

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SANTA

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA PROFESIONAL DE BIOTECNOLOGÍA



**INDUCCIÓN DE BROTES *IN VITRO* DE PALTO (*Persea americana*
Var. Hass) UTILIZANDO COMBINACIONES DE
BENCILAMINOPURINA Y ÁCIDO GIBERÉLICO.**

**TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE
LICENCIADO EN BIOTECNOLOGÍA**

PRESENTADO POR:

Bach. KAREN JUDITZA VÁSQUEZ MELÉNDEZ

Bach. ELIZABETH STEFANNY CHIRINOS GUEVARA

ASESOR:

Mblgo. ALVA MUÑOZ ETERIO

NUEVO CHIMBOTE – PERÚ

2019

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SANTA

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA PROFESIONAL DE BIOTECNOLOGÍA



**INDUCCIÓN DE BROTES *IN VITRO* DE PALTO (*Persea americana*
Var. Hass) UTILIZANDO COMBINACIONES DE
BENCILAMINOPURINA Y ÁCIDO GIBERÉLICO.**

**TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE
LICENCIADO EN BIOTECNOLOGÍA**

AUTORES:

Bach. KAREN JUDITZA VÁSQUEZ MELÉNDEZ

Bach. ELIZABETH STEFANNY CHIRINOS GUEVARA

Revisado y Aprobado por el Asesor

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Alva Muñoz Eterio', is positioned above a horizontal line.

Blgo Mblgo. ALVA MUÑOZ ETERIO

ASESOR

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SANTA
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA PROFESIONAL DE BIOTECNOLOGÍA



**INDUCCIÓN DE BROTES *IN VITRO* DE PALTO (*Persea americana*
Var. Hass) UTILIZANDO COMBINACIONES DE
BENCILAMINOPURINA Y ÁCIDO GIBERÉLICO.**

**TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE
LICENCIADO EN BIOTECNOLOGÍA**

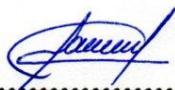
AUTORES:

Bach. KAREN JUDITZA VÁSQUEZ MELÉNDEZ
Bach. ELIZABETH STEFANNY CHIRINOS GUEVARA

APROBADO POR EL JURADO CALIFICADOR INTEGRADO POR LOS
SEÑORES MIEMBROS


.....
DR. JULIO CHICO RUIZ
PRESIDENTE


.....
Blgo. Mblgo. ETERIO ALVA MUÑOZ
INTEGRANTE


.....
Blgo. Mblgo. JOSE VILLANUEVA CARLOS
INTEGRANTE

ACTA DE CALIFICACIÓN DE LA SUTENTACIÓN DE LA TESIS

En el Distrito de Nuevo Chimbote, en la Universidad Nacional de Santa, en el Salon A-3 pasel A siendo las 11 horas del día 11 de Octubre de 2019 dando cumplimiento a la Resolución N° 191-2019-ONS-FC se reunió el Jurado Evaluador presidido por Julio CHICO RUIZ teniendo como miembros a Eterio ALVA MUÑOZ (secretario) (a), y Jose VILLARUEVA CARLOS (integrante), para la sustentación de tesis a fin de optar el título de Biotecnólogo realizado por el, (la), (los) tesista (as) Karen Juditha VASQUEZ MELENDEZ Elizabeth Stefanny CHIRINOS GUEVARA

..... quien (es) sustentó (aron) la tesis intitulada: Inducción de brotes in vitro de "Patte" (Persea americana var. Hass) utilizando combinaciones de benzilamino purina y ácido giberelico

Terminada la sustentación, el (la), (los) tesista (as)s respondió (ieron) a las preguntas formuladas por los miembros del jurado.

El Jurado después de deliberar sobre aspectos relacionados con el trabajo, contenido y sustentación del mismo y con las sugerencias pertinentes, declara la sustentación como Muy bueno asignándole un calificativo de Diecisiete puntos, según artículo 103° del Reglamento General de Grados y Títulos de la Universidad Nacional del Santa, vigente (Resolución N° 492-2017-CU-R-UNS)

Siendo las 12 horas del mismo día se dio por terminado el acto de sustentación firmando los miembros del Jurado en señal de conformidad

Nombre:

Presidente

Nombre:

Secretario

Nombre:

Integrante

Distribución: Integrantes J.E (), tesistas () y archivo (02).



ACTA DE LEVANTAMIENTO DE OBSERVACIONES POSTERIOR A LA
SUSTENTACIÓN DE LA TESIS Y CERTIFICACIÓN

En el Distrito de Nuevo Chimbote, en la Universidad Nacional de Santa, en el
Sala A-3 pasel A....., dando cumplimiento a la
Resolución N° 191-2019-UNS-FC., siendo las 11..... horas del día 14 octubre
se reunió el Jurado Evaluador presidido por Julio CHICO RUIZ
teniendo como miembros a Eterio ALVA MUÑOZ
(secretario) (a) y Jose VILLANUEVA CARLOS (integrante), para el
levantamiento de observaciones posterior a la sustentación de tesis, presentada por (el), (la),
(los) tesisistas Karen Juditha VASQUEZ MELENDEZ
Elizabeth Stefanny CHIRINOS GUEVARA
quien (es) expuso (ieron) el trabajo intitulado: Inducción de brotes in
vitró de "Palto" (Persea americana var. Hass.)
utilizando combinaciones de benzilaminopurina
y ácido giberélico

Terminada la revisión se observa que (el), (la), (los) tesisistas han cumplido con levantar las
observaciones, por tanto se CERTIFICA LA APROBACIÓN DE LA TESIS EN MENCIÓN.

Siendo las 12:00..... horas del mismo día se dio por terminado el acto firmando los
miembros del Jurado en señal de conformidad.

Nombre: Julio Chico Ruiz
Presidente

Nombre: Eterio ALVA MUÑOZ
Secretario

Nombre: Bgo Abgo Jose Villanueva Carlo
Integrante

Distribución: Integrantes J.E (03), tesisistas() y archivo FC (02).





Recibo digital

Este recibo confirma que su trabajo ha sido recibido por Turnitin. A continuación podrá ver la información del recibo con respecto a su entrega.

La primera página de tus entregas se muestra abajo.

Autor de la entrega: Karen Juditza Vásquez Meléndez E...
Título del ejercicio: BIOTECNOLOGÍA
Título de la entrega: INDUCCIÓN DE BROTES IN VITRO..
Nombre del archivo: CHIRINOS_VASQUEZ_TESIS_FINA..
Tamaño del archivo: 5.24M
Total páginas: 79
Total de palabras: 14,473
Total de caracteres: 72,341
Fecha de entrega: 21-oct-2019 10:22a.m. (UTC-0500)
Identificador de la entrega: 1197286330

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SANTA
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA PROFESIONAL DE BIOTECNOLOGÍA



INDUCCIÓN DE BROTES *IN VITRO* DE PALTO (*Pisca americana*
Vit. Hass) UTILIZANDO COMBINACIONES DE
BENCILAMINOPURINA Y ÁCIDO GIBERÉLICO.

TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE
LICENCIADO EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTADO POR:

Bach. KAREN JUDITZA VÁSQUEZ MELÉNDEZ
Bach. ELIZABETH STEFANNY CHIRINOS GUEVARA

ASESOR:

Mgto. ALVA MUÑOZ FTERIO

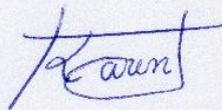
NUEVO CRIMBOTE - PERÚ
2019

DEDICATORIA

Nuestro proyecto de tesis está dedicado a Dios quién nos guía y nos da las fuerzas necesarias para seguir nuestro camino, enseñándonos a encarar las adversidades.

A nuestros padres: Bertha Meléndez y Jesús Vásquez, Gladys Guevara y Jorge Chirinos, por su comprensión, apoyo en los momentos difíciles y por ayudarnos con nuestra educación. Nos han dado todo lo que somos como persona, fomentándonos valores y guiándonos para conseguir nuestros objetivos.

A nuestros hermanos Katherine y Jhonatan, Fabiola y Mayte, por estar siempre presentes, acompañándonos y motivándonos a seguir adelante.



KAREN JUDITZA VÁSQUEZ MELÉNDEZ



ELIZABETH STEFANNY CHIRINOS GUEVARA

AGRADECIMIENTO

Este proyecto está dedicados a todas aquellas personas que nos apoyaron en el proceso y culminación.

Nuestro agradecimiento está dirigido hacia nuestro asesor, el profesor Eterio Alva Muñoz, por su apoyo en el proceso de nuestra investigación.

A nuestras familias por su apoyo sentimental y económico en el camino de nuestra educación.

Pero, principalmente nuestros agradecimientos están dirigidos hacia al señor Oscar Chauca Quintana y Lidia, técnicos de laboratorio de microbiología y Biología que siempre nos mostraron su ayuda desinteresada.

Gracias Dios, gracias Profesor Eterio, gracias padres y hermanos, y en especial, gracias Oscar Chauca y Lidia.

INDICE DE CONTENIDO

DEDICATORIA	i
AGRADECIMIENTO	ii
RESUMEN	viii
ABSTRACT	ix
I. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. OBJETIVOS	5
1.1.1. Objetivo general.....	5
1.1.2. Objetivos específicos.....	5
1.2. HIPÓTESIS	5
II. MARCO TEÓRICO:.....	6
2.1. ORIGEN DEL PALTO	6
2.2. CLASIFICACION BOTÁNICA:.....	6
2.3. DESCRIPCIÓN	6
2.4. USOS	7
2.5. PRODUCCIÓN MUNDIAL DE PALTO	8
2.6. REQUERIMIENTOS DEL CULTIVO	8
2.6.1. Suelo:.....	8
2.6.2. Clima:.....	8
2.7. VARIEDAD:.....	10
2.7.1. Variedad Hass	10
2.8. PRINCIPALES ENFERMEDADES DEL PALTO.....	11
2.8.1. Pudrición de la raíz o tristeza del palto (<i>Phytophthora cinnamomi</i> Rands)	11
2.8.2. Muerte descendente de ramas (<i>Lasidioplodia theobromae</i>).....	11
2.8.3. Fumagina (<i>Capnodium sp</i>).....	11
2.9. PROPAGACION DEL PALTO	12
2.10. PROPAGACIÓN DE PALTO MEDIANTE CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES.....	12
2.11. ETAPAS DE LA MICROPROPAGACIÓN.....	13
2.12. MICROPROPAGACIÓN DE PALTO	13
2.13. FACTORES QUE AFECTAN EL CULTIVO DE TEJIDOS	13
2.13.1. Explante.....	13
2.13.2. Desinfección de explantes	14

2.13.3.	Medio de cultivo	15
2.14.	COMPONENTES DEL MEDIO DE CULTIVO	15
2.14.1.	Agua:	15
2.14.2.	Macro y Micronutrientes:.....	15
2.14.3.	Fuente de Carbono	16
2.14.4.	Vitaminas.....	16
2.14.5.	Reguladores de crecimiento	17
2.14.6.	Medios de soporte.....	18
2.14.7.	Carbón activado	18
2.15.	FACTORES FÍSICOS DEL AMBIENTE EN LOS CULTIVOS.....	18
2.15.1.	Necesidades de luz	18
2.15.2.	Fotoperíodo	19
2.16.	INDUCCIÓN DE BROTES	19
III.	MATERIALES Y MÉTODOS	21
3.1.	Materiales	21
3.1.1.	Material Biológico.....	21
3.1.2.	Instrumentos Estéril	22
3.2.	Métodos.....	22
3.2.1.	Medio de cultivo	22
3.2.2.	Selección del material vegetal.....	24
3.2.3.	Desinfección del material vegetal.....	25
.....	25
3.2.4.	Siembra.....	25
3.2.5.	Incubación.....	26
3.2.7.	Descripción de unidades experimentales	27
3.2.8.	Variable respuesta.....	27
IV.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	28
4.1.	PORCENTAJE DE SOBREVIVENCIA DE EXPLANTES A LA OXIDACIÓN Y CONTAMINACIÓN POR MICROORGANISMOS.	28
4.2.	PORCENTAJE DE BROTEACION	31
4.2.1.	Brotación obtenida a los 30 días	31
4.2.2.	Brotación obtenida a los 60 días	37
V.	CONCLUSIÓN.....	46
VI.	BIBLIOGRAFÍA.....	47
VII.	RECOMENDACIONES.....	53
	ANEXOS	54

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Tratamientos utilizados para evaluar la inducción de brotes en yemas axilares de palto (<i>Persea americana</i> Var Hass).	24
Tabla 2. Resultados de sobrevivencia a la oxidación de explantes de palto <i>Persea americana</i> var. Hass utilizando carbón activado al 1 % a los 30 días de la inoculación en los medios.	30
Tabla 3 ANOVA sobrevivencia a la oxidación de explantes de palto <i>Persea americana</i> var. Hass utilizando carbón activado al 1 % a los 30 días de la inoculación en los medios.	31
Tabla 4 Respuesta del Palto <i>Persea americana</i> var. Hass a la inducción de brotes a los 30 días de haber sido inoculados.	32
Tabla 5 ANOVA inducción de los brotes a los 30 días de la inoculación.....	33
Tabla 6 Prueba de comparaciones múltiples mediante la prueba de Duncan sobre la inducción de brotes a los 30 días de la inoculación.	33
Tabla 7 Datos del número de hojas por brote a los 30 días de siembra.	35
Tabla 8 ANOVA número de hojas por brote de los diferentes tratamientos a los 30 días de la siembra.....	36
Tabla 9 Prueba de comparaciones múltiples mediante la prueba de Duncan sobre el total de hojas de los diferentes tratamientos a los 30 días de la siembra.	36
Tabla 10 Respuesta del palto <i>Persea americana</i> var. Hass a la inducción de brotes a los 60 días de la inoculación	38
Tabla 11 ANOVA Inducción de brotes a los 60 días de la inoculación.	39
Tabla 12 Prueba de comparaciones múltiples mediante la prueba de Duncan sobre la inducción de brotes a los 60 días de la inoculación.	39
Tabla 13 Datos del número de hojas por brote de los diferentes tratamientos a los 60 días de ser inoculados en el medio MS.	40
Tabla 14 ANOVA número de hojas por brote de los diferentes tratamientos a los 60 días de ser introducidos en el medio de cultivo MS.	41
Tabla 15 Prueba de comparaciones múltiples mediante la prueba de Duncan sobre el número de hojas por brote a los 60 días de la siembra.	42

