

**ESCUELA POLITÉCNICA DEL EJÉRCITO  
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA  
CARRERA DE INGENIERÍA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS  
SANGOLQUÍ**

**“PROPAGACIÓN CLONAL DE AGUACATE DUKE 7 (*Persea americana*  
Mill.) MEDIANTE LA TÉCNICA DE ETIOLACIÓN DE BROTES O  
CULTIVO IN VITRO”**

**PULLAS VIZCAÍNO DIANA CAROLINA**

**INFORME DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN PRESENTADO COMO  
REQUISITO PARCIAL PARA OPTAR AL TÍTULO DE INGENIERO  
AGROPECUARIO**

**SANGOLQUÍ-ECUADOR**

**2011**

**“PROPAGACIÓN CLONAL DE AGUACATE DUKE 7 (*Persea americana*  
Mill.) MEDIANTE LA TÉCNICA DE ETIOLACIÓN DE BROTES O  
CULTIVO IN VITRO”**

**PULLAS VIZCAÍNO DIANA CAROLINA**

**REVISADO Y APROBADO**

.....

**Ing. Patricia Falconí  
DIRECTORA DE CARRERA  
CARRERA DE INGENIERÍA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS**

Ing. César Falconí  
DIRECTOR

Ing. Abraham Oleas  
CODIRECTOR

.....  
**SECRETARÍA ACADÉMICA**

**“PROPAGACIÓN CLONAL DE AGUACATE DUKE 7 (*Persea americana*  
Mill.) MEDIANTE LA TÉCNICA DE ETIOLACIÓN DE BROTES O  
CULTIVO IN VITRO”**

**PULLAS VIZCAÍNO DIANA CAROLINA**

**APROBADO POR LOS SEÑORES MIEMBROS DEL TRIBUNAL DE  
CALIFICACIÓN DEL INFORME TÉCNICO.**

	<b>CALIFICACIÓN</b>	<b>FECHA</b>
Ing. César Falconí <b>DIRECTOR</b>	_____	_____
Ing. Abraham Oleas <b>CODIRECTOR</b>	_____	_____

**CERTIFICO QUE ESTAS CALIFICACIONES FUERON PRESENTADAS EN  
ESTA SECRETARÍA**

**SECRETARÍA ACADÉMICA**

DEDICATORIA

Con cariño a mis padres Carmen y Eduardo que con paciencia y voluntad me  
brindaron el apoyo que siempre necesite.

## AGRADECIMIENTO

A la ESPE, su Carrera de Ingeniería en Ciencias Agropecuarias y su personal Docente, por los valiosos conocimientos impartidos.

Al INIAP, por compartir material vegetal importante para esta investigación.

Al Ing. Cesar Falconí y al Ing. Abraham Oleas, por sus acertadas recomendaciones para el desarrollo de esta Investigación.

A mi hermano Jhonny, que me supo dar su apoyo y cariño incondicional a lo largo de mi carrera universitaria.

A la Sra. Mariela Bernal, por abrirme un espacio de su corazón en esta importante etapa de mi vida.

A Juan José, por permitirme compartir la emoción de vivir y ser feliz.

AUTORÍA

Yo, Diana Carolina Pullas Vizcaíno

Autorizo a la Escuela Politécnica del Ejército la publicación, en la Biblioteca virtual de la Institución del trabajo “PROPAGACIÓN CLONAL DE AGUACATE DUKE 7 (*Persea americana* Mill.) MEDIANTE LA TÉCNICA DE ETIOLACIÓN DE BROTES O CULTIVO IN VITRO”, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi exclusiva responsabilidad y autoría

Quito, septiembre del 2011

---

Diana Carolina Pullas Vizcaíno

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>OBJETIVOS</b> .....	2
<b>Objetivo General</b> .....	2
<b>Objetivos Específicos</b> .....	2
<b>REVISIÓN DE LITERATURA</b> .....	3
<b>GENERALIDADES</b> .....	3
<b>Origen</b> .....	3
<b>Taxonomía</b> .....	5
<b>Valor Nutritivo</b> .....	7
<b>Condiciones de Cultivo: Clima y Suelos</b> .....	9
<b>Aspectos Agrotécnicos</b> .....	10
<b>Rendimiento</b> .....	11
<b>Usos del Aguacate</b> .....	12
<b>Biotecnología del Aguacate</b> .....	12
<b>Técnicas que Promueven la Propagación Clonal de Aguacate</b> .....	14
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	23
<b>UBICACIÓN DEL LUGAR DE INVESTIGACIÓN</b> .....	23
<b>Ubicación Política</b> .....	23
<b>Ubicación Geográfica</b> .....	24

## VIII

Ubicación Ecológica .....	24
<b>MATERIALES</b> .....	25
<b>MÉTODOS</b> .....	26
Método de Propagación Clonal Mediante la Etiolación de brotes .....	26
Diseño Experimental .....	28
Método de Propagación Clonal Mediante Cultivo <i>In Vitro</i> .....	30
Diseño Experimental .....	34
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	37
<b>MÉTODO DE PROPAGACIÓN CLONAL MEDIANTE LA ETIOLACIÓN DE BROTES</b> .....	37
Incremento de Brotes/Planta Debido al Proceso de Etiolación .....	37
Longitud de Brotes/Planta Debido al Proceso de Etiolación .....	38
Formación de Estructuras en los Brotes Después del Proceso de Etiolación .....	40
<b>MÉTODO DE PROPAGACIÓN CLONAL MEDIANTE CULTIVO <i>IN VITRO</i></b> .....	42
Porcentaje de Contaminación .....	42
Longitud de Brotes en el Proceso <i>In Vitro</i> .....	43
Número Brotes en el Proceso <i>In Vitro</i> .....	44
Número de Hojas en el Proceso <i>In Vitro</i> .....	46

<b>CONCLUSIONES</b> .....	49
<b>RECOMENDACIONES</b> .....	50
<b>RESUMEN</b> .....	51
<b>ABSTRACT</b> .....	52
<b>BIBLIOGRAFIA</b> .....	53

## ÍNDICE DE CUADROS

<u>Cuadro 1. Características de la grasa cruda en pulpa de aguacate en g por 100 g de material fresco</u> .....	7
<u>Cuadro 2. Características de la fracción mineral en pulpa de aguacate en mg por 100 g de material fresco</u> .....	8
<u>Cuadro 3. Características de las vitaminas en pulpa de aguacate en mg por 100 g de material fresco</u> .....	8
<u>Cuadro 4. Composición de medios de cultivo para células vegetales</u> .....	20
<u>Cuadro 5. Tratamientos a comprobar</u> .....	29
<u>Cuadro 6. Tratamientos a comprobar</u> .....	34
<u>Cuadro 7. Número de brotes/planta a los 15 días debido al proceso de etiolación</u> ....	37
<u>Cuadro 8. Frecuencia del incremento de brotes/planta a los 15 días del proceso de etiolación</u> .....	38
<u>Cuadro 9. Desarrollo de la longitud de brotes hasta los 60 días debido al proceso de etiolación</u> .....	39
<u>Cuadro 10. Frecuencia de la longitud de brotes hasta los 60 días, debido al proceso de etiolación</u> .....	40
<u>Cuadro 11. Porcentaje de brotes desetiados sobre plantas nodrizas con estructuras formadas por los tratamientos, 45 días después de su aplicación</u> .....	41
<u>Cuadro 12. Porcentaje de contaminación en el proceso <i>in vitro</i> a los 15 días.</u> .....	42
<u>Cuadro 13. Promedio longitud de brotes hasta los 60 días en el proceso <i>in vitro</i></u> .....	43
<u>Cuadro 14. Frecuencia de longitud de brotes hasta los 60 días en el proceso <i>in vitro</i></u> .....	44

<u>Cuadro 15. Promedio del número de brotes/planta hasta los 60 días en el proceso <i>in vitro</i></u> .....	45
<u>Cuadro 16. Frecuencia de número de brotes/planta hasta los 60 días en el proceso <i>in vitro</i></u> .....	46
<u>Cuadro 17. Número de plantas que presentaron hojas a los 60 días.</u> .....	47
<u>Cuadro 18. Número total de hojas por tratamiento en el proceso <i>in vitro</i></u> .....	48

## INTRODUCCIÓN

El cultivo de aguacate ha despertado gran interés entre los productores en los últimos años en Ecuador. Su alto rendimiento y la capacidad de ofertarlo durante todo el año han colocado a este fruto, en un sitio privilegiado dentro de los productos ecuatorianos no tradicionales con mayores opciones para exportarlo.

En la actualidad la producción de plantas de aguacate se ha venido manejando mediante propagación sexual o semilla, técnica que por años ha dado como resultado huertos heterogéneos y susceptibles a pudrición de raíz. La propagación clonal mediante plantas etioladas o cultivo *in vitro* en aguacate ha sido utilizado en varias investigaciones científicas que han permitido garantizar la rápida introducción de nuevos cultivares así como para obtener plantas libres de virus y enfermedades. Estudios realizados en Chile dieron las pautas para implementar la técnica de etiolación como un sistema de propagación clonal para el aguacate (Castro *et al.* 2002). Respecto del cultivo *in vitro*, Calabrese (1992) afirma que dicha propagación ha revolucionado las técnicas clásicas de vivero, permitiendo un fuerte ahorro económico en la obtención de plántulas.

El cultivo de aguacate es rentable y presenta óptimas perspectivas para el futuro, por lo que es primordial la utilización de nuevas técnicas para la propagación asexual, mediante la combinación de hormonas y variedades resistentes a enfermedades que aseguren la reproducción rápida y masiva de plantas.

## OBJETIVOS

### Objetivo General

- Establecer la propagación clonal de aguacate Duke 7 (*Persea americana* Mill.) para la producción masiva de plantas mediante la técnica de etiolación de brotes o cultivo *in vitro*.

### Objetivos Específicos

- Determinar el efecto de la etiolación de brotes de aguacate Duke 7 como un método eficiente de propagación.
- Determinar el efecto de cultivo *in vitro* de brotes axilares de aguacate Duke 7 colectados en campo como un método eficiente para su propagación clonal.
- Establecer la dosis de AIB, BAP, GA<sub>3</sub> en la etiolación de brotes o cultivo *in vitro* de aguacate Duke 7.
- Difundir la tecnología generada mediante un boletín técnico.

