://doi.org/10.15517/am.v20i2.4948>
- George, E. F., Hall, M. A., & Klerk, G.-J. D. (2007). Plant Tissue Culture Procedure – Background. In *Plant Propagation by Tissue Culture* (pp. 1–28). https://doi.org/10.1007/978-1-4020-5005-3_1
- Gutierrez Yenisey, Folgueras Mariluz, Santos Arletys, López Jorge, Medero Víctor, Reinaldo Damisela et al . Bacterial contamination management on *in vitro* propagation of axillary buds of *Colocasia esculenta* cv. ‘INIVIT MC-2012’. *Biot. Veg.*; 19(2): 147-152. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2074-86472019000200147&lng=es. Epub 01-Jun-2019.
- Hartmann, H.T., Kester, D.E., Davies Junior, F.T., Geneve, R.L. (2012) Plant propagation: principles and practices. *The Quarterly Review of Biology*, 51(4), 537–538. <https://doi.org/10.1086/409642>
- Jiménez-Bonilla, Vilma, & Abdelnour-Esquivel, Ana. (2018). Protocolo de micropropagación de arándano nativo de Costa Rica (*Vaccinium consanguineum*). *Revista Tecnología en Marcha*, 31(1), 144-159. <https://dx.doi.org/10.18845/tm.v31i1.3504>
- Jordán M., & Casaretto J. (2006). Hormonas y Reguladores del Crecimiento: Auxinas, Giberelinas y Citocininas. (In) F.A. Squeo & L. Cardemil (eds.) *Fisiología vegetal*. (Pp: 27). Departamento de Ecología, Facultad de Ciencias Biológicas, P. Universidad Católica de Chile. <https://www.exa.unne.edu.ar/biologia/fisiologia.vegetal/Auxinasgiberelinasycitocininas.pdf>
- Kopp L. E. (2013). taxonomic revision of the genus *Persea* in the Western Hemisphere (*Persea-Lauraceae*. *Feddes Repertorium*, 132(3), 177–192. <https://doi.bibliotecabuap.elogim.com/10.1002/fedr.202000041>

- Letham D. S. (1973). Cytokinins from *Zea mays*. *Phytochemistry* 12: 2445-2455.
[https://doi.org/10.1016/0031-9422\(73\)80453-4](https://doi.org/10.1016/0031-9422(73)80453-4)
- Losada, D. & Romero, L. (1974). Reproducción vegetativa o asexual del aguacate. California Avocado Society. Year book, 57, 171-174.
http://www.avocadosource.com/CAS_Yearbooks/CAS_57_1973/CAS_1973-74_PG_171-174.pdf
- Ludwig-Müller J & Jd Cohen. (2002). Identification and quantification of three active auxins in different tissues of *Tropaeolum majus*. *Physiologia Plantarum* 115: 320–329.
<https://doi.org/doi:10.1034/j.1399-3054.2002.1150220.x>.
- Malonek S., C. Bomke, E. Bornberg-Bauer, Mc Rojas, P. Hedden, P. Hopkins & B Tudzynski. (2005). Distribution of gibberellin biosynthetic genes and gibberellin production in the *Gibberella fujikuroi* species complex. *Phytochemistry* 66: 1296-1311. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2005.04.012>
- Manh-Cuong, D., Cong Du, P., Tung, H. T. et al. (2021). Silver nanoparticles as an effective stimulant in micropropagation of *Panax vietnamensis* - a valuable medicinal plant. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. <https://doi.org/10.1007/s11240-021-02095-2>.
- Nhut, D.T., Thi, N.N., Khiet, B.Lt.; Luan, V.Q. (2008) Peptone stimulates *in vitro* shoot and root regeneration of avocado (*Persea americana* Mill.). *Scientia Horticulturae, Amsterdam*, (115) 124–128, <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2007.08.011>
- Olivera-Gonzales, Percy, Espinoza del Río, Rosa, & Tamariz-Angeles, Carmen. (2017). Multiplicación *in vitro* y embriogénesis somática de *Perezia pinnatifida* (Asteraceae) planta medicinal andina. *Revista Peruana de Biología*, 24(3), 323-328. <https://dx.doi.org/10.15381/rpb.v24i3.13911>
- Petry, H.B.; Ferreira, B.D.P.; Koller, O.C.; Silva, V.S.; Schwarz, S.F. (2012) .Propagação de abacateiro via estacas estioladas. *Bragantia, Campinas*, 1(71), 15-20
<https://doi.org/10.1590/S0006-87052012000100003>

- Pliego-Alfaro, F., Barceló-Muñoz., López-Gómez, R., Ibarra-Laclette E. Herrera-Estrella, L.; Palomo-Ríos, E.; Mercado, J.A.; Litz, R.E. (2013) The avocado: botany, productions and uses. (Eds.), *The Quarterly Review of Biology*, 79(1), 85. <https://doi.bibliotecabuap.elogim.com/10.1086/421634>
- Rodriguez S.F. 1992. El aguacate. AGF editor S.R.. Mexico. pp. 13-16. ISBN 9789684630086
- Sánchez, S., Mijares, P., López, L., & Barrientos, A. (2001). Historia del aguacate en México. Memoria 1998-2001. Fundación Salvador Sánchez Colín. CICTAMEX S. C., 171–187. http://www.avocadosource.com/journals/cictamex/cictamex_19982001/CICTAMEX_1998-2001_PG_171-187.pdf 32
- Scora R.W., B.N. Wolstenholme & U. Lavi. (2007). Taxonomy and Botany,. (Eds), A. W. Whiley, B. Schaffer Y B. N. Wolstenholme In. El palto. Botánica, Producción y Usos. pp. 37-15 (eds.). Ediciones Universales de Valparaíso. Chile.
- Smith, C.E. (2008). Archeological evidence for selection in avocado. *Economic Botany*, 20, 169-175. <https://doi.org/10.1007/BF02904012>
- Thao, N. P., Khan, M. I. R., Thu, N. B. A., Hoang, X. L. T., Asgher, M., Khan, N. A. y Tran, L. S. P. (2015). Role of ethylene and its cross talk with other signaling molecules in plant responses to heavy metal stress. *Plant Physiology*, 169(1): 73-84. <https://doi.org/doi: 10.1104/pp.15.00663>.
- Villarreal-Gómez, L. J., Pérez-González, G. L., Bogdanchikova, N., Pestryakov, A., Nimaev, V., Soloveva, A., Cornejo-Bravo, J. M., y Toledano-Magaña, Y. (2021). Antimicrobial effect of electrospun nanofibers loaded with silver nanoparticles: Influence of Ag incorporation method. *Journal of Nanomaterials*. <https://doi.org/10.1155/2021/9920755>.

Williams, L. O. (1977). The Avocados, a Synopsis of the Genus *Persea*, subg. *Persea*. *Economic Botany*, 31(3), 315–320.
<https://doi.bibliotecabuap.elogim.com/10.1007/BF02866883>.