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Plantas madre del fundo de Moro.....	21
Figura 2. Materiales esterilizados en la cámara de flujo laminar.....	22
Figura 3. Preparación de medio de cultivo antes de adicionar las concentraciones de los reguladores de crecimiento.....	23
Figura 4. Dispensación del medio de cultivo en cada vial.	23
Figura 5. Corte de los segmentos nodales de las ramas.	24
Figura 6. Lavado de explantes con detergente realizando enjuagues con agua destila estéril.....	25
Figura 7. Siembra de segmentos nodales de <i>Persea americana Var Hass</i> en viales.	26
Figura 8. Promedio de hojas de la plántula en los tratamientos a los 60 días de haber sido introducido al medio <i>in vitro</i> de <i>P. americana Var. Hass</i>	41
Figura 9. Brotes del tratamiento 0 - Blanco	43
Figura 10. Brotación en Tratamiento 01	43
Figura 11. Brotación en Tratamiento 07	44
Figura 12. Mejores muestras de Tratamiento 07	44
Figura 13. Muestras de tratamiento 9.....	45

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Hormonas utilizadas para preparación del medio con diferentes concentraciones de BAP Y AG3	55
Anexo 2. Pesado de agar y sacarosa para la preparación del medio de cultivo.	55
Anexo 3. Incubación de los tratamientos con los segmentos nodales introducidos en los medios de cultivo.....	56
Anexo 4. Tratamientos: T3, T4, T5 con los segmentos nodales introducidos en los medios de cultivo.....	56
Anexo 5. Tratamientos: Blanco, T8, T9 con los segmentos nodales introducidos en los medios de cultivo.....	57
Anexo 6. Tratamientos: T1, T2, T7 con los segmentos nodales introducidos en los medios de cultivo.....	57
Anexo 7. Explantes a los 60 días que no fueron expuestos a tratamiento de BAP Y AG3.....	58
Anexo 8. Tratamientos: T3, T4, T5 con los segmentos nodales introducidos en los medios de cultivo.....	58
Anexo 9. Explantes a los 60 días expuestos al T1 (0.5 BAP + 0.5 AG3)	59
Anexo 10. Explantes a los 60 días al ser expuestos al T2 (0.5 BAP + 1.0 AG3)	59
Anexo 11. Explantes a los 60 días de ser expuestos al T3 (0.5 BAP + 1.5 AG3)	60
Anexo 12. Explantes a los 60 días expuestos al T4 (1.5 BAP + 0.5 AG3)	60
Anexo 13. Explantes a los 60 días expuestos al T5 (1.5 BAP + 1.0 AG3)	61
Anexo 14. Explantes a los 60 días expuestos al T6 (1.5 BAP + 1.5 AG3)	61
Anexo 15. Explantes a los 60 días expuestos al T7 (3.0 BAP + 0.5 AG3).	62
Anexo 16. Explantes a los 60 días expuestos al T8 (3.0 BAP + 1.0 AG3)	62
Anexo 17. Explantes a los 60 días expuestos al T9 (3.0 BAP + 1.5 AG3)	63
Anexo 18. Resultados de los explantes a los 60 días expuestos a los diferentes tratamientos de BAP Y AG ₃	64
Anexo 19. Diseño experimental completamente al azar.....	64
Anexo 20. Curva de Fisher.....	67

RESUMEN

El objetivo de esta investigación fue inducir brotes *in vitro* de palto (*Persea americana* Var. Hass), utilizando combinaciones de BAP y AG₃. El Perú en la actualidad no cuenta con tecnología adecuada que permita la producción de frutales con uniformidad genética, libres de plagas y enfermedades, por lo que esta investigación pretende encontrar soluciones en cuanto a la propagación de la planta de palto. El medio nutritivo de Murashige & Skoog (MS) fue utilizado, adicionado de carbón activado al 1 % para evitar la oxidación de la misma y combinaciones de BAP en niveles de concentración de 0.0, 0.5, 1.5, 3.0 mg/l y AG₃ en concentraciones de 0.0, 0.5, 1.0, 1.5 mg/l. En esta investigación se usó un diseño experimental completamente al azar, con las combinaciones de tres niveles de BAP y tres niveles de AG₃, más un blanco, con 10 tratamientos, 10 repeticiones y 100 unidades experimentales. Las variables evaluadas fueron número de brotes y número de hojas por explante a los 30 y 60 días. Se encontró que la combinación de 3mg/l de BAP y 0.5mg/l de AG₃ (T₇), presentó mejores resultados en cuanto a la brotación y número de hojas por brote a los 60 días, produciendo una diferencia significativa comparado al resto de los tratamientos evaluados. Se concluye que para la inducción de brotes *in vitro* de palto (*Persea americana* Var. Hass), el tratamiento 7 con una combinación de 3mg/l de BAP y 0.5mg/l de AG₃ presentó mejores resultados.

Palabras clave: *Persea americana*, palto, cultivo, *in vitro*, combinación.

ABSTRACT

The objective of this research was to induce *in vitro* shoots of avocado (*Persea americana* Var. Hass), using combinations of BAP and AG3. Peru currently does not have adequate technology that allows the production of fruit trees with genetic uniformity, free of pests and diseases, so this research aims to find solutions regarding the propagation of the avocado plant. The nutrient medium of Murashige & Skoog (MS) was used, added 1% activated carbon to prevent oxidation and combinations of BAP at concentration levels of 0.0, 0.5, 1.5, 3.0 mg / L⁻¹ and AG3 at concentrations of 0.0, 0.5, 1.0, 1.5 mg / L⁻¹. In this investigation a completely randomized experimental design was used, with the combinations of three levels of BAP and three levels of AG3, plus a blank, with 10 treatments, 10 repetitions and 100 experimental units. The variables evaluated were number of shoots and number of leaves per explant at 30 and 60 days. It was found that the combination of 3mg / L⁻¹ of BAP and 0.5mg / L⁻¹ of AG3 (T7), presented better results in terms of budding and number of leaves per bud at 60 days, producing a significant difference compared to the rest of the treatments evaluated. It is concluded that for the induction of *in vitro* shoots of avocado (*Persea americana* Var. Hass), treatment 7 with a combination of 3mg / l of BAP and 0.5mg / l of AG3 presented better results

Key words: ***Persea americana*, avocado, culture *in vitro*, combination.**

I. INTRODUCCIÓN

La palta es una planta originaria de América Central y México, conociéndose en esos países como aguacate. Es un fruto que posee una textura suave y sabor delicado. Los que llevaron el fruto a Europa y propagaron de estimulante y afrodisíaco fueron los españoles. Es un árbol de la familia Lauraceae, son cultivados por sus frutos que son muy valorados, la cual posee un alto contenido nutricional (Ben-Ya'acov y Michelson, 1995; Knight, 2002; Chanderbali et al., 2008). En la actualidad, la palta es preferido a nivel mundial porque ha demostrado poseer grandes propiedades alimenticias, su alta concentración de proteínas y aceites insaturados, así como la ausencia de colesterol.

Se distinguen tres razas de acuerdo a su región fisiográfica y a características genéticas particulares. Los tipos de razas son: 1. *Persea americana* var. *drymifolia* (raza mexicana), 2. *P. Americana* Var. *Americana* (raza antillana) y 3. *P. Americana* var. *Guatemalensis* (raza guatemalteca). (Ben Yaacov & Michelson, 1995; Knight, 1999).

La importancia de la palta en la economía mundial ha crecido , dejando de ser una fruta exótica a ser una de los alimentos consumidos en la dieta diaria. Además, contiene pequeñas cantidades de magnesio, manganeso, cobre, hierro, zinc, fósforo y muchas vitaminas. (Chanderbali *et al.*, 2008).

Se ha logrado incursionar en la exportación de palto a países Centroamericanos como: Costa Rica, Honduras, El Salvador y Nicaragua, siendo El primer lugar lo México y el Perú el segundo exportador de palta a nivel mundial.

El 2014 se posicionó en una exportación de US\$308 millones, teniendo un crecimiento de 66,2% frente a años anteriores , según la Dirección de Estudios Económicos e Información Agraria del Ministerio de Agricultura y Riego (Minagri, 2014).

El Ministerio de Agricultura y Riego (Minagri, 2018), dio a conocer que el Perú exportó el año pasado cerca de 250 mil toneladas de palta, principalmente variedad Hass, representando un incremento del 27% a lo registrado en el 2017.

Este incremento se debió al entorno favorable en que se lleva a cabo el proceso de cultivo de palto. (Minagri, 2018).

Como parte del crecimiento agroexportador que vive la región Áncash, el Ministerio de Agricultura y Riego (2019), La producción de Palta Hass en la provincia Del Santa se ha venido desarrollando solo en el distrito de Moro, Cascajal y zonas periféricas. Con el inicio de la campaña de exportación de Palta Hass 2019, ha sido notorio la aparición de nuevas zonas de producción de este cultivo. Este índice de crecimiento, se debe a la mayor demanda que genera la apertura de nuevos mercados internacionales.

La multiplicación en palto está enfocada mayormente en propagar portainjertos de interés comercial, o revitalizando material adulto que permite la multiplicación en base a técnicas tradicionales (Barceló Muñoz & Pliego Alfaro, 2003).

La biotecnología tiene una amplia gama de campos en las cuales se aplica, en este trabajo nos centramos en la biotecnología vegetal ya que permite la aplicación de ciencia y tecnología con el uso de plantas o parte de ella con la finalidad de manejar adecuadamente materiales vivos para desarrollar conocimientos, bienes y servicios, para la regeneración de plantas completas a partir de segmentos de estas plantas o parte de ella (explante), micropropagándola mediante diversas técnicas. (Peña, 2012).

Para el establecimiento del cultivo *in vitro* se debe tener en cuenta ciertos factores, de cuyo manejo depende el éxito del cultivo, siendo los más importantes: la variedad de la planta (genotipo), la clase de tejido a cultivar (explante), la composición química del medio de cultivo (factor químico) y las condiciones ambientales de incubación (factor físico). Para ello el material vegetal debe estar libre de contaminantes (esterilizado) y el medio de cultivo utilizado debe estar estéril, las cuales contienen sales minerales de macronutrientes y micronutrientes, vitaminas, hormonas (citoquininas y/o auxinas principalmente), azúcar (sacarosa y/o glucosa entre otras), etc. Los medios nutritivos pueden estar en estado líquido o bien solidificarse con agar en base al tipo de cultivos *in vitro* a realizar (callos, cultivos de células, meristemos, explantes, etc).

Finalmente, el medio ya sembrado con el explante se lleva al área de incubación controlando factores ambientales (luz, temperatura, humedad relativa, pH y la concentración de O₂ y CO₂) los cuales ejercen un papel muy importante en el desarrollo y diferenciación celular (Sharry *et al.*, 2006).

Respecto a la propagación *in vitro* de *P. americana*, existen pocos estudios reportados, la mayoría de investigaciones se han realizado con la finalidad de experimentar con nuevos protocolos para el establecimiento y propagación *in vitro* de esta especie. En la mayoría de estudios de propagación vegetal en *P. americana* se ha tenido éxito con material juvenil, pero no con material adulto, el éxito en la micropropagación de especies leñosas como el del palto se debe tener en cuenta el uso de material juvenil o material adulto revitalizado para garantizar su desarrollo. (Delgado, 2013).

Muchas variedades de palto se han micropropagado a partir de segmentos nodales con yemas laterales y apicales, embriones inmaduros y semillas (Dalsaso & Guevara, 1988; Barringer *et al.*, 1996; Muñoz *et al.*, 1999; Nhut *et al.*, 2008; Zulfiqar *et al.*, 2009).

La presente investigación de la respuesta de dos genotipos de Palto (*Persea americana* var. *Mill*) a la micropropagación utilizando diferentes combinaciones de auxinas y citoquininas, se basó en observar la respuesta de dos cultivares de aguacate siendo las variedades Hass y Booth-8, para lo cual se utilizó el medio de Murashige y Skoog, combinado con distintos reguladores de crecimiento, se utilizó la citosina 6-bencilaminopurina (BAP) en niveles de 0.0, 0.5, 1.5, 3.0 mg/l así como ácido giberélico (AG₃) en concentraciones de 0.0, 0.5, 1.0 y 1.5 mg/l. Para la variedad Hass el tratamiento donde se obtuvieron mejores resultados fue 0.0 mg/l de BAP más 0.5 mg/l de AG₃, obteniendo una respuesta del 40% de brotación, mientras que para la variedad Booth-8 donde se obtuvieron mejores resultados fue el tratamiento que contenía 0.5 mg/l de BAP más 0.5 mg/l de AG₃, obteniendo una respuesta de 50% de brotación (Valentín, 2005).

La Palta Hass (*Persea americana*) se sitúa como el segundo productor mundial de palto en nuestro país, por el amplio consumo de este fruto y por su importancia

económica a nivel mundial. Es considerado como una fuente muy importante para la medicina utilizando diversas partes del palto ya sea del árbol y fruto, extrayendo los aceites, además es utilizada como materia prima. Pero la forma de consumir el fruto es en fresco o pulpa, ya que es muy favorable en la dieta del ser humano considerado por su alto valor proteínico, y lo más importante es que no contiene colesterol. Está indicado su consumo para diabéticos, por su equilibrada capacidad de azúcar en la sangre y sus grasas no favorecen la formación del colesterol.