## REVISIÓN DE LITERATURA

### GENERALIDADES

#### Origen

Smith (1969), considera que México es el centro de origen del aguacate (*Persea americana* Mill.). La evidencia más antigua del consumo de esta fruta data de 10,000 años a. C. y fue encontrada en una cueva localizada en Coxcatlán, Puebla. El origen del aguacate tuvo lugar en las partes altas del centro y este de México, y partes altas de Guatemala donde se llevó a cabo la domesticación del mismo. En la época colonial los españoles introdujeron el aguacate a otros países americanos y a Europa. A finales del siglo XIX y principios del XX el consumo de aguacate estuvo basado en la producción de plantas de las razas mexicanas y antillana.

Popenoe (1952, citado por Williams), tratando de evidenciar cuáles precursores de los aguacates cultivados se habían originado desde Honduras a Colombia, concluyó que el centro obvio de origen era el ya señalado para las especies de *Persea* y que solo dos especies ocurrían desde Honduras, pero con una cercana relación genética con las especies señaladas para México y Guatemala. Las cuatro variedades, de las cuales se mencionan dos para cada especie son:

*Persea americana* Mill. var. *drymifolia*. Es el aguacate mexicano y el más antiguo usado como alimento por el hombre. Se usó desde antes del desarrollo de la agricultura hasta nuestros días. Hay muchas evidencias arqueológicas que muestran el uso del aguacate por el hombre primitivo americano. Hay evidencias que muestran que los antiguos habitantes de este valle, seleccionaron aguacates por su tamaño durante la prehistoria (Smith, 1969).

*Persea americana* Mill. var. *americana*. Es el aguacate de Indias Occidentales. Su uso se extendió desde México hasta el Perú. Evidencias arqueológicas señalan la existencia de este tipo de aguacate, en Perú, desde hace 3.000 a 4.000 años. Plantas y frutos de esta antigüedad se conservaron debido a condiciones cismáticas, a lo largo de las costas de este país (Williams, 1977).

*Persea nubigena* L. Wms. var. *nubigena*. Es el ancestro silvestre del aguacate de Guatemala, el cual tiene una población relativamente homogénea, distribuida en toda la faja de la Cordillera de Talamanca en Costa Rica, población que se hace más amplia en Guatemala, donde las montañas altas son más extensas y forman bosques montañosos. También se localizan poblaciones silvestres de esta especie en las montañas altas y bosques nublados de Honduras y Nicaragua. La distribución tan amplia de formas muy silvestres de *P. nubigena*, puede haber dado lugar a una selección por tamaño, entre los pueblos, de las formas primitivas de aguacates allí encontrados (Williams, 1977).

*Persea nubigena* L. Wms. var. *guatemalensis*. Es el aguacate de Guatemala. Se estima como el mejor aguacate aparecido en tiempos de la preconquista de América y el origen del mismo se atribuye a formas silvestres de *P. nubigena* L. Wms. var. *nubigena*, profusamente dispersas, como ya fue señalado en bosques altos, montañosos desde México hasta Guatemala (Williams, 1977).

Storey *et al.* (1986), mencionan que los centros de origen propuestos para las razas botánicas se encuentran relativamente cercanos, los de las razas Mexicana y Guatemalteca se sobreponen un poco con los demás de la misma Guatemala y algunos de Centroamérica. Así, numerosos datos coleccionados por Eugenio Schieber y George Zentmyer, especialmente en los 1970s y 1980s documentan esta sobreposición y los motivos de este flujo genético.

Entre las variedades de aguacate más utilizadas en el Ecuador están Nacional, Guatemalteco, Hass, Booth 8, Fuerte, Tonnage, y Choquete (Adams ,2006).

### **Taxonomía**

#### **Descripción botánica**

El Aguacate pertenece a la familia de las Lauráceas y en la actualidad el género *Persea* contiene alrededor de 85 especies.

La semilla de aguacate bajo condiciones normales es viable de 2 a 5 semanas, luego de haber sido removida del fruto, pero puede ser almacenada, por largo tiempo, en condiciones especiales de humedad.

Una buena y rápida germinación se logra, si es removida la cáscara de la semilla; la germinación es hipógea. Las semillas se siembran en viveros, donde una vez alcanzado el desarrollo de plántula, 2-4 meses después, son trasplantadas al campo. El desarrollo total de la planta y la producción se alcanza entre 5-6 años, o en 3-4 años para cultivares propagados vegetativamente (Purseglove, 1979).

Es un árbol extremadamente vigoroso (tronco potente con ramificaciones vigorosas), pudiendo alcanzar hasta 30 m de altura. Hojas alternas, pedunculadas, muy brillantes. Las flores se forman en panículas, son bisexuales y exhiben protoginia y dicogamia sincronizada, lo que significa que cada flor se abre en dos momentos distintos y separados, es decir los órganos femeninos y masculinos son funcionales en diferentes tiempos, lo que evita la autofecundación (Minas, 1976).

En ambos tipos, las flores abren primero como femeninas, cierran por un periodo fijo y luego abren como masculinas en su segunda apertura.

Esta característica de las flores de aguacate es muy importante en una plantación, ya que para una buena producción es conveniente mezclar variedades adaptadas a la misma altitud, con tipo de floración A y B y con la misma época de floración en una proporción 4:1, donde la mayor población será de la variedad deseada.

El aguacate es polinizado también por insectos, y *Apis melífera*, de la familia Apidae, es un polinizador importante, *Metabolibia singulata* y *Polistes canadensis* de la familia Vespidae, son también polinizadores frecuentes (Minas, 1976).

### **Valor Nutritivo**

De acuerdo con datos de valor nutritivo de alimentos informados por Muñoz y Ledezma (2002), se observa que los aguacates poseen un alto porcentaje de grasas totales y de ácido oleico, aunque en el aguacate de cáscara es menor la concentración de ácido graso (Cuadro 1).

**Cuadro 1. Características de la grasa cruda en pulpa de aguacate en g por 100 g de material fresco**

<b>Concepto</b>	<b>Valor</b>
Grasas totales	13.0
Colesterol, mg	-
<b>Acidos grasos</b>	
Saturados totales	2.44
Monoinsaturados <sup>1</sup>	8.97
Poliinsaturados <sup>2</sup>	1.84
<sup>1</sup> Predominantemente, ácido oleico	
<sup>2</sup> Predominantemente, ácido linoleico	
Fuente de los datos: Muñoz y Ledezma (2002)	

Desde el punto de vista de su fracción mineral, la pulpa del aguacate es una buena fuente de potasio, y contiene más fósforo que calcio (Cuadro 2).

**Cuadro 2. Características de la fracción mineral en pulpa de aguacate en mg por 100 g de material fresco**

Concepto	Valor
Calcio	24.00
Fósforo	42.00
Hierro	0.50
Magnesio	45.00
Sodio	4.00
Potasio	604.00
Zinc	0.42

Fuente de los datos: Muñoz y Ledezma (2002) |

La pulpa de aguacate contiene la mayoría de las vitaminas hidrosolubles, así como retinol. Sin embargo, no se ha informado la presencia de cobalamina en la pulpa de aguacate (Cuadro 3).

**Cuadro 3. Características de las vitaminas en pulpa de aguacate en mg por 100 g de material fresco**

Concepto	Valor
Retinol, µg	20.00
Acido ascórbico	14.00
Tiamina	0.09
Riboflavina	0.14
Niacina	1.90
Piridoxina	0.28
Acido fólico, µg	62.00
Cobalamina, µg	-

<sup>1</sup> Predominantemente, ácido oleico

<sup>2</sup> Predominantemente, ácido linoleico

Fuente de los datos: Muñoz y Ledesma (2002)

### **Condiciones de Cultivo: Clima y Suelos**

Benacchio (1982) y Ruiz *et al.* (1999) señalan que en función de la raza de origen del aguacate, que puede establecerse desde el nivel del mar hasta los 3.000 m de altitud, aunque los huertos, ubicados a más de 2.400 m, en la práctica se consideran fuera de la zona apropiada para una producción rentable.

La raza mexicana prospera en altitudes de 500 a 3.000 m, el de Guatemala 1.000 a 2.000 metros y la antillana de 0 a 1.000 metros.

Winston (1987), señala que el aguacate cv. Hass, para el amarre de fruto requiere temperaturas en un rango que va desde 12 hasta 17° C a 28 a 33° C.

Gafni (1984), anota que las temperaturas superiores a 42°C son desfavorables para el cultivo.

Lovatt (1990), señala que las temperaturas por encima de 28° C causan la abscisión de flores individuales.

Hills (1988) y Jasso (1989), mencionan que en el cultivo de aguacate las temperaturas más altas a 32° C tienen efectos negativos debido a un detrimento en la fertilización y el grado de esterilidad del polen.

Los suelos más recomendados son los de textura ligera, profundos, bien drenados con un pH neutro o ligeramente ácidos (5.5 a 7), pero puede cultivarse en suelos arcillosos o franco arcillosos siempre que exista un buen drenaje, pues el exceso de humedad propicia un medio adecuado para el desarrollo de enfermedades de la raíz.

### **Aspectos Agrotécnicos**

La preparación del terreno depende de la topografía y de la vegetación existente. Si el terreno es plano y ha sido cultivado previamente, no necesita preparación, solo se marca y se hacen hoyos con 60 cm de diámetro y 50 a 60 cm de profundidad.

Si es plano pero tiene malas hierbas, debe aplicar previamente algún herbicida y posteriormente arar y rastrar. Posteriormente se hace el marcaje tresbolillo y otros (Valencia, 1912). Es conveniente construir zanjas siguiendo las curvas de nivel para la protección del suelo.

Las tendencias hace poco con relación al cultivo del aguacate en Cuba y en otros países productores consistían en emplear marcos de plantación amplios sin intercalamientos lo que implica un bajo aprovechamiento del suelo y rendimiento del cultivo (Cañizares, 1973).

Dentro de las labores culturales se recomienda colocar al trasplante 250 g de un fertilizante rico en fosforo como 10-30-10 o triple superfosfato, en el fondo del hoyo.

Por cada año de edad del árbol, un kilo de un fertilizante rico en nitrógeno y potasio como 18-5-15-6-2, repartido en tres aplicaciones, una a la entrada de las lluvias y las otras dos cada dos meses (Valencia, 1912).

Normalmente, la primera cosecha comercial ocurre a los cinco años en árboles injertados y la cantidad de frutos producidos depende de la variedad y la atención que haya recibido la planta en su desarrollo. A los cinco años, generalmente se cosechan cincuenta frutos; a los seis años, ciento cincuenta frutos; a los siete años, trescientos frutos y ochocientos a los ocho años.

### **Rendimiento**

El rendimiento de fruto promedio aceptable de un huerto de aguacate, es de 250 a 350 kg/árbol. En el huerto no es raro tener árboles con rendimientos hasta de 600 kg/árbol, junto a árboles de muy bajo rendimiento. Una densidad de población común es de 100 árboles/ha. Dependiendo de la meta de rendimiento posible a lograr del aguacate (ejemplo 10 a 30 TM/ha) de su edad, de nivel de fertilidad del suelo, disponibilidad de agua (Suárez, 2005).

### **Usos del Aguacate**

Se utiliza principalmente en la alimentación, como complemento de todo tipo de comidas, y de su rica materia grasa puede extraerse un aceite utilizado en la industria cosmética y farmacéutica.

El aguacate con sus propiedades nutraceuticas (que nutren y curan) y cosmeceuticas (que nutren y ayudan al cuidado de la piel) adquiere una importancia fundamental en la alimentación de la población en general y si se consideran problemas de salud como; diabetes, altos niveles de colesterol en la sangre y la hipertensión arterial, esta fruta adquiere una importancia mayor en la ayuda para contrarrestar estos problemas o ayudando a evitar enfermedades y hasta retrasar el envejecimiento (Gutiérrez, 2009).

### **Biotechnología del Aguacate**

#### **Propagación vegetativa de portainjertos. Su importancia en el**

#### **Aguacate**

De manera general la propagación vegetativa puede emplearse para obtener una planta íntegra o sólo una nueva copa (injerto). En ambos casos el genotipo resultante será idéntico a la planta de donde se obtuvo el material vegetativo para la propagación.

En numerosas especies frutales de gran importancia económica como las vides y los manzanos por ejemplo, es una práctica común el empleo de portainjertos clonales (Ben-Ya'acov y Zilberstaine, 1999).

El aguacate es una especie de polinización cruzada, monoembriónica y altamente heterocigota, características que se manifiestan en una muy resaltada variabilidad genética en las plantas de origen sexual. Debido a estas características, los portainjertos obtenidos de semilla, incluso a partir de una sola planta madre, son genéticamente desuniformes (Calabrese, 1992; Koller, 1992).

Para obviar la variabilidad, que resulta de utilizar portainjertos de palto producidos por semilla, es necesario recurrir a la producción de portainjertos clonales, sobre los cuales se injerta el cultivar deseado. De esta manera, las plantas definitivas de una plantación comercial serán genéticamente idénticas entre sí, tanto en patrón como en copa (Hartmann *et al.* 1997; Ernst, 1999).

Como en muchas especies frutales, en los aguacates también existe la necesidad de seleccionar portainjertos en función de ciertas características que pueden ser favorables para hacer frente a factores limitantes de la producción como el suelo, su tolerancia a la pudrición radicular, a la salinidad, al exceso calcáreo, a la falta de aireación, incluso para reducir la susceptibilidad de los frutos a desórdenes fisiológicos o a enfermedades del fruto como la antracnosis (Willingham *et al.* 2001).

La necesidad de contar con portainjertos clonales, se volvió mucho más apremiante a partir del año 1942 cuando se aisló el hongo *Phytophthora cinnamomi* Rands como el patógeno causante de la pudrición radicular (Zentmyer, 1980; Zentmyer *et al.* 1998), y la búsqueda de patrones tolerantes al patógeno se convirtió en una prioridad mundial en la investigación sobre el cultivo del palto (Gallo *et al.* 1999). Desde entonces muchos portainjertos con esas características, como los cultivares Duke 7, Thomas, BarrDuke, Toro Canyon, Merensky 2 (Dusa) y Evstro, han sido seleccionados principalmente en California (EEUU), Israel y Sudáfrica (Menge *et al.* 1992; Menge, 2001).

### **Técnicas que Promueven la Propagación Clonal de Aguacate**

#### **Etiolación**

La etiolación es el desarrollo de plantas o partes de las mismas en ausencia de luz, que tiene como resultado hojas pequeñas no expandidas, brotes elongados y falta de clorofila, lo que da lugar a un color blanco de los tejidos. En la práctica, los propagadores de plantas también usan el término de etiolación para referirse a brotes de plantas madres o nodrizas forzadas a crecer bajo una fuerte sombra (Hartmann *et al.* 1997).

La etiolación de brotes aumenta la concentración interna de auxinas, disminuye la lignificación de los tejidos, aumenta la acumulación de almidón en la región etiolada

y disminuye el contenido de co-factores negativos del enraizamiento, especialmente de AIA- oxidasa (Bassuk y Maynard, 1987; Hartmann *et al.* 1997).

Según Bassuk y Maynard (1987), la etiolación aumenta considerablemente la sensibilidad del tallo a la auxina, asimismo, induce cambios anatómicos en los tejidos del tallo que podrían incrementar la iniciación de primordios radicales, principalmente a partir las células parenquimáticas indiferenciadas.

El tiempo requerido en ausencia de luz para que los brotes sean adecuadamente etiolados, según reportan varios investigadores, es variable. En promedio se ubica entre 3 y 8 semanas (Ernst, 1999; Rodriguez, 2003; De los Santos, 2001; Velho Da Silveira *et al.* 2004; Aguilera, 2007).

En la mayoría de casos y para fines de propagación, una vez que los brotes están totalmente etiolados, éstos son puestos en condiciones de luz para desetiolarlos, manteniendo etiolada sólo la porción donde posteriormente tendrá lugar el enraizamiento.

### **Aplicación exógena de auxinas en el proceso de etiolación**

La presencia de la auxina es reconocida como un factor que promueve la formación de raíces adventicias, la aplicación de reguladores crecimiento tipo auxinas como el ácido indolbutírico (AIB), puede incrementar la concentración interna de la hormona,

reforzar su efecto y mejorar la calidad de las raíces (Ernst (1978) citado por Ernst, 1999; Gaspar y Hoffinger (1988) citados por Velho da Silveira *et al.* 2004).

Cutting y Van Vuuren (1988), empleando esquejes no etiolados de palto, encontraron que el AIB aplicado en talco a 2,000 mg.L-1 fue favorable para el enraizamiento de los esquejes, sin embargo concentraciones de 3,000 mg.L-1 estimularon una excesiva producción de callos.

Alves *et al.* (1999), en un trabajo con acodos de brotes etiolados de palto en contenedores, determinó que la aplicación de AIB fue más eficiente cuando adicionalmente el acodo fue anillado.

### **Cultivo *in vitro***

Si bien el aguacate ha sido propagado en forma rutinaria por injerto y se ha investigado su propagación por estacas recientemente (Ya'acov, 1086), la técnica *in vitro* ofrece una alternativa rápida de multiplicación de nuevas variedades y patrones (George y Sherrington, 1984). Se ha tenido éxito con material juvenil, pero no con material adulto (Villegas, 1985).

### **Selección del explante**

Kester (1978), señala que la selección de tejidos juveniles es propicia para organogénesis *in vitro* de plantas leñosas. Un tejido joven puede originar brotes y raíces (Pliego *et al.* 1987), no obstante la selección ontogénica del explante no parece estricta, eso es lo que demuestran Dalso y Guevara (1989), quienes reportaron respuestas regenerativas en tejidos adultos de aguacate.

Para obtener un tejido juvenil o en transacción y conservar clonalmente una selección, es posible realizar una poda severa y tomar explantes de crecimientos de la temporada de alto vigor. Este tipo de manejo no implica necesariamente que el tejido esté en estado juvenil, pero si deben presentar una alta actividad metabólica (Kester, 1978).

Algunos autores han reportado que las repuestas organogénicas del aguacate *in vitro* se puede mejorar al utilizar explantes de tejido etiolado (Schroeder, 1980, Solórzano, 1989), sobre la base de relaciones hormonales favorables a las auxinas.

### **Tratamientos de desinfección**

El uso de técnicas tradicionales de desinfección con etanol e hipoclorito de sodio, produce pardeamiento y necrosis de tejidos en plantas leñosas (Kurtz y Tollet, 1990). Debido a esto se han desarrollado estrategias de desinfección con antibióticos y fungicidas (Dalso y Guevara, 1989), requiriendo en algunos casos aplicaciones periódicas de antibióticos a la planta madre.

Gonzales y Salazar (1989) sugieren que el uso de desinfectantes como el hipoclorito de calcio disminuye la contaminación debido a que reduce la tensión superficial en la solución desinfectante.

### **Medios de cultivo y componentes**

Reina (2003), menciona que los medios de cultivo constituyen un elemento fundamental para el cultivo *in vitro* de células, tejidos, protoplastos, anteras y para lograr el desarrollo de embriones, embrioides, la organogénesis, la micropropagación.

Los medios de cultivo tienen una serie de componentes generales y específicos cuya presencia y concentración estará en dependencia del objetivo que se persiga en su utilización. Así, los medios de cultivo pueden ser líquidos o tener un soporte sólido, tienen sustancias minerales, vitaminas, aminoácidos, azúcares, fitohormonas.

Los medios de cultivo más utilizados en aguacate se basan en la solución mineral descrita por Murashige y Skoog (1962), la cual se ha utilizado reduciendo los macronutrientes a la mitad o un tercio Pliego y Alfaro (1988).

Dalso y Guevara (1989) indican que la utilización de un medio con menor cantidad de amonio puede ser eficiente para la propagación en paltos, por lo que utilizan el medio N45K que contiene menor cantidad de nitrógeno y más potasio (Margara, 1988).

Pliego *et al.* (1987), consideran que la utilización de un medio de cultivo gelificado con más agar y una capa delgada de medio líquido con 0,65 y 0,1 mg/l de BA respectivamente es más eficiente permitiendo reducir la necrosis apical, pero favorece la vitrificación.