Teniendo en cuenta el crecimiento agroexportador de la Palta Hass en la provincia Del Santa, ha sido notorio la aparición de nuevas zonas de producción de este cultivo. La inducción de brotes y la propagación *in vitro* podría ser un punto clave en la multiplicación rápida de estos genotipos deseables y en la generación de mayores ganancias para el productor, debido a que es una especie económicamente importante para su comercialización. Este proyecto es importante porque pretende inducir brotes *in vitro* de palto (*Persea americana* Var. Hass) utilizando combinaciones de bencilaminopurina y ácido giberélico, con la finalidad de aumentar rápidamente el número de plantas existentes en condiciones óptimas y obtenerlas libre de patógenos.

En base a lo expuesto se formula el siguiente problema: ¿Es posible la inducción de brotes *in vitro* de palto (*Persea americana* Var. Hass) utilizando combinaciones de bencilaminopurina y ácido giberélico?

1.1. OBJETIVOS

1.1.1. Objetivo general

Inducir brotes *in vitro* de Palto (*Persea americana* var. *Hass*) utilizando combinaciones de bencilaminopurina (0.0, 0.5, 1.5, 3.0 mg/l) y ácido giberélico (0.0, 0.5, 1.5, 3.0 mg/l).

1.1.2. Objetivos específicos

Determinar la combinación óptima de bencilaminopurina en los niveles de (0.0, 0.5, 1.5, 3.0 mg/l) y el ácido giberélico en los niveles de (0.0, 0.5, 1.0, 1.5 mg/l) que producen un mayor porcentaje en el número de brotes en nudos de Palta Hass (*Persea americana*).

Determinar la combinación óptima de bencilaminopurina en los niveles de (0.0, 0.5, 1.5, 3.0 mg/l) y el ácido giberélico en los niveles de (0.0, 0.5, 1.0, 1.5 mg/l) que producen un mayor porcentaje en el número de hojas en nudos de Palta Hass (*Persea americana*).

1.2. HIPÓTESIS

La bencilaminopurina en una concentración de 3 mg/l y el ácido giberélico en la concentración de 0.5 mg/l inducirán un mayor porcentaje en el número de brotes y hojas en yemas axilares de Palta Hass (*Persea americana*).

II. MARCO TEÓRICO:

2.1. ORIGEN DEL PALTO

El palto es nativo de América. Es una importante fruta originaria de Mesoamérica, en la región alta del centro de México y Guatemala (Williams, 1976; Galindo *et al.*, 2008).

Se propagó hacia Sudamérica por las culturas que habitaron en Mesoamérica en la época prehispánica (Galindo *et al.*, 2007). El palto se desarrolló en el Neotrópico desde tiempos antiguos y su domesticación en Mesoamérica se inició antes que otras plantas anuales hace aproximadamente 5,000 años A.C. (Smith, 1969; Galindo *et al.*, 2008).

Los restos fósiles de palto fueron hallados en cuevas de Coxcatlán, Valle de Tehuacán, en el estado de Puebla, México, tienen una antigüedad de 8,000-7,000 años A.C. donde fue un árbol nativo que crecía al este, en el bosque mésico en una de las barrancas en la ladera de la montaña. La presencia de otros tipos de plantas cultivadas y semillas de palto, indican que plantas de palto fueron cultivados cerca de arroyos hace 6,500 años (Smith, 1969).

2.2. CLASIFICACION BOTÁNICA:

- **Nombre Científico:** *Persea americana*
- **Familia:** Lauraceae
- **Género:** Persea
- **Especie:** americana
- **Nombres Vulgar:** palto, aguacate (México)

2.3. DESCRIPCIÓN

Árbol de aproximadamente 13 metros de altura, tronco recto, corto y corteza rugosa. Posee hojas grandes hojas de 6 - 30 cm de largo, formando ramajes muy abundantes. Sus flores son pequeñas, arracimadas, blanco-verdosas, 1 - 3 cm de ancho que permite posteriormente el desarrollo de frutos y nuevos brotes. El

Fruto es comestible en forma de esfera o piriforme, la cáscara suele ser gruesa de color variable: verde, amarillo o violeta que depende de la variedad de palto. La pulpa es grasosa, amarillenta o verde; semilla única, dura, ovalada, oleosa (Smith, 2013).

Los árboles de palto se adaptan según el tipo de raza que sea (Téliz & Mora, 2007). En el caso de la raza Mexicana que posee una piel delicada, la semilla es grande y por lo común suelta en la cavidad, y deseable económicamente ya que sus frutos son pequeños lo cual permite su transporte (Bergh & Ellstrand, 1986; Knight, 1999). Esta raza posee grandes ventajas como la resistencia al frío, la adaptándose a grandes alturas y alto porcentaje de aceite en el fruto (Bergh & Ellstrand, 1986; Barrientos & López, 2002; Knight, 1999).

La raza Guatemalteca produce frutos con calidad deseada en la agricultura (Bergh & Ellstrand, 1986). El fruto posee una cáscara gruesa lo que facilita su transporte, y su semilla es pequeña (Barrientos & López, 2002). Estos frutos poseen una mayor cantidad de tiempo de madurez. Adaptándose a elevaciones altas y sobreviven a climas fríos (Bergh & Ellstrand, 1986). Una de las razas que se adapta a regiones tropicales con bajas alturas son las Antillanas (Bergh & Ellstrand, 1986), y el portainjerto es más tolerante a la salinidad y clorosis (Barrientos Priego & López López, 2002).

2.4. USOS

El Palto se ha convertido en interés por sus múltiples usos medicinales utilizando hojas, cáscaras, semillas y corteza, extracción de aceites, los cuales se compara con el aceite de oliva; también se utiliza como materia prima en la fabricación de diversos productos como: shampoo, cosméticos, cremas, aceites, películas protectoras y limpiadoras de la piel (Smith, 2013).

La principal forma de utilización del Palto es el consumo de la fruta en fresco o pulpa procesada en forma de guacamol, muy favorable en la dieta del ser humano, posee un alto valor proteínico, y lo más importante no contiene colesterol. Indicado para diabéticos, por su capacidad de equilibrar el nivel de azúcar en la sangre. Sus grasas no favorecen la formación de colesterol (Smith, 2013).

2.5. PRODUCCIÓN MUNDIAL DE PALTO

Según la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (2016), reporta una producción mundial de 4.71 Mt de Palto, donde el continente Americano destaca con la mayor producción (70.3 %), seguido por África (15.2 %) y Asia (10.9 %) México, los Estados Unidos y la República Dominicana fueron los principales países consumidores de aguacate. Los países con mayor consumo fueron México (17%), Estados Unidos (16%), República Dominicana (10%), Indonesia (5%), Colombia (5%), Perú (4%), Brasil (3%), China (3%), Kenia (3%) y Ruanda (3%). El resto de los países representaron cerca del 31% del consumo mundial.

De acuerdo a los reportes evaluados se observa aumentos en la producción del cultivo de Palto a lo largo de cinco años (37 %), en comparación a los resultados obtenidos en el 2011, donde se reportaban 3.44 Mt de producción de este cultivo.

2.6. REQUERIMIENTOS DEL CULTIVO

2.6.1. Suelo:

Las características del suelo en comparación con otros frutales, son más exigentes por lo que posee un sistema radical distinto, limitándolo a adaptarse a suelos difíciles, no posee pelos radicales, ni raíces terciarias, tiene una raíz fácilmente quebradiza la cual absorbe agua y nutrientes únicamente por la punta, a través de células presentes en la zonas de crecimiento longitudinal. Además, es apetecida por gran cantidad de hongos que viven en el suelo especialmente en condiciones de alta humedad (Bisonó & Hernández, 2008).

2.6.2. Clima:

Para variedades de altura en las plantas de Palto variedad *Hass* se requiere de los siguientes factores (Bisonó & Hernández, 2008):

A. Temperatura media anual.

La temperatura ideal que presenta las mejores condiciones para el cultivo de Palto se encuentran entre los 18 y 25° C. Temperatura inferior a 17°C el fruto del cultivo empieza a tener problemas de cuaje y a los 14° C presenta cero cuaje.

B. Altitud

En la variedad *Hass* las altitudes recomendables están de 1200 a 1800 msnm. Esta puede variar, dependiendo del microclima existente. En altitudes inferiores a 1100 msnm el palto presenta limitaciones para su producción y desarrollo, en la variedad *Hass*, tales como: frutos de menor tamaño, mayor presencia de plagas, enfermedades y mayor porcentaje de hongos que atacan la raíz, como por ejemplo *Phytophthora*. También existen zonas con altitudes de hasta 2500 msnm que por sus condiciones de clima favorables, permiten un adecuado desarrollo y mejor producción de la variedad *Hass*.

C. Humedad relativa

Mayor a 65% para mantener un buen cultivo, obteniendo producción favorable.

D. Precipitación media anual

Precipitación no mayor a 1500 mm bien distribuidos durante todo el año (puede variar dependiendo de la zona), es la más aceptable.

E. Viento

Debe ser moderado, este factor favorece la caída de flores y frutos y también el desarrollo de hongos debido a las heridas causadas. Los vientos excesivos limitan un adecuado crecimiento, al dañar los nuevos brotes y causar fuertes heridas en el follaje. En caso de presentarse estos vientos, es importante colocar barreras rompe vientos en la plantación y alrededores desde su establecimiento, con el fin de mitigar su efecto directo.

2.7. VARIEDAD:

Para el éxito de la explotación de Palto es fundamental la selección apropiada de la variedad, tomándose en cuenta el rendimiento, la aceptación del consumidor, el mercado, el manejo adecuado post cosecha, entre otros. En el cultivo de Palto existen variedades de gran importancia comercial, tanto para zonas de altura media como para zonas altas, entre otras (Garbanzo, 2011).

En la presente investigación se enfocaron aspectos relacionados con el palto de variedad Hass, por poseer una mayor producción y tener una gran cantidad de áreas cultivadas en el país, debido a su mayor crecimiento comercial tanto a nivel de mercado interno como en muchos países Europeos.

2.7.1. Variedad Hass

Esta variedad tiene gran importancia en el Perú y el mundo debido a su mayor producción y calidad. Puede producir abundantes cosechas sin necesidad de variedades polinizadoras. El fruto puede permanecer en el árbol por cierto tiempo, una vez que se ha obtenido su madurez fisiológica; sin embargo, es importante no excederse para no causar problemas en la siguiente cosecha, evitando el agotamiento del árbol. (Garbanzo, 2011).

El árbol de la variedad Hass para obtener una mayor producción y mejor cultivo es aconsejable su plantación en zonas libres de heladas. Evitando regiones con vientos calurosos, pues deshidratan tanto las flores como los brotes jóvenes. Diciembre a marzo es la época de floración, la cosecha de noviembre a abril y de julio a septiembre (Garbanzo, 2011).

- ✓ Buen nivel de productividad.
- ✓ Fruto oval periforme.
- ✓ Tamaño medio, de 200 a 300 gramos de peso.
- ✓ Calidad excelente, Piel gruesa (resistente al transporte), rugosa, que se pela con facilidad.
- ✓ Fruto maduro color violeta oscuro.
- ✓ La pulpa no tiene fibra.

- ✓ Contenido de aceite de 18 a 22%, el fruto permanece temporalmente en el árbol, después de madurar sin pérdida de calidad.

2.8. PRINCIPALES ENFERMEDADES DEL PALTO

2.8.1. Pudrición de la raíz o tristeza del palto (*Phytophthora cinnamomi* Rands)

Enfermedad con más importancia a nivel mundial. En el valle de Cháparra se ha convertido en el principal problema de los agricultores causando daños importantes, tanto por disminución en el rendimiento, como también por la muerte de plantas y en algunos casos de huertas enteras. El ingreso de esta enfermedad al valle de Cháparra se produjo entre los años 1993 y 1994, mediante la instalación de huertas con plántones infectados provenientes de viveros del centro del país (Lahav & Lavi, 2007).

2.8.2. Muerte descendente de ramas (*Lasidiopodia theobromae*)

Esta enfermedad es favorecida por el exceso de humedad y la existencia de plantaciones muy densas, que crean microclimas favorables para el desarrollo y la producción del hongo. Es una enfermedad muy frecuente en el valle de Cháparra y su contagio es muy fácil y rápido debido a que las esporas de este hongo pueden proliferar a través de la ropa las personas, también con el uso de herramientas y equipos de trabajo; con el paso de animales y vehículos, el viento, el agua. Por lo tanto, puede diseminarse con el traslado de plantas enfermas, rastrojos, movimiento de suelos, insectos, entre otros medios (Lahav & Lavi, 2007).

2.8.3. Fumagina (*Capnodium sp*)

Esta enfermedad se presenta en lugares con mucha humedad o en huertos sombreados. Forma una capa de color negro opaco, esta se desarrolla sobre las secreciones de insectos como queresas y mosca blanca. La capa oscura formada reduce la asimilación de la luz por parte del follaje y cuando se presenta en los frutos afecta su apariencia (Lahav & Lavi, 2007).

2.9. PROPAGACION DEL PALTO

Muchos estudios realizados determinaron que la propagación vegetativa del Palto es difícil; existen diferencias en la capacidad de enraizamiento debido a su genotipo o a la edad ontogenética del material vegetal (Ben Yaacov, 1987; Kohne, 1992; Barceló & Pliego, 2003).

El método más apropiado para reproducir los cultivares de interés comercial es la propagación por injerto (Moreno *et al.*, 2010), debido a que se espera que los árboles tengan un alto rendimiento y sean uniformes en la calidad, forma y tamaño de los frutos (Barrientos *et al.*, 2007), la propagación resulta costoso y consume mucho tiempo (Brokaw, 1987). Por lo que se deben realizar métodos de propagación deseables para el cultivo de palto obteniendo un mayor número de plantas existentes y de buena calidad (Barceló & Pliego, 2003).