La composición del medio de cultivo se puede resumir en el Cuadro 4

**Cuadro 4. Composición de medios de cultivo para células vegetales**

Componentes	Características y ejemplos
Agua destilada	Representa el 95% del medio nutriente.
Fuente de carbono	Generalmente se usa sacarosa. La fuente de carbono se necesita porque los explantes no son completamente autótrofos y no pueden cubrir sus necesidades con la fotosíntesis que pueden realizar <i>in vitro</i>
Sustancias inorgánicas	Macroelementos: N, P, K, Ca, Mg, S Microelementos: Fe, Co, Zn, Ni, B, Al, Mn, Mo, Cu, I
Vitaminas	Vitaminas: B1, B2, B6, Vitamina E, ácido fólico, ácido nicotínico, entre otras.
Hormonas y reguladores de crecimiento	Auxinas: promueve la elongación celular, formación de callos y raíces adventicias. Citoquininas: promueve división celular, crecimiento y desarrollo de tejidos vegetales. Otras: Giberelinas, ácido abscísico, etileno.
Materiales inertes	Sustancias de soporte: agar, agarosa.

**Fuente:** Biotecnología, UNQ 2006

### **Reguladores de crecimiento utilizados en el cultivo *in vitro***

Adicionalmente a los nutrientes, generalmente es necesario agregar una o más sustancias reguladoras; frecuentemente Auxinas y/o Citoquininas, pero a veces también Giberelinas o Ácido ascórbico, para mejorar el desarrollo del cultivo *in vitro* de tejidos y órganos. Por otro lado, los requerimientos de estas sustancias varían considerablemente con los tipos de tejidos y los niveles endógenos de estos reguladores, así como con la finalidad del cultivo *in vitro*.

El uso de fitoreguladores en los cultivos *in vitro* es de gran importancia por cuanto se ha demostrado que la clase y concentración de dichas sustancias interactúan con el genoma de la planta (Montoya, 1991).

Las Auxinas originan en el cultivo de tejidos vegetales la inducción de callos, crecimiento inicial de explantes de meristemo y puntas de brotes. Entre las auxinas más utilizadas tenemos: AIB (ácido indolbutírico), AIA (ácido indolacético).

Las Citoquininas promueven la diferenciación celular y la inducción de yemas adventicias en callos y órganos. Entre la más utilizada está el BAP (6-bencilamino purina).

Las Giberelinas tienen como función principal el alargamiento de las regiones subapicales del explante. La Giberelina con mayor uso es el GA<sub>3</sub> pero se debe tener en cuenta que es muy sensible al calor (Montoya, 1991).

En aguacate Pliego *et al.* (1987), obtuvieron formación de brotes a partir de yemas laterales del crecimiento apical utilizando el medio N45K con 0.3 mg/l de BA.

Solórzano (1989), logró la obtención la emisión de hasta 4 brotes por explante al cultivar yemas de brotes etiolados en un medio MS con BA 2 mg/l y GA<sub>3</sub>.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### UBICACIÓN DEL LUGAR DE INVESTIGACIÓN

La investigación se realizó en dos localidades distintas; parroquia San Fernando-Hda. El Prado y en la parroquia de Guayllabamba.

#### Ubicación Política

Para la propagación mediante el cultivo *in vitro*, se escogió el Laboratorio de Control Biológico de la Carrera de Ciencias Agropecuarias-IASA Área de Cultivo de Tejidos de la Escuela Politécnica del Ejército ESPE, ubicada en Ecuador, provincia de Pichincha, cantón Rumiñahui, parroquia San Fernando, en la Hacienda “El Prado”.

Para la propagación mediante etiolación de brotes se escogió a la parroquia Guayllabamba provincia de Pichincha, cantón Quito.

Las condiciones de las dos localidades fluctúan entre rangos de temperatura de:12-27°C con humedades relativas entre 17 y 60%.

### **Ubicación Geográfica**

La Hacienda “El Prado” se encuentra en una posición geográfica de 78°24′44″ (O) y 0° 23′ 20″ (S) y a una altitud de 2748 msnm.

La parroquia de Guayllabamba se encuentra en una posición geográfica de 78°21′24,65″ (O)y 0° 3′ 14,33″ (S) a una altitud de 2200 msnm.

### **Ubicación Ecológica**

El laboratorio de Control Biológico, se encuentra ubicado en la zona de vida: Bosque húmedo pre-montano, Altitud: 2748 msnm, Temperatura mínima: 7°C, Temperatura máxima: 30°C: Temperatura promedio: 16°C, Precipitación: 727 mm/año, Vegetación: Bosque primario andino (arboles, arbusto y pastos).

La parroquia de Guayllabamba, se encuentra ubicada en la zona de vida: Bosque seco pre-montano, Altitud: 2200 msnm, Temperatura mínima: 8.08°C, Temperatura máxima: 20.06°C: Temperatura promedio: 16.35°C, Precipitación: 1200mm/año, Vegetación: Bosque primario andino (arboles, arbusto).

## MATERIALES

Los materiales que se utilizaron para la desinfección de brotes de aguacate fueron: jabón líquido, Bostock, Rifampimizina, agua destilada estéril, hipoclorito de sodio, frascos de 1 litro, soluciones nutritivas, recipientes plásticos.

Para la fase de cultivo *in vitro* se utilizó: tubos de vidrio, envases plásticos, soluciones nutritivas, hormonas de crecimiento, material vegetal, parafilm, mascarillas, guantes quirúrgicos, papel periódico, alcohol, papel aluminio, papel toalla.

En cuanto a la fase de campo se utilizó palillos de madera, hormonas de crecimiento, papel aluminio, cámara de etiolación, fertilizantes y productos agroquímicos.

Los equipos que se utilizaron fueron: Esterilizador o incubadora, auto clave, pH-metro, balanza analítica, refrigeradora, cámara de flujo laminar, cuarto de crecimiento, cámara de fotos.

Los instrumentos que se utilizaron fueron: pinzas anatómicas, mecheros, probetas, goteros, vasos de precipitación, buretas, botellas graduadas.

## MÉTODOS

El material Duke 7 se obtuvo de la Granja Experimental Tumbaco-INIAP (37 plantas de aguacate injertadas), de las cuales 27 plantas se dividieron para la etiolación de brotes y 10 plantas para el cultivo *in vitro*. Una vez ubicado el material se realizó un plan de control y fertilización para las mismas.

En este estudio se realizaron dos fases:

### **Método de Propagación Clonal Mediante la Etiolación de brotes**

#### **Fertilización y saneamiento de las plantas madres**

En las 27 plantas de aguacate Duke 7 se aplicó el fertilizante foliar completo Solucat 1.5 ml/l en agua corriente cada 20 días. El control fúngico se realizó con Ridomil 1.5 ml/l de agua corriente cada 7 días intercalando con Bostock 1.6 ml/l en agua corriente.

### **Tratamiento para plantas en cámara oscura**

Una vez que las yemas comenzaron a brotar se las introdujo en la cámara de etiolación donde permanecieron por 2 meses a una temperatura máxima de 25°C y una mínima de 21°C, humedad del 75% con un riego manual cada 8 días.

### **Selección de brotes para la formación de estructuras en tallo**

Al cabo de 15 días de introducidas las plantas a cámara oscura se seleccionaron los 2 brotes más vigorosos y saludables para continuar, con el proceso de etiolación.

### **Aplicación de auxinas para la formación de estructuras en brotes etiolados**

Luego de dos meses de etiolación, las plantas se ambientaron a la luz. En los brotes desetiolados se colocó un palillo de madera de 1mm de ancho y 5mm de largo, previamente embebido durante 24 horas en la hormona Ácido Indolbutírico (AIB), introduciéndolo en el tallo de cada brote desetiolado en dosis de 5.000 ppm y 10.000 ppm. Se tapó la porción de tallo tratado con papel aluminio para continuar la etiolación, mientras la planta madre recibió condiciones normales de luz.

Para la evaluación de la fase de campo se consideraron, las siguientes variables:

*Incremento de brotes por planta debido al proceso de etiolación (IBPE):* Que se evaluó después de 15 días de haber contabilizado el número de brotes por planta, restando el número de brotes anteriores menos el número de brotes actuales.

*Longitud de los brotes por planta debido al proceso de etiolación (LBPE):* Que se evaluó una vez seleccionados los 2 mejores brotes cada 15, 30, 45 y 60 días.

*Brotes con formación de estructuras en tallo (BFET):* Una vez cumplidos los 2 meses de etiolación se procedió a colocar la hormona y se hizo la evaluación de estructuras formadas en el brotes a los 45 días después de aplicado el tratamiento.

### **Diseño Experimental**

#### **Factores a probar**

En la fase de etiolación se probó AIB en dosis de 5.000 ppm y 10.000 ppm por cada brote etiolado.

#### **Tratamientos a comprobar**

En la etapa de enraizamiento se probaron, los siguientes tratamientos (Cuadro 5):

**Cuadro 5. Tratamientos a comprobar**

Tratamiento	AIB ppm
T0	0
T1	5.000
T2	10.000

T0= Tratamiento testigo    Tn= Tratamientos

### **Tipo de diseño**

En la fase de etiología se utilizó un análisis descriptivo, mediante el programa estadístico SPSS (SPSS Inc, 2011). El modelo matemático fue el siguiente:

$$Y_{ik} = \mu + I_i + B_k + IB_{ik} + \epsilon_{ijk}$$

$Y_{ik}$  = es la ij-ésima observación en el i-ésimo nivel de IBA, y k-ésimo nivel de la Dosis.

$\mu$ = es la media general.

$I_i$ = es el efecto del i-ésimo nivel de IBA.

$B_k$ = es el efecto del k-ésimo nivel de la Dosis.

$IB_{ik}$ = es la interacción del i-ésimo nivel de IBA con el k-ésimo nivel de la Dosis.

$\epsilon_{ijk}$ = es el error aleatorio

### **Características de la UE**

Para la fase de etiolación la cámara oscura constó de divisiones individuales, cada 3 plantas formaron una unidad experimental.

### **Método de Propagación Clonal Mediante Cultivo *In Vitro***

#### **Introducción de brotes**

En la introducción de aguacate mediante cultivo *in vitro*, se realizó la desinfección pre-cámara y en cámara para evitar contaminación; al introducir *in vitro* se probó hormonas como auxinas y gibberelinas para su inducción.

#### **Selección de los explantes y desinfección**

Se tomaron brotes juveniles provenientes de las plantas madres injertadas anticipadamente con Duke 7, que fueron cortados con una tijera de podar previamente desinfectada con alcohol al 70%, se los llevó al laboratorio en un recipiente de cristal.