2.10. PROPAGACIÓN DE PALTO MEDIANTE CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES

Una de las técnicas más importantes en la biotecnología vegetal es el cultivo *in vitro* de plantas, comúnmente llamado cultivo de tejidos vegetales o micropropagación, lo cual permite obtener una tecnología para la producción agrícola, el fitomejoramiento, modificación de plantas, producción de metabolitos vegetales, la manipulación genética y la rápida propagación clonal de plantas en un menor tiempo, requiere de poca mano de obra, espacios reducidos y también ambientes equipados (Kumar & Loh, 2012; De Filippis, 2014).

Principales ventajas de la propagación *in vitro* sobre los métodos tradicionales de propagación clonal se diferencia: a) Producción de un gran número de plantas a partir de una parte del vegetal (explante) en un corto tiempo y espacio reducido debidamente equipado, b) Necesidad de pequeños fragmentos del tejido vegetal para iniciar el cultivo *in vitro*, c) El porcentaje de propagación *in vitro* es mayor que los métodos de propagación convencional, d) Se aplica en especies donde la propagación vegetativa es difícil o imposible su multiplicación, e) La etapa de multiplicación se puede realizar en cualquier época del año sin presentar ningún inconveniente, f) Permite la conservación del germoplasma, teniendo plantas

libres de virus u otras enfermedades g) Las plantas *in vitro* se mantienen libres de infestaciones de microorganismos, h) La producción *in vitro* pueden estar almacenadas en bajas temperaturas en temporadas de baja demanda en el mercado i) En las plantas propagadas *in vitro* se pueden adquirir nuevos rasgos deseables del cultivo (Bhojwani & Dantu, 2013).

También existen desventajas, tales como: a) Se requiere de un personal capacitado. b) Requiere de infraestructura y equipamiento especiales, generando costos un poco elevados. c) La obtención de productos químicos es costosa y difícil especialmente en países con pocos recursos económicos, d) Para la instalación de laboratorios "*in vitro*" tiene que existir un fluido eléctrico que no presente interrupciones periódicas de éste, porque genera pérdidas en los cultivos (Rodríguez *et al.*, 1999).

2.11. ETAPAS DE LA MICROPROPAGACION

Proceso que cuenta con cinco etapas, cada una con sus requerimientos y factores que afectan el proceso (Bhojwani & Dantu, 2013). Etapa 0: es la etapa de preparación para seleccionar los explantes de mejor calidad; Etapa 1: medios de cultivo asépticos; Etapa 2: multiplicación en donde se propaga el material vegetal para obtener un gran número de plántulas; Etapa 3: enraizamiento; Etapa 4: aclimatación de plantulas.

2.12. MICROPROPAGACIÓN DE PALTO

El Palto es una planta leñosa, la capacidad de morfogénesis es más baja en plantas adultas que juveniles (Pliego Alfaro & Murashige, 1987; Read & Bavougian, 2013), Para tener éxito en la micropropagación es mejor que se desarrolle con explantes de plantas jóvenes (Barceló & Pliego, 2003).

2.13. FACTORES QUE AFECTAN EL CULTIVO DE TEJIDOS

2.13.1. Explante

El explante es un fragmento de tejido vegetal que se introduce en el medio de cultivo nutritivo. Para la selección del explante se tiene que tener en cuenta ciertos factores que son: 1) la edad de las plantas madres, 2) la temporada en que se obtuvo el explante, 3) el tamaño y grosor del explante, 4) la calidad de la planta donadora (Planta madre), 5) genotipo (Smith, 2013).

Durante la fase de iniciación de los cultivos el palto, puede presentar problemas como alta contaminación, baja tasa de germinación y producción de cultivos también puede presentar producción de exudados y oscurecimiento (Cooper, 1987) (Zirari & Lionakis, 1994).

2.13.2. Desinfección de explantes

Las Plantas madre tiene que tener un pretratamiento esta es la clave para el éxito de establecimiento de los cultivos, las plantas donadoras pueden ser desinfectadas con soluciones de bactericidas y fungicidas para disminuir la gran cantidad microbiana (Cooper, 1987; Dalsaso & Guevara, 1988; Zirari & Lionakis, 1994).

Una vez obtenido el material vegetal de la planta madre, se lleva a cabo un tratamiento de asepsia. El tratamiento dependerá de cuán limpio o sucio se encuentre el material vegetal, si el material fue de campo o de una planta madre previamente tratada antes de su recolección.

El protocolo establecido tiene que ser el que no genere daños al explante. El agente limpiador más utilizado son las soluciones de hipoclorito de sodio (NaClO) en diferentes concentraciones, también se le puede adicionar un agente surfactante, Tween-20, este reduce la tensión superficial del material mientras se limpia (Kyte & Kleyn, 1996).

En algunos casos se pueden utilizar soluciones bactericidas fungicidas por hasta 20 min (Dalsaso & Guevara, 1988; Vidales, 2002; Cortés *et al.*, 2011), sustituyen el NaClO por cloruro mercuríco (0.15-1.0 %). De igual forma se reporta el uso de antioxidantes, como ácido ascórbico, ácido cítrico y PVP (polivinilpirrolidona), para reducir la oxidación de los explantes, incorporándolos en el medio nutritivo (Dalsaso & Guevara, 1988; Castro *et al.*, 1995; Rodríguez *et al.*, 1999), se usa

etanol al 70 % por 5.0 minutos y después una solución de blanqueador comercial al 50 % (v/v) por 20 minutos.

2.13.3. Medio de cultivo

El cultivo de tejidos *in vitro* está influenciado por la composición química de los medios nutritivos. Se ha determinado que utilizando las sustancias químicas necesarias (Factor químico) y las condiciones apropiadas en los factores ambientales que son importantes para su desarrollo y diferenciación celular (Factor físico), se establecieron cultivos para casi todas las partes de una planta en diversas especies vegetales (Villalobos & Thorpe, 1991).

Villalobos (1991), indica que para el crecimiento adecuado de las plantas se necesita que las mismas tomen del suelo cantidades importantes de macronutrientes entre los que se pueden mencionar: las sales de nitrógeno, calcio, potasio, cobre, magnesio, fósforo, cobalto y molibdeno. Un medio de cultivo macronutrientes y micronutrientes, carbohidratos especialmente sacarosa, el cual sirve para reemplazar el carbono que la planta fija por medio de la fotosíntesis. Se sabe también que se obtienen mejores resultados al incluir compuestos orgánicos en pequeñas cantidades tales como lo son las vitaminas, reguladores del crecimiento y aminoácidos.

2.14. COMPONENTES DEL MEDIO DE CULTIVO

Podemos mencionar los siguientes:

2.14.1. Agua:

La calidad del agua empleada es de vital importancia. Cuando se realiza trabajos con cultivo de tejidos y células *in vitro* el agua a usar debe de tener la mayor calidad posible (desionizada), debiendo estar entre 0.5 a 2 ms/ cms (Mroginski *et al.*, 2010).

2.14.2. Macro y Micronutrientes:

En la preparación de un medio de cultivo se deben incluir los macro elementos (C, H, O, P, K, N, S, Ca, y Mg) y los micro elementos (B, Zn, Cu, Mo, Fe, Cl). El Nitrógeno (N), se suministra nitrógeno en forma de nitrato y amonio, forma parte de los aminoácidos, vitaminas, proteínas y ácidos nucleicos; el Magnesio (Mg), es parte de la molécula de clorofila y ribosomas; el Calcio (Ca), es un constituyente de la pared celular, interviene en la respuesta del crecimiento de la planta; el Fósforo (P), forma parte de las moléculas que almacenan y transfieren la energía química de los ácidos nucleicos; el Potasio (K), es importante para la actividad enzimática y regulación osmótica; el Azufre (S), se necesita pequeñas cantidades en la síntesis de algunos aminoácidos ;el Hierro (Fe), forma parte de la ferredoxina y núcleo del citocromo; el Molibdeno (Mo), fundamental para la nitroreductasa; el Manganeseo (Mn), induce la síntesis de clorofila que se refiere a la formación del O₂ en la fotosíntesis; el Boro (B), hace parte de la síntesis de bases nitrogenadas y es necesario para el sostenimiento de la actividad meristemática; el Cobre (Cu), está ligado al proceso de lignificación y permite la oxidación respiratoria; el Zinc (Zn), es requerido para la oxidación y la hidroxilación de compuestos fenólicos; el Cobalto (Co), es un componente de la vitamina B₁₂; el Cloro (Cl), es fundamental para las reacciones que llevan a la transformación del O₂ en la fotosíntesis (Mroginski *et al.*, 2010).

2.14.3. Fuente de Carbono

La fotosíntesis de las plantas da como producto los azúcares, proceso en donde la planta convierte dióxido de carbono y agua en carbohidratos con ayuda de la clorofila y la luz. Las plantas que crecen *in vitro* no pueden realizar la fotosíntesis debido a la baja intensidad lumínica por lo que no pueden fabricar el azúcar que requieren, debido a esto es necesario adicionar al medio de cultivo, la sacarosa (Mroginski *et al.*, 2010).

2.14.4. Vitaminas

La vitamina más utilizada es la Tiamina y se le considera un ingrediente esencial. Otras vitaminas han demostrado tener un efecto positivo en el crecimiento *in vitro* tales como: B₂ (Riboflavina), B₃ (ácido nicotínico), B₅ (Ácido pantoténico), B₆

(Piridoxina), B₉ (ácido fólico), vitamina H (Biotina), vitamina E (α - tocoferol), vitamina C (Ácido ascórbico), con un rango de concentración de 1-100 mg/l. (Mroginski *et al.*, 2010).

2.14.5. Reguladores de crecimiento

Los reguladores de crecimiento vegetal son las auxinas, las citoquininas y las giberelinas como inductoras de crecimiento y el ácido abscísico y el etileno, como inhibidores del crecimiento. Las auxinas tienen la capacidad de regular el crecimiento, la división celular y la diferenciación de raíces en los cultivos *in vitro*, las más utilizadas son el Ácido Indol 3 Ácético, Ácido α- Naftalenacético, Ácido 2,4 Diclorofenoxiacético, Ácido Indol Butírico, Ácido p clorofenoxiacético y el Ácido Benzotiazol 2 oxiacético. El ácido indol-3- acético o AIA, es una hormona natural que se produce en los ápices de los tallos, meristemos y hojas jóvenes de yemas terminales. (Mroginski *et al.*, 2010)

Las citoquininas o citocininas promueven división celular, estos son derivados de la adenina, las más utilizadas son: BA (Bencil Adenina), KIN (Cinetina o 6-furfuril aminopurina) son citoquininas sintéticas, Zea (Zeatina), 2-iP (N-isopentenil adenina) son citoquininas naturales. Las citoquininas producen efectos fisiológicos como división celular, regulación de la morfogénesis, rompimiento de la dominancia apical, retraso de la senescencia foliar, promoción de la maduración de los cloroplastos. Las citoquininas en interacción con las auxinas, regulan la diferenciación *in vitro*. (Mroginski *et al.*, 2010)

Las fitohormonas reguladoras de crecimiento son las giberelinas, la más utilizada en los cultivos *in vitro* de vegetales es el ácido giberélico AG₃, conocida también como ácido giberélico. Esta fitohormona el GA₃ se usa para estimular la elongación de los tallos o la conversión de brotes a tallos, reduce la formación de raíces *in vitro* (Paredes, 2009).

El ácido abscísico es un inhibidor de crecimiento, el cual reprime la embriogénesis somática y reduce la frecuencia de anomalías de desarrollo como son formación secundaria de embriones a partir de embriones somáticos y la germinación precoz. El etileno, interviene en procesos como: liberación de la dormancia, crecimiento y diferenciación de brotes y raíces (Paredes, 2009).

2.14.6. Medios de soporte

El agar es un polisacárido constituido de algas marinas. Este debe ser de buena calidad, la concentración usada varía de 0.6 a 1 % (de 6 a 10 g/l). El agar impuro está constituido por polisacáridos, aminoácidos, sales, azúcar, los cuales son lavados antes de ser utilizados. El agar es alcalino, líquido a temperatura de 80 °C y se solidifica a 40 °C. Existen gelificantes que son más puros que el agar y son el Gelrite y Phytigel, estos provienen de fermentaciones bacterianas los cuales se usan en una concentración de 0.2 % (2 g/l). Estos productos pueden causar vitrificación en algunas especies (Torres *et al.*, 1996).

2.14.7. Carbón activado

Es utilizado para eliminar sustancias tóxicas producidas por el explante *in vitro*. Se usa en concentraciones de 3 g/l. El producto debe ser bastante fino. Es utilizado cuando ocurre el oscurecimiento *in vitro*, oxidación del material vegetal, decoloración del medio de cultivo, o cuando se inhibe el crecimiento del tejido. Absorbe productos provenientes del metabolismo, así como sustancias hormonales y vitaminas. En algunos casos es necesario aumentar la concentración de auxinas, en la presencia del carbón activado. La pureza de este producto es variable (Torres *et al.*, 1996).

2.15. FACTORES FÍSICOS DEL AMBIENTE EN LOS CULTIVOS

Dentro de los factores más importantes del ambiente en los cultivos, tenemos lo que es la luz y la temperatura. No se tocará la humedad relativa, ya que a menudo es cercana al 100 % en los recipientes de cultivo (Vidallie, 1986).

2.15.1. Necesidades de luz

La fotosíntesis no es una actividad necesaria en los explantes cultivados. No obstante según algunas observaciones la fotosíntesis no se suprime sino que solo se reduce de manera considerable, esto es debido a la presencia de azúcares en el medio.

Además, la luz es indispensable para regular ciertos procesos morfogénéticos, como lo comprueban numerosos estudios (Vidallie, 1986). Algunos fracasos en los cultivos de tejidos han sido causados por usar una intensidad de luz excesiva, del orden de la que se utiliza en los fitotrones; 50 W/m², o sea, unos 10,000 lux.

Por lo general, en las salas de cultivos de tejidos, las intensidades luminosas varían de 5 a 25 W/m² (1,000 a 5,000 lux) con uso muy común de 10 a 15 W/m². A menudo, en la fase 3 de la multiplicación vegetativa, se tiende a aumentar la intensidad luminosa para “fortalecer” y preparar a las plántulas que van a ser trasladadas al invernadero (Vidallie, 1986). B Período de Iluminación En apariencia, no hay muchos datos relacionados con la influencia eventual del período de iluminación en la morfogénesis de los tejidos (sobre todo si ésta actúa en forma análoga a la fotoperiodicidad en plantas completas). Lo más importante es la cantidad de energía luminosa recibida (intensidad por período de iluminación) en la mayoría de los casos.

2.15.2. Fotoperíodo

Existen distintos modos en que influye el fotoperíodo en las plantas:

- a) Regulando la cantidad de energía radiante interceptada. El crecimiento de las plantas depende de la actividad fotosintética y es proporcional al tiempo de la longitud de exposición de luz natural o luz artificial.
- b) A través de mecanismos controladores por medio del cual las plantas son capaces de reconocer cambios en el medio ambiente. Por este propósito, las plantas son capaces de realizar cambios con relación a la duración de luz de cada día (fotoperíodo) (George, 1993).

2.16. INDUCCIÓN DE BROTES

En la inducción de brotes in vitro de Palto la hormona reguladora de crecimiento más utilizada es la bencilaminopurina niveles de concentración de 0.1 a 6.0 mg/l (Campos & Pais, 1996; De la Viña *et al.*, 2001; Zulfiqar *et al.*, 2009) o en combinación con ácido indol-3-butírico AIB en concentraciones de 0.1 a 1.0 mg/l

(Cob *et al.*, 2010; Corté *et al.*, 2011), ácido 1-naftalenacético ANA (0.5 μ M) (Barringer *et al.*, 1996), ácido giberélico AG₃ (0.5-2.0 mg/l) (Rodríguez *et al.*, 1999) o thidiazuron (TDZ) (0.22.0 mg/l) (Mohamed, 1993). Sin embargo en algunos estudios realizados, Harty (1985) utiliza concentraciones de aproximadamente 60 mg/l de bencilaminopurina BAP, cinetina o 2-isopenteniladenina (2iP). Además los medios de cultivo se pueden adicionar con antioxidantes, fungicidas o peptona, en el caso de antioxidantes en la presente investigación se utilizó el carbón activado, debido a investigaciones realizadas y que presentaron buenos resultados evitando la oxidación de los explantes en los medios nutritivos (Vidales, 2002).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

La presente investigación se realizó en el Laboratorio de Biotecnología Agrícola de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional del Santa, en el distrito de Nuevo Chimbote, departamento de Ancash, Perú.

3.1. Materiales

3.1.1. Material Biológico

El material que se utilizó en el presente trabajo de investigación, fueron brotes de *Persea americana* Var. Hass “Palta” obtenidas de la planta madre del fundo de Moro. Para la selección de las ramas se tuvo en cuenta la edad, color, tamaño, grosor, apariencia, de la planta madre, una vez obtenido el material vegetal se colocaron en frascos y fueron trasladados al laboratorio de biotecnología agrícola de la facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Del Santa.



Figura 1. Plantas madre del fundo de Moro.

3.1.2. Instrumentos Estéril

Todo material de vidrio que se utilizó en el presente trabajo de investigación fue llevado a la estufa y autoclave por dos horas para su completa esterilización.



Figura 2. Materiales esterilizados en la cámara de flujo laminar.

3.2. Métodos

3.2.1. Medio de cultivo

Para la preparación del medio de cultivo se utilizó el medio MS descrito por Murashige y Skoog (1962) completo, suplementado con sacarosa 20 gr/l, agar bacteriológico 10 gr/l, carbón activado al 1% y reguladores de crecimiento Bencilaminopurina (BAP) en concentraciones (0.0, 0.5, 1.5, 3.0 mg/l) y Ácido Giberélico (AG₃) en concentraciones (0.0, 0.5, 1.5, 3.0 mg/l), y como recipiente viales (frascos de penicilina vacíos) de aproximadamente 6 cm. (Tabla 1). Se prepararon 50ml de medio de cultivo para cada tratamiento, en matraces previamente esterilizados, el pH del medio se ajustó a 5.7 ya que permite que el explante no se fenolice, se dispensaron 2.5ml del medio por vial, previamente rotulada. Posteriormente fueron autoclavados durante 30 minutos con una presión de 1.1 kg/cm² y temperatura de 121 °C, (Figura 3).



Figura 3. Preparación de medio de cultivo antes de adicionar las diferentes concentraciones de los reguladores de crecimiento.



Figura 4. Dispensación del medio de cultivo en cada vial.

Tabla 1. Tratamientos utilizados para evaluar la inducción de brotes en yemas axilares de palto (*Persea americana* Var Hass).

Tratamiento	BAP (mg/l)	AG3 (mg/l)
blanco (testigo)	0	0
1	0.5	0.5
2	0.5	1.0
3	0.5	1.5
4	1.5	0.5
5	1.5	1.0
6	1.5	1.5
7	3.0	0.5
8	3.0	1.0
9	3.0	1.5

BAP=Bencilaminopurina

AG3=Ácido giberélico

3.2.2. Selección del material vegetal

Para la obtención de explantes, se eligieron las plantas con tallos vigorosos que presentaron las mejores yemas, ya que son las más apropiadas para la micropropagación. Se realizaron cortes de los tallos de aproximadamente 3cm de longitud conteniendo una yema cada uno.



Figura 5. Corte de los segmentos nodales de las ramas.

3.2.3. Desinfección del material vegetal

Los explantes cortados se colocaron en recipientes de plástico y se agregó detergente (bolívar) 1% durante 5 minutos, seguido de tres lavados con agua destilada estéril, luego fueron llevados a la cámara de flujo laminar, previamente desinfectada minutos antes de iniciar el trabajo con alcohol al 70 %.

En la cámara de flujo laminar, se colocaron los explantes en un frasco estéril con alcohol al 70% por dos minutos con dos lavados posteriores con agua destilada estéril. Para finalizar la esterilización se usó hipoclorito de sodio al 2% por tres minutos, debido a que mayores concentraciones y tiempos producen la oxidación del explante.

Por último, se eliminó el residuo de hipoclorito de sodio realizando 3 enjuagues con agua destilada estéril.



Figura 6. Lavado de explantes con detergente realizando enjuagues con agua destilada estéril.

3.2.4. Siembra

En la cámara de flujo laminar, se procedió a la siembra en viales con medio de cultivo MS, rotuladas y llevadas al área de incubación.



Figura 7. Siembra de segmentos nodales de *Persea americana* Var *Hass* en viales.

3.2.5. Incubación

Los explantes sembrados fueron llevados al área de incubación con un fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas de oscuridad con una temperatura de 25°C, lugar donde se mantuvo por un periodo de 60 días.

Se realizó una visita semanal al área de incubación para comprobar si la contaminación y/o oxidación afectaron el proceso de desarrollo del explante.

3.2.6. Diseño Experimental

El ensayo se realizó bajo un Diseño Experimental Completamente al azar con 10 tratamientos, 10 repeticiones y un total de 100 unidades experimentales.

Para determinar la significancia estadística de los datos, brotes y número de hojas por plántulas de *Persea americana* Var. *Hass*, se usaron la prueba de análisis de Varianza (ANOVA) y para determinar la diferencia entre los tratamientos se utilizó la prueba de DUNCAN, con un nivel de significancia de 0.05 %, empleando el software SPSS.

3.2.7. Descripción de unidades experimentales

Se utilizaron como unidades experimentales frascos conteniendo 2.5 ml de medio nutritivo MS (Murashigue & Skoog), el cual incluía reguladores de crecimiento, así como una dosis de antioxidante y un explante que tenía una yema por cada unidad.

3.2.8. Variable respuesta

- **Porcentaje de explantes verdes (vivos)**

Determinó el porcentaje de explantes que no se contaminaron y/o oxidaron, relacionándolo con el total de unidades experimentales con que se inició cada uno de los tratamientos. Se realizó observando cada unidad experimental.

- **Porcentaje de brotes obtenidos**

Las lecturas se llevaron a cabo cada semana después de la siembra. Se contó el número de unidades experimentales que respondieron a la brotación, relacionándolo con el número total de unidades experimentales sembradas.

- **Número de hojas por brote**

La lectura se llevó a cabo a las 4 semanas después de la siembra. Se evaluó realizando un conteo de forma visual en cada unidad experimental.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. PORCENTAJE DE SOBREVIVENCIA DE EXPLANTES A LA OXIDACIÓN Y CONTAMINACIÓN POR MICROORGANISMOS.

La oxidación que se observó durante esta prueba no fue significativa, iniciándose en donde se habían realizado el corte, tornándose el explante de un color verde a café oscuro, debido a la proliferación de fenoles, contrarrestándose en gran parte con el carbón activado (1%), para evitar así su oxidación. Calderón E. (2000) comenta que los explantes de especies leñosas como el del palto son expuestas a la oxidación, lo que no permite que haya desarrollo y crecimiento de los brotes en el cultivo *in vitro*.

De los tratamientos que presentaron mayor porcentaje de oxidación al 20 % fueron: T1 (0.5 mg/l⁻¹ de BAP + 0.5 mg/l⁻¹ de AG3), T4 (1.5 mg/l⁻¹ de BAP + 0.5 mg/l⁻¹ de AG3), T8 (3.0 mg/l⁻¹ de BAP y 0.5 mg/l⁻¹ de AG3)

Por el contrario, los tratamientos que no presentaron oxidación fueron: T5 (1.5 mg/l de BAP y 1.0 mg/l de AG3), T7 (3.0 mg/l de BAP y 0.5 mg/l de AG3), T9 (3.0 mg/l de BAP y 1.5 mg/l de AG3).

Los tratamientos restantes como: T2, T3 y T6 presentaron 10 % de oxidación, la cual pudo observarse al momento de realizar la lectura a los 30 días de inoculados los segmentos nodales.

Esto debido a que a mayor tiempo de demora en la siembra el segmento nodal tiende a fenolizarse, y así evita seguidamente la brotación de la misma. Como pudo observarse en esta investigación, la concentración de ciertos componentes contenidos en el medio de cultivo puede influir en la oxidación de los segmentos nodales.

Otro punto a tener en cuenta es la contaminación, esto se debió al cuidado en la siembra y en el área de incubación donde permanecieron los medios de cultivo, ya que es de gran importancia que el área de siembra y el de incubación sea aséptica.

El principal método de regeneración de plantas *in vitro* en especies leñosas lo constituye al sembrar vía organogénesis, como el cultivo de yemas axilares presentes en los segmentos nodales de las ramas. Sin embargo, la iniciación *in vitro* de cualquier especie es afectado por la presencia de contaminantes ya sea por bacterias, hongos o ambos, así como también por la oxidación fenólica de los explantes (Hernández & González, 2010).

La mayoría de autores, han confirmado este problema en la inducción de segmentos nodales *in vitro* utilizando como donantes plantas adultas de *Persea americana*. y para solucionar estas afectaciones han realizado investigaciones con respecto al tipo de explante (Rivero *et al.*, 2001), a las diferentes metodologías de desinfección superficial (Ramírez Villalobos *et al.*, 2002) y al efecto de sombra que es sometida la planta donante antes de ser llevado al laboratorio, para así reducir la oxidación fenólica en el medio de cultivo (Velázquez *et al.*, 2004). No obstante, los resultados no han sido del todo eficaz. En la investigación de Rivero *et al.* (2001) hubo un incremento en la contaminación por hongos y bacterias (82%) ya que los segmentos nodales se encontraban más distantes de la yema apical de la rama.

Cabe señalar que en los resultados obtenidos no fue tan afectada por la presencia de contaminantes como bacterias y hongos, donde su presencia impiden el desarrollo de los explantes ya que se usó alcohol al 70% e hipoclorito de sodio al 2% por 3 minutos. Usando etanol al 70 % y una solución de hipoclorito de sodio (NaClO) 0.5% durante 30 min y 2 % por 3 min., Cooper (1987) redujo de 70% de contaminación en el cultivar Duke 7 a 16%.

En la *tabla 2* se presentan de manera detallada los números y porcentajes de explantes con oxidación, así como el porcentaje de sobrevivencia. (Borges García & Sosa Tabarez, 2008)

Tabla 2. Resultados de sobrevivencia a la oxidación de explantes de palto *Persea americana* var. Hass utilizando carbón activado al 1 % a los 30 días de la inoculación en los medios.

Tratamientos	BAP (mg/l)	AG3 (mg/l)	N° de explantes introducidos	N° de explantes vivos	N° de explantes oxidados o contaminados	Porcentaje de oxidación y contaminación (%)	Porcentaje de sobrevivencia (%)
Blanco (testigo)	0	0	10	10	0	0	100
1	0.5	0.5	10	7	3	30	70
2	0.5	1.0	10	9	1	10	90
3	0.5	1.5	10	9	1	10	90
4	1.5	0.5	10	8	2	20	80
5	1.5	1.0	10	10	0	0	100
6	1.5	1.5	10	9	1	10	90
7	3.0	0.5	10	10	0	0	100
8	3.0	1.0	10	8	2	20	80
9	3.0	1.5	10	10	0	0	100

Tabla 3 ANOVA sobrevivencia a la oxidación de explantes de palto *Persea americana* var. Hass utilizando carbón activado al 1 % a los 30 días de la inoculación en los medios.

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Tratamientos	1,000	9	,111	1,250	,275
Error	8,000	90	,089		
Experimental					
Total	9,000	99			

La Significancia $p = 0,275 > 0,05$, entonces los tratamientos no han generado diferencia promedio significativo de sobrevivencia a la oxidación de segmentos nodales.

Debido a que sólo se usó una concentración para evitar la oxidación que consistió en 1 % de carbón activado todos los tratamientos fueron similares en lo que respecta a la sobrevivencia.