Una vez transportados se realizó el proceso de desinfección pre cámara que consistió en:

Los brotes fueron colocados en un recipiente de cristal, en el que se adicionaron 3 gotas de jabón líquido con el fin de obtener abundante espuma y se agitó por 15 minutos.

Después se realizó 3 lavados con agua destilada estéril.

Una vez terminado con el lavado anterior se procedió a sumergir a los brotes en la solución de Bostock (funguicida-bactericida) en una dosis de 2.5 ml/l + Rinfapizina (antibacterial) en dosis de 1 ml/l y se puso nuevamente en agitación por 15 minutos.

Se secaron los brotes con un papel toalla y se colocaron en una funda plástica por toda una noche en refrigeración.

En la mañana siguiente en cámara se colocó hipoclorito de sodio al 1% por 5 minutos, después se realizó 5 lavados con agua destilada estéril.

Finalmente se hizo un último lavado con una solución de ácido ascórbico + ácido cítrico 400 ml/l dos veces y los brotes quedaron listos para sembrar.

### **Descripción de hormonas para la inducción de brotes**

Los explantes se dividieron en secciones nodales de 1.5 cm aproximadamente con una o dos yemas laterales, en esta fase se probó la combinación de hormonas: BAP 0 ppm + GA<sub>3</sub> 0.5 ppm, BAP 0.5 ppm + GA<sub>3</sub> ppm, BAP 0.5 ppm + GA<sub>3</sub> 0 ppm, BAP 0 ppm + GA<sub>3</sub> 0 ppm, los tratamientos propuestos se llevaron a cabo en la cámara de flujo laminar en recipientes de vidrio.

### **Medio de cultivo para propagación**

La introducción de los brotes se efectuó en medio Murashige y Skoog (1962) reducido en sus macroelementos a la mitad o un tercio (Pliego y Alfaro, 1988), en el cual se adicionó carbón activado al 1%, sacarosa 30g/l, agar 7g/l con un pH 5.7. Se

realizó un refrescamiento de medio cada 15 días para evitar fenolización de los brotes.

Para la evaluación de la fase de inducción de brotes se consideraron, las siguientes variables:

*Porcentaje de explantes vivos (PEV):* Se determinó el porcentaje de explantes que no se oxidaron y/o contaminaron, con relación al total de unidades experimentales de cada tratamiento. Se observó cada unidad experimental a los 15 de introducidos los brotes.

*Longitud de Brotes en mm (LB):* Se midió a los 30, 45 y 60 días de efectuada la siembra.

*Número de brotes por explante (NBE):* Se contó el número de brotes que cada explante tuvo a los 30, 45 y 60 días de efectuada la siembra.

*Número de hojas (NH):* Se evaluó a partir de los 60 días de la siembra inicial, se realizó un conteo de forma visual en cada unidad experimental.

## Diseño Experimental

### Factores a probar

Para la fase de inducción se probó la mezcla de hormonas como BAP 0 ppm + GA<sub>3</sub> 0.5 ppm, BAP 0.5 ppm + GA<sub>3</sub> 0.5 ppm, BAP 0.5 ppm + GA<sub>3</sub> 0 ppm, BAP 0 ppm + GA<sub>3</sub> 0 ppm, en recipientes de vidrio respectivamente.

### Tratamientos a comprobar

En la fase de inducción se probaron, los siguientes tratamientos (Cuadro 6):

**Cuadro 6. Tratamientos a comprobar**

TRATAMIENTOS	HORMONAS	
	BAP ppm	GA <sub>3</sub> ppm
T0	0	0
T1	0	0.5
T2	0.5	0.5
T3	0.5	0

T0= Tratamiento testigo

Tn= Tratamientos

### Tipo de diseño

Para la fase de cultivo *in vitro* se utilizó un análisis descriptivo mediante el programa estadístico SPSS (SPSS Inc, 2011). cuyo modelo matemático fue:

$$Y_{ijk} = \mu + C_i + G_j + B_k + CG_{ij} + CB_{ik} + GB_{jk} + CGB_{ijk} + \varepsilon_{ijk}$$

$Y_{ijk}$  = es la  $ij$ -ésima observación en el  $i$ -ésimo nivel del Citoquinina,  $j$ -ésimo nivel del Giberelina y  $k$ -ésimo nivel de la Dosis.

$\mu$  = es la media general.

$C_i$  = es el efecto del  $i$ -ésimo nivel de la Citoquinina.

$G_j$  = es el efecto del  $j$ -ésimo nivel de la Giberelina.

$B_k$  = es el efecto del  $k$ -ésimo nivel de la Dosis.

$CG_{ij}$  = es la interacción del  $i$ -ésimo nivel de la Citoquinina con el  $j$ -ésimo nivel de la Giberelina.

$CB_{ik}$  = es la interacción del  $i$ -ésimo nivel de la Citoquinina con el  $k$ -ésimo nivel de la dosis.

$GB_{jk}$  = es la interacción del  $j$ -ésimo nivel de la Giberelina con el  $k$ -ésimo nivel de la Dosis.

$CGB_{ijk}$  = es la interacción entre el  $i$ -ésimo nivel de la Citoquinina el  $j$ -ésimo nivel de la Giberelina y el  $k$ -ésimo nivel de la Dosis.

$\varepsilon_{ijk}$  = es el error aleatorio

### **Características de la UE**

Para la fase de inducción cada unidad experimental estuvo constituida por un tubo de ensayo de vidrio, donde se dispensó 10 ml de medio de cultivo, cada unidad experimental contó con un explante.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### MÉTODO DE PROPAGACIÓN CLONAL MEDIANTE LA ETIOLACIÓN DE BROTES

#### Incremento de Brotes/Planta Debido al Proceso de Etiolación

Veinte y siete plantas de aguacate cultivar Duke 7 fueron evaluadas en el proceso de etiolación. El incremento de los brotes por planta obtuvo una media de 1.4 luego de 15 días (Cuadro 7). Aguilera (2007) menciona que en el cultivar Duke7, se logró una media de 1.2 brotes por planta.

**Cuadro 7. Número de brotes/planta a los 15 días debido al proceso de etiolación**

Variable	N	Mínimo	Máximo	Media
Número de brotes/planta 15 días	27	0	5	1.4

El Cuadro 8 indica que, el 4% de plantas tuvo un incremento de 1 brote, el 7 % tuvo un incremento de 2 brotes, el 11% tuvo un incremento de 3 brotes, el 19 % tuvo un incremento de 1 y 2 brotes. Así pues en la fase de etiolación se obtuvo un 22% de plantas que tuvieron un incremento de 3, 4 y 5 brotes por planta. Aguilera (2007)

reportó un incremento de brotes etiolados de 33% en el cultivar Duke 7 en comparación con el cultivar U-3, que logró un 5%.

**Cuadro 8. Frecuencia del incremento de brotes/planta a los 15 días del proceso de etiolación**

<b>Frecuencia del número de brotes/planta</b>	<b>Plantas</b>	<b>Porcentaje válido</b>
0	11	41
1	5	19
2	5	19
3	2	7
4	3	11
5	1	4
Total	27	100

**Longitud de Brotes/Planta Debido al Proceso de Etiolación**

Se evaluó la longitud de brotes por planta a los 15, 30, 45 y 60 días en el proceso de etiolación, obteniéndose medias de 3, 5, 6 y 6 cm respectivamente, demostrando que los brotes comienzan a estabilizar su tamaño a partir de los 45 días (Cuadro 9).

**Cuadro 9. Desarrollo de la longitud de brotes hasta los 60 días debido al proceso de etiolación**

<b>Variable</b>	<b>N</b>	<b>Mínimo</b>	<b>Máximo</b>	<b>Media</b>
Longitud 15 días	27	0,3	11	3
Longitud 30 días	27	0	20	5
Longitud 45 días	27	0	33	6
Longitud 60 días	27	0	33	6

En el Cuadro 10 se observa que, luego de 60 días del proceso de etiolación se tuvo 12 plantas con una longitud de brote entre 0.2-2.9 cm, 11 plantas con una longitud entre 3-9.5 cm; 2 plantas con una longitud entre 10-15.8 cm y 2 plantas entre 20.8-33.1 cm. La diferencia entre la longitud de brotes puede ser causada por factores externos al momento de seleccionar el material vegetativo para propagar el patrón, tamaño de semilla, estado fenológico del material para injertar. Aguilera (2007) menciona que las plantas madres provenientes de semilla pequeña desarrollan, brotes con una longitud de 6 cm en el cultivar U-3. Otros estudios demuestran que la longitud de brotes etiolados en el cultivar Duke 7 van desde los 7.5 cm hasta los 40 cm (Frolich y Platt, 1971; Bernal, 1997; Hofshi, 1997; Alves de Oliveira et al. 1999; Ernst, 1999).

**Cuadro 10. Frecuencia de la longitud de brotes hasta los 60 días, debido al proceso de etiolación**

Días	Longitud (cm)				Número de plantas
	0.2-2.9 *	3-9.5*	10-15.8*	20.8-33.1*	
15 Días	15	11	1	0	27
30 Días	13	10	3	0	27
45 Días	12	11	2	2	27
60 Días	12	11	2	2	27

\*Escala arbitraria para la agrupación en cm de la longitud del brote

**Formación de Estructuras en los Brotes Después del Proceso de Etiolación**

Esta evaluación se realizó a los 45 días después del proceso de etiolación en brotes de plantas nodrizas. Las estructuras se clasificaron en: raíz, callos ó ninguna estructura. Con la dosis de 10.00 ppm de AIB, se obtuvo 6 brotes con raíz, que representa el 33%, con la dosis de 5.000 ppm de AIB se obtuvo 3 brotes con raíces que representa el 17% (Cuadro 11). Solórzano (2008), obtuvo 53% en formación de raíces con la dosis 10,000 ppm de AIB, mientras que obtuvo el 30 % de raíces con 5.000 ppm de AIB. Los dos tratamientos también promovieron la formación de callos, que estuvieron presentes en la mayoría de brotes que no formaron raíces. Con el tratamiento de 5.000 ppm de AIB se formó 7 brotes con callos que representa un porcentaje de 39% en comparación de la dosis de 10.000 ppm de IBA que presentó 5

brotos con un porcentaje de 28%. Solórzano (2008), obtuvo un porcentaje de callos del 37 % con 5.000 ppm de AIB, mientras que logró el 33% de callos con 10.000 ppm. El tratamiento testigo en ningún caso mostró formación de estructuras.