4.2. PORCENTAJE DE BROTAION

4.2.1. Brotación obtenida a los 30 días

Luego de 30 días de inoculados los segmentos nodales, el mejor tratamiento con un mayor porcentaje de brotación fue el del tratamiento 7 (3.0 BAP+0.5 AG3) con un 100 % de brotación, seguido de los tratamientos 1 (0.5BAP+0.5 AG3), Blanco (0.0 BAP+0.0 AG3) y 9 (3.0 BAP+1.5 AG3), los tres con un 70 % de brotación.

En la *tabla 4* se presentan de forma detallada cada uno de los tratamientos así como sus respectivos porcentajes de brotación y/o porcentajes de no brotación, en donde se pudo observar que en cuanto a la combinación de las dosis de giberelina y citoquinina utilizados para la inducción de brotes, el que mayor porcentaje de brotación fue el del tratamiento 7 (3.0 mg/l de BAP + 0.5 mg /l de AG3), lo que se recomienda que el uso de ácido giberélico en bajas concentraciones combinando con citoquininas, favorece de manera más idónea

la brotación en segmentos nodales de palto *Persea americana* var. Hass. (Roca & Mroginski, 1991)

Por el contrario, aplicaciones de BAP combinado con AG3 en altas concentraciones hizo que la brotación sea escasa o no hubo ninguna respuesta como en el caso de los tratamientos 6 (1.5 BAP+1.5 AG3) donde el porcentaje de brotación fue de 10 %, el tratamiento 2(0.5 BAP+ 1.0 AG3) , el tratamiento 5 (1.5 BAP+1.0 AG3), el tratamiento 8 (3.0 BAP+1.0 AG3) que presentaron un 30 % de brotación. (Aldelnour & Vicent, 1994)

Tabla 4 Respuesta del Palto *Persea americana* var. Hass a la inducción de brotes a los 30 días de haber sido inoculados.

Tratamiento	BAP (mg/l)	AG3 (mg/l)	N° de explantes introducidos	Explantes con brotación	Explantes sin brotación	Porcentaje de Explantes con brotación (%)	Porcentaje de sin brotación (%)
Blanco (testigo)	0	0	10	6	4	60	40
1	0.5	0.5	10	5	5	50	50
2	0.5	1.0	10	3	7	30	70
3	0.5	1.5	10	4	6	40	60
4	1.5	0.5	10	4	6	40	60
5	1.5	1.0	10	3	7	30	70
6	1.5	1.5	10	1	9	10	90
7	3.0	0.5	10	7	3	70	30
8	3.0	1.0	10	3	7	30	70
9	3.0	1.5	10	5	5	50	50

Tabla 5 ANOVA inducción de los brotes a los 30 días de la inoculación.

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Tratamientos	8,090	9	,899	2,192	,030
Error Experimental	36,900	90	,410		
Total	44,990	99			

La Sig. $p = 0,030 < 0,05$, entonces los tratamientos han generado diferencia promedio significativo en los brotes a los 30 días de inoculación. En consecuencia, las diferencias se muestran en la siguiente Tabla 7.

Tabla 6 Prueba de comparaciones múltiples mediante la prueba de Duncan sobre la inducción de brotes a los 30 días de la inoculación.

Tratamientos	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
		1	2	3
6	1 0	,10		
2	1 0	,30	,30	
5	1 0	,30	,30	
3	1 0	,40	,40	
4	1 0	,40	,40	
8	1 0	,40	,40	
9	1 0	,50	,50	,50
0	1 0		,80	,80
1	1 0		,80	,80
7	1 0			1,10
Sig.		,237	,142	,057

Los promedios de brotes que son significativamente diferentes por efecto de los tratamientos son los siguientes: $\mu_{T6} \neq \mu_{T0}$ $\mu_{T6} \neq \mu_{T1}$ $\mu_{T6} \neq \mu_{T7}$

La prueba de Duncan (Tabla 6) nos permite observar que BAP con 3 mg/L⁻¹ en combinación de 0.5 mg/L⁻¹ de AG3 (Tratamiento 7) permitió un mayor brotamiento a los 30 días sembrados a comparación de los otros tratamientos, ya que el BAP es una citoquinina muy utilizado para inducir el brotamiento de segmentos nodales en especies forestales debido a su efectividad, costos y facilidad de manejo, previamente (Paredes, 2009).

Diversas investigaciones han demostrado los resultados convenientes del uso de BAP y otras citoquininas en la multiplicación in vitro de especies leñosas, las cuales coinciden con Dalsaso L (1988), al obtener resultados ideales en los medios que contenían 3 mg /L⁻¹ de BAP, donde se hubo un mayor crecimiento y desarrollo de brotes en lo que respecta explantes de palto.

Tabla 7 Datos del número de hojas por brote a los 30 días de siembra.

TRATAMIENTOS	BAP	AG3	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	TOTAL	PROMEDIO
Blanco T0	0	0	2	0	0	0	0	0	1	0	2	0	5	0.5
Tratamiento 1	0.5	0.5	2	0	2	2	0	1	2	0	0	0	9	0.9
Tratamiento 2	0.5	1.0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0.1
Tratamiento 3	0.5	1.5	0	0	0	0	1	1	2	0	0	0	4	0.4
Tratamiento 4	1.5	0.5	0	0	2	0	1	0	1	0	0	0	4	0.4
Tratamiento 5	1.5	1.0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0.1
Tratamiento 6	1.5	1.5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Tratamiento 7	3	0.5	2	2	2	3	0	3	3	0	3	0	18	1.8
Tratamiento 8	3	1.0	2	2	2	0	0	0	0	0	0	0	6	0.6
Tratamiento 9	3	1.5	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	5	0.5

En cuanto al número de hojas por brote, se realizó una evaluación de cada explante por tratamiento ,haciendo un conteo con respecto a la brotación con el fin de poder determinar cuál de los tratamientos obtuvo mejores resultados por explante, dando como resultado que el tratamiento con una combinación de 3 mg/L⁻¹ de BAP y 0.5 mg/L⁻¹ de AG₃ (tratamiento 7) presenta un promedio de 1.8 hojas a diferencia de los tratamientos 2, 5 y 6 en donde hay mayor concentración de AG₃ la cual no favorece la presencia de brotamiento y por lo consiguiente hojas . En una investigación Dalsaso et al., (1988) en concentraciones de BAP Y AG₃, encontraron que con el medio AG₃ los explantes presentaron una fuerte oxidación, mientras que en presencia de BAP un número elevado de yemas permanecieron verdes; la mejor respuesta fue de 2 mg /L⁻¹ de BAP y en escasa presencia de AG₃ que permitió el desarrollo de la yema.

En ensayos posteriores Smith, (2013) encontró que la combinación de 2 mg/L⁻¹ de BAP y 0.5 mg/L⁻¹ de AG₃ permite un mayor desarrollo de brotación a partir de yemas de palto *P.americana* var. Hass provocando que presente el mayor número de hojas similar al del tratamiento obtenida en esta investigación.

Tabla 8 ANOVA número de hojas por brote de los diferentes tratamientos a los 30 días de la siembra.

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Tratamientos	25,610	9	2,846	4,665	,000
Error Experimental	54,900	90	,610		
Total	80,510	99			

La Sig. $p = 0,000 < 0,05$, entonces los tratamientos han generado diferencia promedio significativo en el número de hojas por brote de los diferentes tratamientos a los 30 días de la siembra, por lo tanto las diferencias se muestran en la siguiente Tabla 9.

Tabla 9 Prueba de comparaciones múltiples mediante la prueba de Duncan sobre el total de hojas de los diferentes tratamientos a los 30 días de la siembra.

Tratamientos	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
		1	2	3
6	10	,00		
2	10	,10	,10	
5	10	,10	,10	
3	10	,40	,40	
4	10	,40	,40	
9	10	,50	,50	
8	10	,60	,60	
0	10		,90	
1	10		,90	
7	10			1,80
Sig.		,144	,052	1,000

Los promedios del número de hojas que son significativamente diferentes por efecto de los tratamientos son los siguientes: $\mu_{T6} \neq \mu_{T0}$ $\mu_{T6} \neq \mu_{T1}$ $\mu_{T6} \neq \mu_{T7}$
 $\mu_{T0} \neq \mu_{T7}$ $\mu_{T1} \neq \mu_{T7}$

Si el interés es por el mayor número promedio de hojas, se recomienda el T7.

Las diferencias significativas para el número de hojas de las plántulas nos explican de manera precisa que las respuestas de los explantes frente a las hormonas BAP y AG₃, a diferentes concentraciones no son las mismas ya que, las hormonas ejercen efectos diferentes de acuerdo a las concentraciones utilizadas y el tratamiento que favoreció fue el T7 (3 mg/L⁻¹ BAP + 0.5 mg/L⁻¹ AG₃) (Dalsaso & Guevara, 1988).

4.2.2. Brotación obtenida a los 60 días

En la tabla 10 se presenta cada uno de los tratamientos con sus respectivos porcentajes de brotación y/o porcentajes de no brotación a los 60 días de incubación , en donde se pudo observar , en cuanto a la combinación tanto de citoquininas y giberelina utilizados para la inducción de brotes en la investigación, la que mayor porcentaje de brotación presentó fue la combinación del tratamiento 7 con 100 % , lo que sugiere que el uso de ácido giberélico en bajas concentraciones combinando con citoquininas como es el BAP , promueve eficazmente la brotación y crecimiento de las yemas de palto *Persea americana* var. Hass. (Roca & Mroginski, 1991)

Por el contrario, aplicaciones de BAP combinado con AG₃ en altas concentraciones la brotación fue baja como en el caso de los tratamientos 6 (1.5 BAP+1.5 AG₃) donde el porcentaje de brotación fue de 30 % , el tratamiento 5 (1.5 BAP+1.0 AG₃) con 50 % y el tratamiento 8 (3.0 BAP+1.0 AG₃) que presentaron un 50 % de brotación. Los demás tratamientos presentaron un porcentaje de brotación medio del 40 % (Aldelnour & Vicent, 1994)

Para la variable de brotes el mejor tratamiento fue el suplementado con 3 mg/L BAP. Estos datos no concuerdan con el estudio que realizaron Muñoz *et al.* (1999) donde observaron de 7 a 15 brotes por explante establecido como

respuesta a las hormonas BAP y AG₃. Estos investigadores también obtuvieron elongación en los tallos y formación de hojas en porcentajes mayores al 50% lo que nos indica que estas fitohormonas son necesarias para la obtención de brotes.

Los datos de nuestra investigación coinciden con los estudios Rodríguez *et al.*, (1999) y Peixoto *et al.* (2010) quienes obtienen brotes múltiples con la adición de BAP con un 85% de supervivencia. La fitohormona BAP induce la formación de callo en cítricos siendo probada a distintas concentraciones. Las fitohormonas BAP y AG₃ inducen el crecimiento de tejido vegetal en especies leñosas.

Tabla 10 Respuesta del palto *Persea americana* var. Hass a la inducción de brotes a los 60 días de la inoculación en medio MS.

Tratamientos	BAP (mg/l)	AG3 (mg/l)	N° de explantes introducidos	Explantes con brotación	Explantes sin brotación	Explantes con brotación (%)	Explantes sin brotación (%)
blanco (testigo)	0	0	10	8	2	80	20
1	0.5	0.5	10	7	3	70	30
2	0.5	1.0	10	6	4	60	40
3	0.5	1.5	10	6	4	60	40
4	1.5	0.5	10	6	4	60	40
5	1.5	1.0	10	5	5	50	50
6	1.5	1.5	10	3	7	30	70
7	3.0	0.5	10	10	0	100	0
8	3.0	1.0	10	5	5	50	50
9	3.0	1.5	10	7	3	70	30

Tabla 11 ANOVA Inducción de brotes a los 60 días de la inoculación.

	Suma de cuadrados	Gl	Media cuadrática	F	Sig.
Tratamientos	52,090	9	5,788	7,030	,000
Error Experimental	74,100	90	,823		
Total	126,190	99			

La Sig. $p = 0,000 < 0,05$, entonces los tratamientos han generado diferencia promedio significativo en los brotes a los 60 días de inoculación a lo largo de los tratamientos. En consecuencia, las diferencias se simplifican en la Tabla 12.

Tabla 12 Prueba de comparaciones múltiples mediante la prueba de Duncan sobre la inducción de brotes a los 60 días de la inoculación.

Tratamientos	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
		1	2	3
6	10	,20		
2	10	,60		
8	10	,70	,70	
3	10	,90	,90	
4	10	,90	,90	
5	10	,90	,90	
9	10	1,00	1,00	
0	10	1,10	1,10	
1	10		1,60	
7	10			3,00
Sig.		,060	,057	1,000

Los promedios de brotes que son significativamente diferentes por efecto de los tratamientos son los siguientes: $\mu_{T6} \neq \mu_{T1}$ $\mu_{T6} \neq \mu_{T7}$ $\mu_{T2} \neq \mu_{T1}$ $\mu_{T2} \neq \mu_{T7}$

Si el interés es por el mayor brote promedio, se remienda el T7

Tabla 13 Datos del número de hojas por brote de los diferentes tratamientos a los 60 días de ser inoculados en el medio MS.

Tratamiento	BAP	AG3											TOTAL	PROMEDIO
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
Blanco (testigo)	0	0	2	1	1	1	2	0	1	0	4	3	15	1.5
Tratamiento 1	0.5	0.5	8	5	8	4	3	1	7	0	0	0	36	3.6
Tratamiento 2	0.5	1.0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0.2
Tratamiento 3	0.5	1.5	1	0	2	0	4	3	6	0	1	0	17	1.7
Tratamiento 4	1.5	0.5	0	0	5	3	5	0	5	3	1	0	22	2.2
Tratamiento 5	1.5	1.0	0	6	0	5	0	0	4	0	0	0	15	1.5
Tratamiento 6	1.5	1.5	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	2	0.2
Tratamiento 7	3.0	0.5	8	7	3	6	7	3	4	5	7	4	54	5.4
Tratamiento 8	3.0	1.0	2	3	4	3	0	0	0	0	0	0	12	1.2
Tratamiento 9	3.0	1.5	2	3	4	2	0	5	4	2	0	0	22	2.2

A los 60 días hubo una variación en el número de hojas a comparación de los 30 días que mayormente había solo una brotación por parte de los tratamientos. Obteniendo los siguientes



Figura 8. Promedio de hojas de la plántula en los tratamientos a los 60 días de haber sido introducido al medio *in vitro* de *P. americana* Var. Hass.