**Cuadro 11. Porcentaje de brotes desetiados sobre plantas nodrizas con estructuras formadas por los tratamientos, 45 días después de su aplicación**

Tratamientos *	Brotos/planta con formación de estructuras			Estructuras Brotos/planta	Porcentaje válido a los 45 días			
	Raíz	Callos	N. estructura					
T1	3	7	8	18	17	39	44	100
T2	6	5	7	18	33	28	39	100
T0	0	0	100	0	0	0	100	100
Total				36				100

\*T1: 5.000 ppm AIB

T2: 10.000 ppm AIB

T0: 0 ppm AIB

**MÉTODO DE PROPAGACIÓN CLONAL MEDIANTE CULTIVO *IN VITRO***

**Porcentaje de Contaminación**

Como se puede apreciar en el Cuadro 12 el porcentaje de contaminación fue alto en todos los tratamientos, teniendo el 50% para los tratamientos: T1, T3, T4 y el 59% en el tratamiento T2. Dalso y Guevara (1989), mencionan que en el caso de las microestacas el porcentaje de contaminación por bacterias y hongos es alto, siendo el principal obstáculo para su establecimiento *in vitro*.

**Cuadro 12. Porcentaje de contaminación en el proceso *in vitro* a los 15 días.**

<b>Tratamiento</b>	<b>Combinación de hormonas</b>	<b>Plantas contaminadas</b>	<b>% contaminación</b>
T1	BAP 0+0.5 GA <sub>3</sub>	6	50
T2	BAP 0.5+0.5 GA <sub>3</sub>	7	59
T3	BAP 0.5+0 GA <sub>3</sub>	6	50
T4	BAP 0+0 GA <sub>3</sub>	6	50

**Longitud de Brotes en el Proceso *In Vitro***

Se evaluó la longitud de los brotes de veinte y dos plantas, clasificándose en los siguientes tratamientos: T1 con 6 plantas, T2 con 5 plantas, T3 con 6 plantas y T4 con 5 plantas. Se consideró su tamaño a los 30, 45 y 60 días en el proceso *in vitro* obteniéndose medias de 0.6, 0.2, 0.4 y 0.1 mm respectivamente, demostrando que el mejor tratamiento fue T1 (Cuadro 13).

**Cuadro 13. Promedio longitud de brotes hasta los 60 días en el proceso *in vitro***

Días	Tratamientos			
	T1(BAP 0 + 0.5 GA <sub>3</sub> )*	T2(BAP 0.5 + 0.5 GA <sub>3</sub> )*	T3 (BAP 0.5 + 0 GA <sub>3</sub> )*	T4(BAP 0 + 0 GA <sub>3</sub> )*
30 Días	<b>0.3</b>	0.1	0.2	0.1
45 Días	<b>0.4</b>	0.2	0.3	0.1
60 Días	<b>0.6</b>	0.2	0.4	0.1

\*Combinación de hormonas para la longitud de brotes

En el cuadro 14, a los 30 días se aprecia que en el tratamiento T1 los brotes se distribuyen de manera uniforme entre 0.1 y 0.5 mm. En los 45 días el tratamiento T1 tienden aumentar su tamaño, ubicándose entre 0.5-0.7 y finalmente a los 60 días en el tratamiento T1 los brotes se van ubicando entre longitudes de 0.7-1 mm, manifestando que este tratamiento influye eficiente en el alargamiento de los explantes.

**Cuadro 14. Frecuencia de longitud de brotes hasta los 60 días en el proceso *in vitro***

Días	Longitud de brotes (mm)	Tratamientos			
		T1(BAP 0+0.5 GA <sub>3</sub> )*	T2(BAP 0.5 + 0.5GA <sub>3</sub> )*	T3(BAP 0.5 + 0 GA <sub>3</sub> )*	T4(BAP 0 + 0 GA <sub>3</sub> )*
30 Días	0.1 – 0.3	3	5	5	5
	0.3-0.5	3	0	1	0
	<b>Total</b>	<b>6</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>5</b>
45 Días	0.1 – 0.3	1	5	4	5
	0.3 – 0.5	3	0	1	0
	0.5 – 0.7	2	0	1	0
	<b>Total</b>	<b>6</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>5</b>
60 Días	0.1 – 0.3	1	4	4	5
	0.3 – 0.5	2	1	1	0
	0.7 – 1	3	0	1	0
	<b>Total</b>	<b>6</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>5</b>

\*Combinación de hormonas para la longitud de brotes

### Número Brotes en el Proceso *In Vitro*

Se evaluó el número de brotes en los tratamientos. T1, T2, T3 y T4, obteniéndose medias de 2, 1.6, 1.8 y 1.4 brotes por tratamiento, respectivamente. Dando como mejor tratamiento a T1 (Cuadro 15). Samayoa (2005) menciona que la combinación

BAP 0 + 0.5 GA<sub>3</sub>, promueve de manera más eficiente la brotación de las yemas de aguacate *P. americana* cultivar Hass.

**Cuadro 15. Promedio del número de brotes/planta hasta los 60 días en el proceso *in vitro***

Días	Tratamientos			
	T1(BAP 0 + 0.5 GA <sub>3</sub> )*	T2(BAP 0.5 + 0.5 GA <sub>3</sub> )*	T3(BAP 0.5 + 0 GA <sub>3</sub> )*	T4(BAP 0 + 0 GA <sub>3</sub> )*
30 Días	2	1.6	1.8	1.4
45 Días	2	1.6	1.8	1.4
60 Días	2	1.6	1.8	1.4

\*Combinación de hormonas para el número de brotes por planta

En el (Cuadro 16) se puede apreciar que el número de brotes por planta en todos los tratamientos se estabiliza a partir de los 45 días, teniendo como mejor tratamiento T1 con 6 brotes distribuidos: 2 brotes en 5 plantas y 3 brotes en 1 planta. El tratamiento testigo no tuvo presencia de brote alguno.

**Cuadro 16. Frecuencia de número de brotes/planta hasta los 60 días en el proceso *in vitro***

Días	Número de brotes	Tratamientos			
		T1(BAP 0+0.5 GA3)*	T2(BAP 0.5 + 0.5GA3)*	T3(BAP 0.5 + 0 GA3)*	T4(BAP 0 + 0 GA3)*
30 Días	1	<b>0</b>	1	1	3
	2	<b>5</b>	3	5	2
	3	<b>1</b>	1	0	0
	<b>Total</b>	<b>6</b>	5	6	5
45 Días	1	<b>0</b>	2	2	3
	2	<b>5</b>	3	3	2
	3	<b>1</b>	0	1	0
	<b>Total</b>	<b>6</b>	5	6	5
60 Días	1	<b>0</b>	2	2	3
	2	<b>5</b>	3	3	2
	3	<b>1</b>	0	1	0
	<b>Total</b>	<b>6</b>	5	6	5

\* Combinación de hormonas para el número de brotes por planta

### Número de Hojas en el Proceso *In Vitro*

Se contabilizó el número de plantas que presentaron hojas por cada tratamiento (Cuadro 17), y se obtuvo como mejor tratamiento a la combinación BAP 0 + 0.5 GA<sub>3</sub>, logrando 6 plantas con formación de hojas, las mismas que se detallan: 2

plantas con 1 hoja, 1 planta con 2 hojas y 3 plantas con 3 hojas. Samayoa (2005) indica que el tratamiento BAP 0 + 0.5 GA<sub>3</sub> fue el mejor, pues genero mayor número de hojas por planta.

**Cuadro 17. Número de plantas que presentaron hojas a los 60 días.**

Numero de hojas	Tratamientos			
	T1(BAP 0+0.5 GA3)*	T2(BAP 0.5 + 0.5GA3)*	T3(BAP 0.5 + 0 GA3)*	T4(BAP 0 + 0 GA3)*
1	2	1	0	0
2	1	0	1	0
3	3	1	0	0
4	0	0	1	0
6	0	0	1	0
Total	6	2	3	0

\*Combinación de hormonas para el número total de plantas con hojas

En el Cuadro 18 se observó que el tratamiento T1 generó la formación de 13 hojas, dejando en claro que fue el mejor para todas las variables.

**Cuadro 18. Número total de hojas por tratamiento en el proceso *in vitro***

<b>Tratamiento</b>	<b>Combinación de reguladores mg/l</b>	<b>Número de hojas</b>
1	<b>T1(BAP 0+ 0.5 GA<sub>3</sub>)</b>	<b>13</b>
2	T2 (BAP 0.5 + 0.5 GA <sub>3</sub> )	4
3	T3 (BAP 0.5 + 0 GA <sub>3</sub> )	12
4	T4 (BAP 0 + 0 GA <sub>3</sub> )	0

## CONCLUSIONES

- El proceso de etiolación registró un incremento de 1.4 brotes por planta.
- El proceso de etiolación llega a tener estabilidad en la longitud de sus brotes etiolados a los 45 días, con una media de 6 cm.
- El tratamiento 10.000 ppm de AIB, en brotes etiolados tuvo como resultado 6 brotes con formación de raíces que representó el 33%.
- El tratamiento de BAP 0 mg /l + 0.5 mg/l GA<sub>3</sub>, en la longitud de brotes a los 60 días tuvo una media de 0.6 mm; en cuanto a número de brotes logró una media de 2 brotes por planta y finalmente con este tratamiento se obtuvo 6 plantas con la formación de 13 hojas.
- Se tuvo un alto porcentaje de contaminación que pudo deberse a la presencia de hongos y bacterias en los explantes dificultando así su propagación.

## RECOMENDACIONES

- Se recomienda utilizar 10.000 ppm de AIB para la formación de raíces en brotes etiolados de *P americana* Mill, ya que presentó los mejores resultados.
- Se recomienda utilizar 0.5 ppm de GA<sub>3</sub> para la formación de brotes, longitud y formación de hojas para la inducción *in vitro* de *P americana* Mill. ya que se logra óptimos resultados.
- Se debería realizar estudios sobre el origen de las plantas nodrizas que entran al proceso de etiolación refiriéndose al tamaño de semilla que provienen, estado fenológico y tiempo adecuado del material que va a ser injertado en dichas plantas, ya que otros estudios revelan que estas características influyen directamente sobre el tamaño de los brotes etiolados.
- Los brotes que formaron callos y raíces, podrían ser colocados en sustrato para completar el proceso de enraizamiento y posterior venta.
- Para el éxito del sistema de propagación por etiolación, se requiere de un ambiente con temperatura y humedad estable.
- Se debe probar diferentes combinación de antioxidantes que ayuden a evitar la fenoización de los brotes en el proceso *in vitro*.
- Evaluar en investigaciones futuras el medio de cultivo N45K, ya que estudios anteriores indican su eficacia para la formación de brotes y hojas.
- Realizar estudios de propagación clonal para distintos cultivares de aguacate, resistentes a la pudrición de raíz.

**RESUMEN**

El presente estudio se realizó con el objetivo de establecer la propagación clonal de aguacate Duke 7 (*Persea americana* Mill.) para la producción masiva de plantas mediante la técnica de etiolación de brotes o cultivo *in vitro*. Con el método de propagación clonal mediante la etiolación de brotes se obtuvo un incremento promedio de 1.4 brotes por planta en los primeros 15 días debido al proceso de etiolación, del número total de individuos el 22% de plantas presentaron de 3 a 5 brotes. La longitud de brotes etiolados se estabiliza a partir de los 45 días con un tamaño de 6 cm; logrando 11 plantas con una longitud entre 3-9.5 cm; 2 plantas con una longitud entre 10 –15.8 cm y 2 plantas entre 20.8-33.1 cm. Para la formación de estructuras el AIB (10.000 ppm) logró 6 brotes con raíces que representó el 33%.

En el método de propagación clonal *in vitro* el uso de la combinación de hormonas BAP 0 + 0.5 GA<sub>3</sub> logró los valores más altos en la evaluación a los 60 días, la longitud de brotes obtuvo un tamaño promedio de 0.6 mm, la misma combinación logró formar 2 brotes por planta y desarrolló 6 plantas con hojas., 2 plantas desarrollaron 1 hoja, 1 planta desarrollo 2 hojas y 3 plantas desarrollaron 3 hojas.

**ABSTRACT**

The present study pursued the mass production of avocado Duke 7 (*Persea americana* Mill.) through clonal propagation using shoot etiolation and *in vitro* culture technics. With the etiolation method a growth average of 1.4 shoots per plant was obtained within the first 15 days, 22% of the evaluated plants presented 3 to 5 shoots. The length of the etiolated shoots becomes stable after 45 days with 6 cm long; 11 plants with a length between 3 to 9.5 cm, 2 plants with a length between 10 to 15.8 cm and 2 plants between 20.8 to 33.1 cm. Developing structures the AIB (10,000 ppm) achieve 6 shoots with roots, representing the 33%.

For the *in vitro* method the combination of hormones BAP 0 + 0.5 GA<sub>3</sub> achieved the highest values in the evaluation at 60 days, the average length of shoot was 0.6 mm, the same combination was able to form 2 shoots per plant and 6 plants developed leaves; 2 plants developed 1 leaf, 1 plant developed 2 leafs and 3 plants developed 3 leafs.

**BIBLIOGRAFIA**

Aguilera, M. 2007. Propagación de patrones de palto mediante acodo aéreo y esqueje. Memoria de título. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Agronómicas, Escuela de Agronomía. 16 p.

Barrientos, P. 1986. Rooting of avocado cuttings (*Perseaamericana* Mill.) cvs. Fuerte and Colin V-33. California Avocado Society Yearbook. 70: 157-163.

Bassuk, N; Maynard, B. 1987. Stock Plant Etiolation Improved Rooting of Cuttings. Department Of Floriculture and Ornamental Horticulture. (en línea). USA. Consultado 3 agost. 2010. Disponible en [https://www.hort.cornell.edu/UHI/.../HortSci%2022\(5\).pdf](https://www.hort.cornell.edu/UHI/.../HortSci%2022(5).pdf)

Benacchio, S. 1982. Some demands agroecológicas in 58 cultivation species with production potential in the American Tropic. Venezuela. 202 p.

Ben-ja'acov, A; Michelson, L. 2002. Portainjertos de palto. Horticultural reviews. (en línea). Consultado 26 agost. 2010. Disponible en [https://docs.google.com/viewer?url=http://209.143.152.63/Journals/HorticulturalReviews/HortRev\\_1995\\_PG\\_381-429.pdf](https://docs.google.com/viewer?url=http://209.143.152.63/Journals/HorticulturalReviews/HortRev_1995_PG_381-429.pdf)

Biasi, L., Koller, C. 1993. Propagación clonal de Aguacatero cv. Ouro Verde através de ramos etiolados. Revista Brasileira de Fruticultura 15(3): 95-102.

Brokaw, W. 1987. Avocado clonal rootstock propagation. Combined Proceedings International Plant Propagator Societ. (en línea). Consultado 24 jul. 2010. Disponible en

[https://docs.google.com/viewer?url=http://www.avocadosource.com/WAC5/Papers/WAC5\\_p409.pdf](https://docs.google.com/viewer?url=http://www.avocadosource.com/WAC5/Papers/WAC5_p409.pdf)

Calabrese, F. 1992. El aguacate. Ediciones Mundi Prensa. Madrid, España. pp. 160-165

Cañizares, L. 1973. Los Aguacateros. Editorial Pueblo y Educación. Inst. Cubano del Libro. La Habana-Cuba. 282 p.

Castro, M; Fassio, C; Darrouy, N. 2002. Situación nacional de portainjertos de palto y su relación con factores de productividad y precocidad. Universidad Católica de Valparaíso. Facultad de Agronomía. FONDEF. Seminario Internacional: "Selección y uso de portainjertos y nuevas variedades de Palto" (en línea). Chile. Consultado 5 agost. 2010. Disponible en <http://www.horticom.com/pd/imagenes/70/080/70080.pdf>

Cutting, M; Van Vuuren, S. 1988. Rooting leafy non-etiolated avocado cuttings from gibberellin-injected trees. Scientia Horticulturae. (en línea). USA. Consultado 3 agost. 2010. Disponible en

[https://www.hort.cornell.edu/UHI/.../HortSci%2022\(5\).pdf](https://www.hort.cornell.edu/UHI/.../HortSci%2022(5).pdf)

Da Costa, JR;Scarpore Filho, J; Costa Bastos, D.2003. Etiolamento de planta matriz y uso de ácido indolbutírico en enraizamiento de estacas. Rev. Bras. Frutic., Jaboticabal – SP 25(2): 301-304.

Dalsaso, L. y Guevara, E; 1989. Multiplicación clonal *in vitro* del aguacate (*Persea americana*) cv. Fuerte.Agronomía-Costarricense 13:61-71.

Ernst, A.1999. Micro Cloning: A Multiple Cloning Technique for Avocados Using Micro Containers. Revista Chapingo Serie Horticultura. (en línea). South Africa. Consultado 12 agost .2010. Disponible en [https://www.avocadosource.com/WAC4/WAC4\\_p217.pdf](https://www.avocadosource.com/WAC4/WAC4_p217.pdf)

Eggers, E. y Halma, F. 1937. Rooting avocado cuttings.Calif. Avocado Assoc.(en línea). USA. Consultado el 4 agost.2010.Disponible en [https://www.avocadosource.com/.../CAS\\_1951\\_PG\\_136-138.pdf](https://www.avocadosource.com/.../CAS_1951_PG_136-138.pdf)

Frolich, F. 1951. Rooting guatemalan avocado cuttings. California Avocado Soc. (en línea). USA. Consultado el 23 de agost.2010.Disponible en [https://docs.google.com/viewer?url=http://www.avocadosource.com/CAS\\_Yearbooks/CAS\\_22\\_1937/CAS\\_1937\\_PG\\_121-125.pdf](https://docs.google.com/viewer?url=http://www.avocadosource.com/CAS_Yearbooks/CAS_22_1937/CAS_1937_PG_121-125.pdf)

Frolich, F; and Plat, R.. 1971-1972. Use of the etiolation technique in rooting avocado cuttings. California Avocado Society. (en línea).USA. Consultado el 8 agost.2010.Disponible en

<https://www.allesbeste.com/.../MICRO%20CLONING%20-%20KLEUR%20FIG.pdf>

Hartmann, H; Kester, F; and Geneve; R. 1988. Bases Anatómicas y fisiológicas de la propagación por estacas. In: Propagación de plantas: principios y prácticas. 6th ed. Prentice Hall, New Jersey. pp. 255-318.

Haas, A. and J. N. Brusca. 1953. Zutano avocado cuttings rooted. Calif. Agric. (en línea). USA. Consultado el 15 de sep. 2010. Disponible en

[https://www.avocadosource.com/CAS.../CAS\\_1937\\_PG\\_126-130.pdf](https://www.avocadosource.com/CAS.../CAS_1937_PG_126-130.pdf)

Gafni, E. 1984. Effect of extreme temperature regimes and different pollenizers on the fertilization and fruit-set processes in avocado. Faculty of agro. Univ. of Jerusalém. (en línea). Israel. Consultado 22 sept. 2010. Disponible en

[http://www.avocadosource.com/papers/Israeli\\_Papers/Gafni\\_1984.htm](http://www.avocadosource.com/papers/Israeli_Papers/Gafni_1984.htm)

Gallo D; O. Nakano; Silveira, S; Carvalho, L.; Batista, E; Bertifilho, J. 1988. Manual de Entomología Agrícola. Editora Agronómica Ceres, São Paulo, 649 pp.