Tabla 14 ANOVA número de hojas por brote de los diferentes tratamientos a los 60 días de ser introducidos en el medio de cultivo MS.

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Tratamientos	275,800	9	30,644	8,722	,000
Error Experimental	316,200	90	3,513		
Total	592,000	99			

La tabla ANOVA divide la varianza de Número de hojas en dos componentes: un componente entre tratamientos y un componente de error experimental. La razón F, es igual a 8.722, es el cociente entre tratamiento y el error experimental. Ya que el valor-P es menor que 0.05 (nivel de significancia), existe una diferencia estadísticamente significativa entre las medias con respecto al número de hojas entre los tratamientos de la investigación, con un 95% de confianza (Tabla 14).

La Sig. $p = 0,000 < 0,05$, entonces los tratamientos han generado diferencia promedio significativo en el número de hojas por brote a los 60 días de haber sido sembradas. Por lo tanto, las diferencias se detallan en la siguiente Tabla 15.

Tabla 15 Prueba de comparaciones múltiples mediante la prueba de Duncan sobre el número de hojas por brote a los 60 días de la siembra.

Tratamientos	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
		1	2	3
6	10	,40		
2	10	1,30	1,30	
8	10	1,30	1,30	
5	10	1,50	1,50	
4	10	1,70	1,70	
0	10	1,90	1,90	
3	10	1,90	1,90	
9	10	2,20	2,20	
1	10		3,00	
7	10			6,80
Sig.		,069	,087	1,000

Los promedios del número de hojas que son significativamente diferentes por efecto de los tratamientos son los siguientes: $\mu_{T6} \neq \mu_{T1}$ $\mu_{T6} \neq \mu_{T7}$ $\mu_{T1} \neq \mu_{T7}$

La prueba Duncan (Tabla 15) para número de hojas por plántula, arroja como mejor tratamiento T7, produciendo una diferencia significativa frente al resto de tratamientos, siendo el promedio de hojas por plántula de 5.4 hojas.

En lo que respecta al Tratamiento testigo que obtuvo el 80 % de brotación, similar al del tratamiento 7 la cual estuvo adicionado por hormonas de 3 mg/L⁻¹ de BAP Y 0.5 AG3 mg/L⁻¹, que dio como resultado el 100 % de brotación, Thomas (2008), en sus investigaciones donde usó carbón activado en cultivo de tejidos vegetales sin adición de hormonas, observó que promueve el crecimiento y desarrollo celular, siendo de gran importancia en la micropropagación, elongación de tallos, desarrollo de hojas, etc., además tiene otros efectos como la adsorción irreversible de compuestos inhibitorios en el medio de cultivo, y disminuyendo los metabolitos tóxicos, exudación fenólica y la acumulación de exudados que producen oscurecimiento en el medio de cultivo. Otro punto que tomó en cuenta para dichos resultados es que las plantas poseen hormonas endógenas las cuales permiten su desarrollo en presencia de un medio de cultivo sin presencia de hormonas.

Así como lo demostrado en los resultados en la investigación

- En las figuras se muestra la respuesta de los explantes de la variedad Hass a los mejores tratamientos en la inducción



Figura 9. Brotes del tratamiento 0 – Blanco.

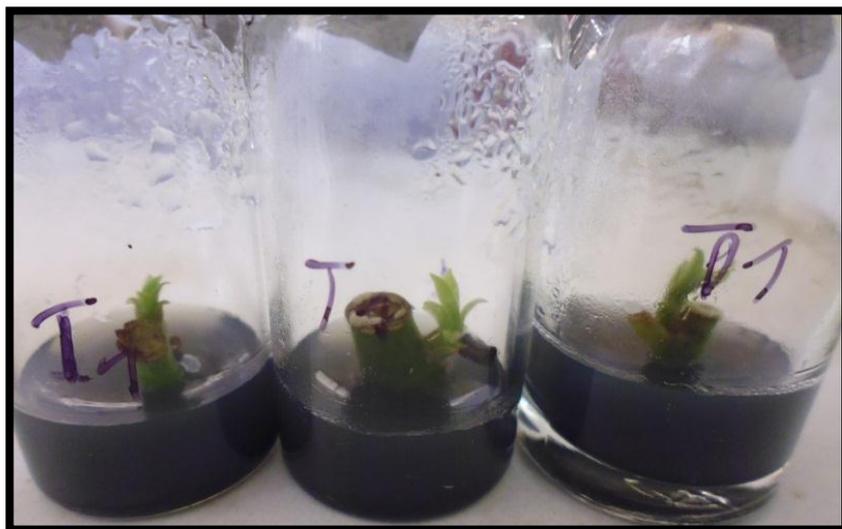


Figura 10. Brotación en Tratamiento 01



Figura 11. Brotación en Tratamiento 07

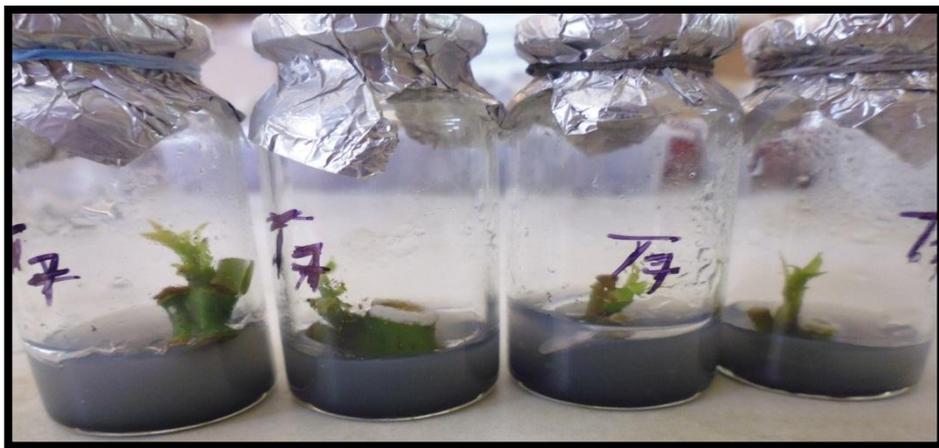


Figura 12. Mejores muestras de Tratamiento 07.



Figura 13. Muestras de tratamiento 9.

V. CONCLUSIÓN

La combinación de bencilaminopurina 3 mg/L⁻¹ y ácido giberélico 0.5 mg/L⁻¹ presentó los mejores resultados con un mayor porcentaje en el número de brotes en nudos de Palta Hass (*Persea americana*).

La combinación de bencilaminopurina 3mg/L y ácido giberélico 0.5mg/L presentó los mejores resultados con un mayor porcentaje en el número de hojas en nudos de Palta Hass (*Persea americana*).

El tratamiento que presentó menor resultado favorable en cuanto a la brotación y en número de hojas por brote para *Persea americana* Var. Hass, fue la combinación de 1.5 mg/L⁻¹ de bencilaminopurina y 1.5 mg/L⁻¹ de ácido giberélico.

La contaminación que se presentó al momento de propagar masivamente el material, se debió a que tanto los hongos como las bacterias se encontraban de manera endógena en los explantes dificultando así su propagación.

VI. BIBLIOGRAFÍA

- Aldelnour, A., & Vicent, J. (1994). *Conceptos Basicos Del Cultivo de Tejidos Vegetales*. Costa Rica: Catie.
- Barceló Muñoz, A., & Pliego Alfaro, F. (2003). Micropropagation of avocado (*Persea americana* Mill.). *Forestry Sciences*, 519-542.
- Barceló Muñoz, A., Simón Pérez, F., & Pliego Alfaro, F. (1999). Micropropagation of adult avocado. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 11-17.
- Barrientos Priego, A., & López López, L. (2002). Historia y genética del aguacate. *Investigaciones Científicas y Tecnológicas de Aguacate*, 100-121.
- Barrientos Priego, A., Muñoz, R., Reyes, J., & Martínez, M. (2007). *Taxonomía, cultivares y portainjertos*. Mexico: El aguacate y su manejo integrado.
- Barringer, S., Mohamed Yasseen, Y., & Splittstoesser, W. (1996). In vitro multiplication and plantlet establishment of avocado. *Biol. Plant*, 32, 119-121.
- Ben Yaacov, A. (1987). Avocado rootstock-scion relationships. *Avocado Growers*, 30-32.
- Ben Yaacov, A., & Michelson, E. (1995). *Avocado rootstocks*. New York: Horticultural .
- Bergh, B., & Ellstrand, N. (1986). Taxonomy of the avocado. California: Avocado Society.
- Bhojwani, S., & Dantu, P. (2013). Micropropagation. *Plant Tissue Culture*, 17, 245-274.
- Bisonó, p., & Hernández, B. (2008). *Guía Tecnológica sobre el cultivo del aguacate*. Santo Domingo.
- Brokaw, W. (1987). Avocado clonal propagation . *Int. Plant Prop.*, 97-103.

- Calderon Estrada, J. (2000). *Respuesta de dos cultivares de aguacate Persea americana Mill. var. Hass y var. Americana var. Booth-8 al cultivo de tejidos in vitro*. Guatemala: Tesis Ing. Agronoma.
- Campos, P., & Pais, S. (1996). In vitro micropropagation of the macaronesian evergreen tree *Persea indica*. *Biol Plant*, 32, 184-189.
- Castro, M., Oyanedel, E., & Cautin, R. (1995). in vitro shoot proliferation in avocado (*persea americana Mill*) induced by CPPU. *World Avocado*, 223-226.
- Chanderbali, A., Vasco, A., Velasquez, A., & Soltis, P. (2008). *Persea americana* (avocado): bringing ancient flowers to fruit in the genomics. *BioEssays*, 30, 386-389.
- Cob, J., Sabja, A., Ríos, D., Lara, A., Donoso, P., Arías, L., & Escobar, B. (2010). Potencial de la organogénesis como estrategia para la masificación in vitro de *Persea lingue* en la zona centro sur de Chile. *Bosque*, 202-208.
- Cooper, P. (1987). Advances in the micropropagation of avocado (*Persea americana Mill*). *Horticulturae*, 571-575.
- Cortés Rodríguez, M., López Gómez, A., Martínez Pacheco, L., Suárez Rodríguez, A., Hernández García, R., & Salgado Garciglia, R. (2011). In vitro propagation of Mexican race avocado (*Persea americana Mill var. drymifolia*). *Acta Hort.*, 47-52.
- Dalsaso, L., & Guevara, E. (1988). Multiplicación clonal in vitro del aguacate (*Persea americana*). *Agronomía Costarricense*, 61-71.
- De Filippis, L. (2014). Crop improvement through tissue culture. En M. wani, M. Azooz, & L. Tran, *Improvement of crops in the era of climatic changes* (págs. 289-346). New York: Springer.
- De la Viña, G., Barceló Muñoz, A., & Pliego Alfaro, F. (2001). Effect of culture media and irradiance level on growth and morphology of *Persea americana Mill* microcuttings. *Plant Cell*, 229-237.
- Delgado, G. (2013). *Multiplicación clonal in vitro e in vivo de la especie forestal nativa Aniba perutilis*. Colombia: Hemsley.

- Galindo Trovar, M., Arzate Fernández, A., Ogata Aguilar, N., & Landero Torres, I. (2007). The avocado (*Persea americana*, Lauraceae) crop in Mesoamerica: 10,000 years of history. *Harvard Papers in Botany*, 2, 325-334.
- Galindo Trovar, M., Ogata Aguilar, N., & Azarte Fernández, M. (2008). Some aspects of avocado (*Persea americana* Mill.) diversity and domestication in Mesoamerica. *Genet Resour*, 55, 441-450.
- George, E. (1993). *Plant propagation by tissue culture*. US.
- Hernández, Y., & González, M. (2010). Efectos de la contaminación microbiana y oxidación fenólica en el establecimiento in vitro de frutales perennes. *Cultivos Tropicales*, 15-23.
- Knight, R. (1999). *Genetic diversity in avocado*. Florida.
- Kohne, J. (1992). Field evaluation of "Hass" avocado grown on Duke-7, G6 and G755C rootstocks. *Riverside California*, 301-303.
- Kumar, P., & Loh, C. (2012). Plant tissue culture for biotechnology. *Plant Biotechnology and Agriculture*, 131-138.
- Kyte, L., & Kleyn, J. (1996). Plant from test tubes, an introduction to micropropagation. *Timber Press*, 60-75.
- Lahav, E., & Lavi, U. (2007). Genética y mejoramiento clásico. *Universitarias de Valparaíso*, 47-74.
- Ministerio de Agricultura y Riego. (2014). Estudios Económicos e Información Agraria.
- Ministerio de Agricultura y Riego. (2018). Exportación de Palta Hass en el Perú.
- Ministerio de Agricultura y Riego. (2019). Producción de Palta Hass en la región de Ancash.
- Mohamed Yasseen, Y. (1993). In vitro propagation of avocado (*Persea americana* Mill). *California Avocado Society*, 107-111.