Goh, D; Monteuis, A. 2002. Vegetative propagation of Teak. (en línea). Consultado el 21 de sep. 2010. Disponible en

<http://www.itto.or.jp/newsletter/v7n2/13vegetative.html>

Guitierrez, D. 2009. Estudio de la diversidad genética del Aguacate nativo en Nuevo León. México. Rev. Fitotec. Mex. 32:9-18

Hill, J. 1988. An agrometeorological model for assessing the effect of head stress during the flowering and early fruit set on avocado yields. J. Amer.Soc. Hort. Sci 113(1)172-176

Hofshi, R. 1997. A vision for the future avocado industry. Subtropical Fruit News. (en línea). USA. Consultado 16 de sep. 2010. Disponible en <https://www.avocadosource.com/.../hofshi%20for%20avo%20people/hofshi.htm> –pdf

Lovatt, C. 1999. Factors affecting fruit set early fruit drop in avocado. California Avocado Assoc. (en línea). USA. Consultado 26 sept. 2010. Disponible en [https://docs.google.com/viewer?url=http://www.avocadosource.com/CAS\\_Yearbooks/CAS\\_74\\_1990/CAS\\_1990\\_PG\\_193-199.pdf](https://docs.google.com/viewer?url=http://www.avocadosource.com/CAS_Yearbooks/CAS_74_1990/CAS_1990_PG_193-199.pdf)

Menge, T. 1992. Mycorrhizal Inoculation Enhances Growth and Development of Micropropagated Plants of Avocado. Departamento de Microbiología. ( en línea). España. Consultado 21 oct. 2010. Disponible en [https://docs.google.com/viewer?url=http://www.avocadosource.com/Journals/HortScience/HortSci\\_1992\\_27\\_PG\\_785-787.pdf](https://docs.google.com/viewer?url=http://www.avocadosource.com/Journals/HortScience/HortSci_1992_27_PG_785-787.pdf)

Minas K, P. 1976. Some aspects of the flower behavior, pollination and fruit set of avocado (*Persea americana*). California Avocado Society Yearbook. p. 106-153. (en línea ) USA. Consultado 3 sep. Disponible en

[http://www.google.com.ec/#sclient=psy&hl=es&source=hp&q=Metabolibia+singulata+&psj=1&oq=Metabolibia+singulata+&aq=f&aqi=&aql=&gs\\_sm=s&gs\\_upl=5354015657210158752111101010114111141117-11110&fp=6ad0734e0297da47&biw=1280&bih=699](http://www.google.com.ec/#sclient=psy&hl=es&source=hp&q=Metabolibia+singulata+&psj=1&oq=Metabolibia+singulata+&aq=f&aqi=&aql=&gs_sm=s&gs_upl=5354015657210158752111101010114111141117-11110&fp=6ad0734e0297da47&biw=1280&bih=699)

Moll, N; and WOOD, R. 1980. An efficient method for producing rooted avocado cuttings. *Subtropica* 1(11): 9-12

Murashige, T; Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and biossayswith tobacco tissue cultures *physiology plant* 15: 473-497

Popenoe, J.1963. THE RUEHLE AVOCADO. Fla. Agr. Expt. Sta. Cir. S-144, 4 pp

Purseglove, JW. 1979. *Tropical crops dicotyledons*. London, England, Loongman. p. 192- 198. (en línea) USA. Consultado 5 jul 2010. Disponible en

[http://www.google.com.ec/#sclient=psy&hl=es&source=hp&q=Metabolibia+singulata+&psj=1&oq=Metabolibia+singulata+&aq=f&aqi=&aql=&gs\\_sm=s&gs\\_upl=5354015657210158752111101010114111141117-11110&fp=6ad0734e0297da47&biw=1280&bih=699](http://www.google.com.ec/#sclient=psy&hl=es&source=hp&q=Metabolibia+singulata+&psj=1&oq=Metabolibia+singulata+&aq=f&aqi=&aql=&gs_sm=s&gs_upl=5354015657210158752111101010114111141117-11110&fp=6ad0734e0297da47&biw=1280&bih=699)

Pliego, F; Barceló, A y Lópezencina, C. 1990. Micropropagación de especies subtropicales. *Hortofruticultura* 8: 47-50.

Ruiz, D. 1996. Forma de preparación de medios de cultivo Murashige & Skoog. San Pedro Sula, Honduras, Fondo Hondureño de Investigación Agrícola. 25 p (en línea) Honduras. Consultado 1 jun 2010. Disponible en

[http://www.google.com.ec/#sclient=psy&hl=es&source=hp&q=Metabolibia+singulata+&psj=1&oq=Metabolibia+singulata+&aq=f&aqi=&aql=&gs\\_sm=s&gs\\_upl=5354015657210158752111101010114111141117-11110&fp=6ad0734e0297da47&biw=1280&bih=699](http://www.google.com.ec/#sclient=psy&hl=es&source=hp&q=Metabolibia+singulata+&psj=1&oq=Metabolibia+singulata+&aq=f&aqi=&aql=&gs_sm=s&gs_upl=5354015657210158752111101010114111141117-11110&fp=6ad0734e0297da47&biw=1280&bih=699)

Rodolfo, B; Muñoz, P; Castellano, R.1997. Trial about of clonal propagation for the avocado rootstocks (en línea).Citamex, S. Coatepec Harinas, Mex. Consultado 23 jul. 2010. Disponible en

[http://www.avocadosource.com/Journals/CICTAMEX/CICTAMEX\\_1997/fit\\_3\\_97.pdf](http://www.avocadosource.com/Journals/CICTAMEX/CICTAMEX_1997/fit_3_97.pdf)

Rodríguez, A. 2003. Implementación de las técnicas de etiolación y acodo y microclonación en paltos (*Persea americana* Mill). Tesis Ing. Agr. Quillota, Pontificia Universidad Católica de Valparaíso. Escuela de Agronomía. 66p.

Salazar G., and Borys, W. 1983. Clonal propagation of the avocado through “franqueamiento”. California Avocado Soc. Yrbk. 67: 69-72.

Suárez, P.2005. Mejoramiento del Aguacate en el siglo XXI. Congreso Latinoamericano del Aguacate. Univ. Córdoba. (en línea). Colombia. Consultado 22 de agost.2010. Disponible en

<https://docs.google.com/viewer?url=http://corpoaguacate.com/pdf/conferencias/pdf/Mejoramiento%2520de%2520aguacate%2520en%2520el%2520siglo%2520XXI.pdf>

Sanginés, L.2008. Aguacates en alimentación humana y animal.Instituto Nacional de Nutrición “Salvador zubirán”. (en línea). México.Consultado 19 jul.2010. Disponible en

<https://docs.google.com/viewer?url=http://pigtrop.cirad.fr/content/download/6622/39005/file/153%252002artLSangines.pdf>

Smith C.E. Jr 1966.Archeological evidence for selection in avocado. Economic Botany 20: 169-175. Consultado 6 jul 2010.Disponible en

[http://www.google.com.ec/#sclient=psy&hl=es&source=hp&q=Metabolibia+singulata+&psj=1&oq=Metabolibia+singulata+&aq=f&aqi=&aql=&gs\\_sm=s&gs\\_upl=535401565721015875211110101010114111141117-11110&fp=6ad0734e0297da47&biw=1280&bih=699](http://www.google.com.ec/#sclient=psy&hl=es&source=hp&q=Metabolibia+singulata+&psj=1&oq=Metabolibia+singulata+&aq=f&aqi=&aql=&gs_sm=s&gs_upl=535401565721015875211110101010114111141117-11110&fp=6ad0734e0297da47&biw=1280&bih=699)

Storey, W; Bergh, B; Zentmyer; G, 1986.The origin, indigenous range, and dissemination of the avocado.Calif Avocado Soc.(en línea).USA. consultado 10 oct.2010. Disponible en

[https://docs.google.com/viewer?url=http://www.avocadosource.com/CAS\\_Yearbooks/CAS\\_70\\_1986/CAS\\_1986\\_PG\\_127-133.pdf](https://docs.google.com/viewer?url=http://www.avocadosource.com/CAS_Yearbooks/CAS_70_1986/CAS_1986_PG_127-133.pdf)

Swingle, W; Robinson, T. 1924.The solar propagation frame for rooting citrus and subtropical plants. USDA Circ. 310. 1-3

Taiz, L; Zeigler, L. (1998). Plant Physiology. Sinauer Associates, Inc., Publishers. USA. pp:1-792.

Valencia, G. 1912. Cultivo y Explotación del Aguacate. Boletín Número 71 de la Estación Agrícola Central. (en línea). México. Consultado 13 oct. 2010. Disponible en [https://docs.google.com/viewer?url=http://www.avocadosource.com/books/Valencia/Cultivo\\_Valencia\\_1912\\_71\\_PG\\_3-70.pdf](https://docs.google.com/viewer?url=http://www.avocadosource.com/books/Valencia/Cultivo_Valencia_1912_71_PG_3-70.pdf)

Veierskov, B. 1988. Relations between carbohydrates and root formation. In: Adventitious root formation in cuttings, T.D. Davis, B.E. Haissig, and N. Sankhla, (eds.). Dioscorides Press, Portland, Oregon.

Wessels, H. 1996. *In vitro* clonal propagation of avocado rootstocks. South Africa Avocado Growers Assoc. (en línea). South Africa. Consultado el 10 de agosto. 2010. Disponible en [https://docs.google.com/viewer?url=http://www.avocadosource.com/Journals/SAAGA/A/SAAGA\\_1996/SAAGA\\_1996\\_PG\\_59-60.pdf](https://docs.google.com/viewer?url=http://www.avocadosource.com/Journals/SAAGA/A/SAAGA_1996/SAAGA_1996_PG_59-60.pdf)

Williams L, 1976. The botany of the avocado and its relatives. Proceedings of the First International Tropical Fruit Short Course. The Avocado. (en línea). USA. Consultado en 30 oct. 2010. Disponible en [https://docs.google.com/viewer?url=http://www.avocadosource.com/journals/itfsc/proc\\_1976\\_pg\\_9-15.pdf](https://docs.google.com/viewer?url=http://www.avocadosource.com/journals/itfsc/proc_1976_pg_9-15.pdf)

Winston, A.1987. Requirements for Improved Fruiting Efficiency in the Avocado Tree. Department of Horticultural Science, University of Natal, Pietermaritzbu.(en línea).South Africa. Consultado 28 oct.2010. Disponible en [http://www.avocadosource.com/WAC2/WAC2\\_p161.htm](http://www.avocadosource.com/WAC2/WAC2_p161.htm)

Willingham, S.; Pegg, K.; Coates, L.; Cooke, A.; Dean, J.; Langdon, W.; Beasley, D. 2001. Field management of avocado postharvest diseases. *Acta Horticulturae* 553: 435-438.

Zentmyer, G. A. 1980. *Phytophthoracinnamomi* and the diseases it causes. Monograph No.10. Amer. Phytopath.Soc. 96p.