- Moreno Limón, S., Rocha Estrada, A., Alvarado Vázquez, M., Salgado Mora, M., & Pinson Rincón, P. (2010). *Aguacate, Variedades, cultivo y producción en Nuevo León*. Mexico: Nuevo León.
- Mroginski, L., Sansberro, P., & Flanschland, E. (2010). Establecimiento de cultivos Vegetales, Biotecnología y mejoramiento vegetal. *Argenbio*, 70-84.
- Muñoz, E., Villar, B., & Oller, J. (1999). *Método de desinfección y efecto de citocininas en el cultivo in vitro de segmentos de hojas de Psidium guajava L.* Mexico.
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised médium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiology Plantarum*, 473-497.
- Nhut, D., Thi, N., Khirt, V., & Luan, Q. (2008). Peptone stimulates in vitro shoot and root regeneration of avocado (*Persea americana* Mill). *Scientia Horticulturae*, 124-128.
- Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. (24 de mayo de 2017). Obtenido de Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación: <http://faostat.fao.org/site/291/default.aspx>
- Paredes, I. (2009). *Utilización de Giberelinas en explantes vegetales*. Mexico.
- Peixoto, M. (2010). Producción y composición química de palma forrajera micropropagada in vitro. *Revista Brasileña de Sanidad y Producción Animal*, 11(4), 953-960.
- Peña, R. (2012). *Biotecnología, clonación e ingeniería genética: Principios básicos y aplicaciones al alcance de todos*. Perú-Lima.
- Pliego Alfaro, F., & Murashige, T. (1987). Possible rejuvenation of adult avocado by graftage onto juveline rootstocks in vitro. *Hort. Science*, 1321-1324.
- Premkumar, A., Barcelo Muñoz, A., Pliego Alfaro, F., Quesada , M., & Mercado, J. (2001). Influences of exogenous sucrose on juvenile avocado during in vitro cultivation and subsequent ex vitro acclimatization . *Trees*, 569-575.

- Ramírez Villalobos, M., Urdaneta, A., & León de Sierralta, S. (2002). *Establecimiento in vitro de explantes adultos de guanábano (Annona muricata L.) Tratados con hipoclorito de sodio*. Venezuela.
- Read, P., & Bavougian, C. (2013). In vitro rejuvenation of woody species, protocols for micropropagation of selected economically-important horticultural plants . *Springer*, 383-395.
- Rivero , G., Ramírez, M., & De Sierralta, S. (2001). Tipo de explante en el establecimiento in vitro de guanábano (Annona muricata L.). *Fac. Agrónoma*, 258-265.
- Roca, W., & Mroginski, L. (1991). *Cultivo de Tejidos en la Agricultura: Fundamentos y Aplicaciones*. Cali, Colombia: Centro internacional de Agricultura Tropical.
- Rodríguez, N., Capote, M., & Zamora, V. (1999). Cultivo in vitro del aguacatero (Persea americana Mill). *Chapingo Serie Horticultura Número Especial*, 231-237.
- Sharry, S., Adema, M., & Abedini, W. (2006). *Manual para la propagación de plantas por cultivo de tejidos in vitro*. Argentina: Edulp.
- Smith, C. (1969). Additional notes on Pre-conquest avocados in Mexico. *Economic Botany*, 135-140.
- Smith, R. (2013). Plant tissue culture, techniques and experiments. *Elsevier*, 45-62.
- Téliz, D., & Mora, A. (2007). *El aguacate y su manejo integrado*. Mexico: Mundi Prensa.
- Thomas, T. (2008). The role of activated charcoal in plant tissue culture. *Biotechnology Advances*, 26, 618-631.
- Torres , A., Teixeira Ferreira, A., & Campos de Araujo, M. (1996). *Medio de cultivo*. Brasilia.
- Valentín Samayoa, J. (2005). *Respuesta de dos genotipos de aguacate (Persea americana var. Mill) a la micropropagación utilizando diferentes*

combinaciones de auxinas y citocininas, realizado en el laboratorio de cultivo vegetales. Guatemala: Tesis Universidad de San Carlos Guatemala.

Velázquez , M., González, A., Mata, F., León de Sierralta, S., Esparza, D., & Ramírez, M. (2004). Tipo de sombreamiento y tiempo de crecimiento de brotes laterales sobre la viabilidad de explantes de *Annona Muricata* L. *Fac. Agrónoma*, 12-18.

Vidales Fernández, I. (2002). *Efecto de los reguladores de crecimiento en los procesos de organogénesis y embriogénesis somática de aguacate (Persea americana Mill)*. Mexico: Tesis Universidad de Colima.

Vidallie, H. (1986). Cultivo in vitro. En E. d. Espejo, *Cultivo in vitro* (págs. 42-52). Mexico: Científica.

Villalobos, V., & Thorpe, T. (1991). Micropropagación: conceptos, metodología y resultados. *Cultivo de tejidos en la Agricultura*, 127-141.

Williams, L. (1976). the botany of the avocado and its relatives. *International Tropical Fruit* , 9-15.

Zirari, A., & Lionakis, S. (1994). Effect of cultivar, explant type, etiolation pretreatment and the age of plant material on the in vitro regeneration ability of avocado (*Persea americana*). *Horticulturae*, 69-76.

Zulfiqar, B., Abbasi, N., Ahmad, T., & hafiz, A. (2009). Effect of explant sources and different concentrations of plant growth regulators on in vitro shoot proliferation and rooting of avocado (*Persea americana* Mill). *Botanica*, 2333-2346.

VII. RECOMENDACIONES

La dosis de carbón activado al 1.0 % redujo de manera significativa en un 90 % la oxidación, por lo que en estudios futuros deberán realizarse pruebas con dosis cercanas al 1.0 % para tratar de controlar en un 100 % la oxidación de la palta.

Evaluar en investigaciones futuras otros medios de cultivo con el fin de determinar si alguno podría ser más efectivo que el MS.

Evaluar en investigaciones futuras otros antioxidantes aparte del carbón activado para la reducción de oxidación en los medios de cultivo en las siembras *in vitro*.

Realizar estudios a nivel de laboratorio, basándose en los tratamientos que presentaron los mejores resultados para la variedad Hass, evaluando así rangos más cercanos a los valores obtenidos en la presente investigación para poder obtener mayor número de brotes.

Implementar el laboratorio de Biotecnología Agrícola en equipos y materiales y mantenerlo asépticamente para evitar la contaminación de los medios de cultivo e incrementar el rendimiento de los mismos.

ANEXOS



Anexo 1. Hormonas utilizadas para preparación del medio con diferentes concentraciones de BAP Y AG3



Anexo 2. Pesado de agar y sacarosa para la preparación del medio de cultivo.



Anexo 3. Incubación de los tratamientos con los segmentos nodales introducidos en los medios de cultivo.



Anexo 4. Tratamientos: T3, T4, T5 con los segmentos nodales introducidos en los medios de cultivo.



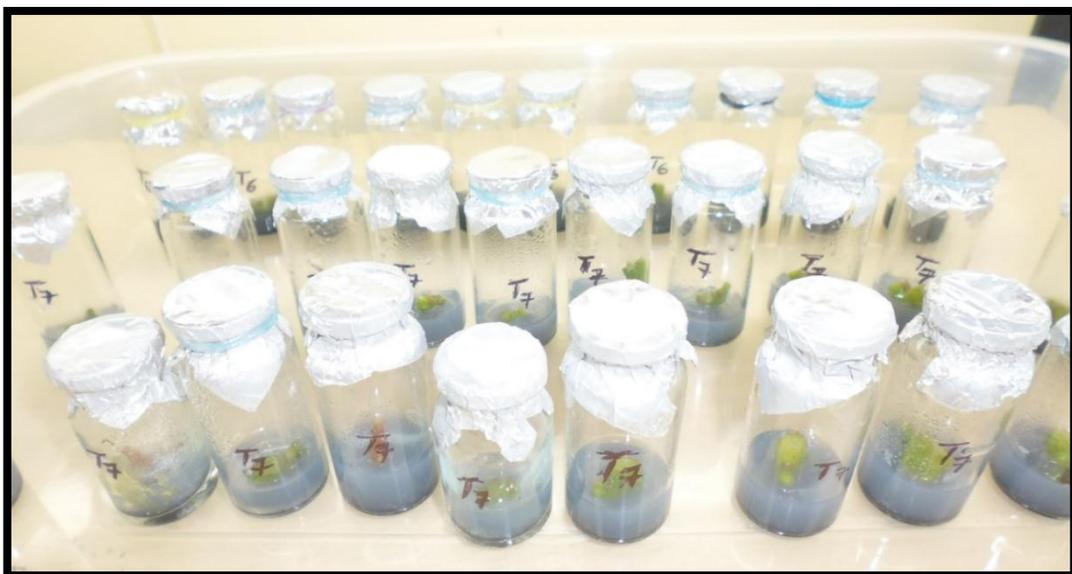
Anexo 5. Tratamientos: Blanco, T8, T9 con los segmentos nodales introducidos en los medios de cultivo.



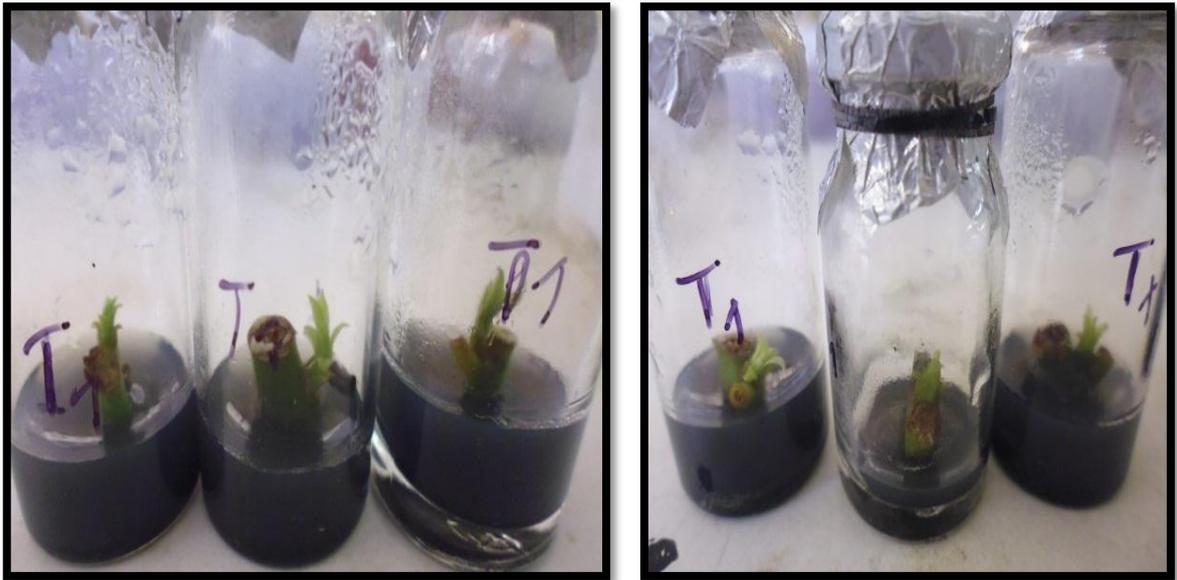
Anexo 6. Tratamientos: T1, T2, T7 con los segmentos nodales introducidos en los medios de cultivo.



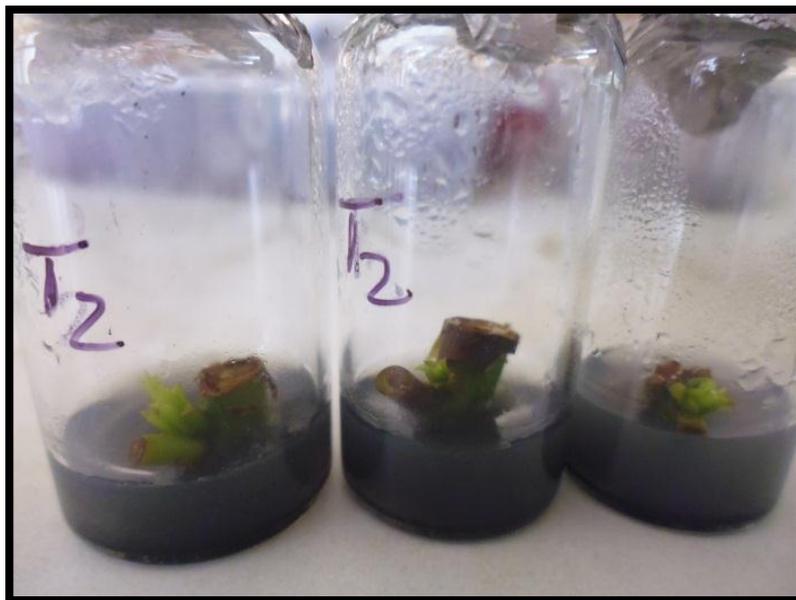
Anexo 8. Explantes a los 60 días que no fueron expuestos a tratamiento de BAP Y AG3.



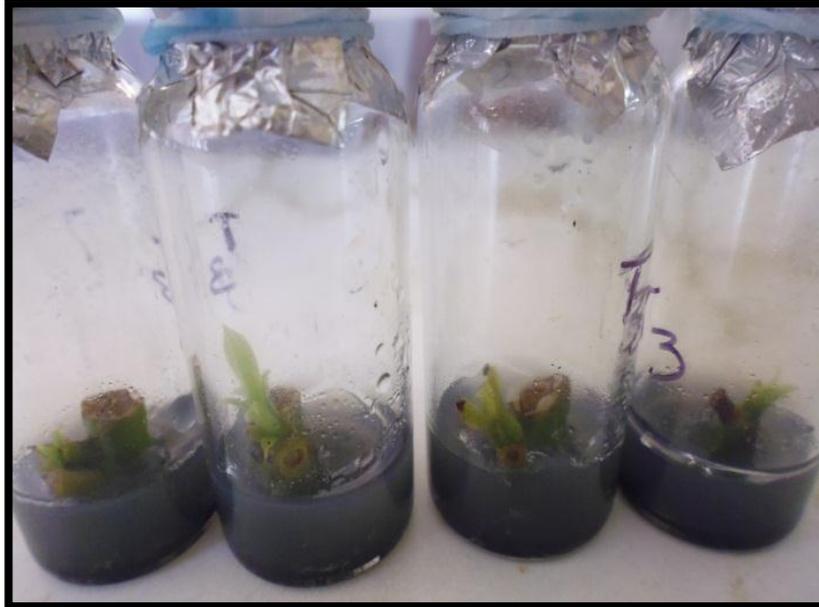
Anexo 7. Tratamientos: T3, T4, T5 con los segmentos nodales introducidos en los medios de cultivo.



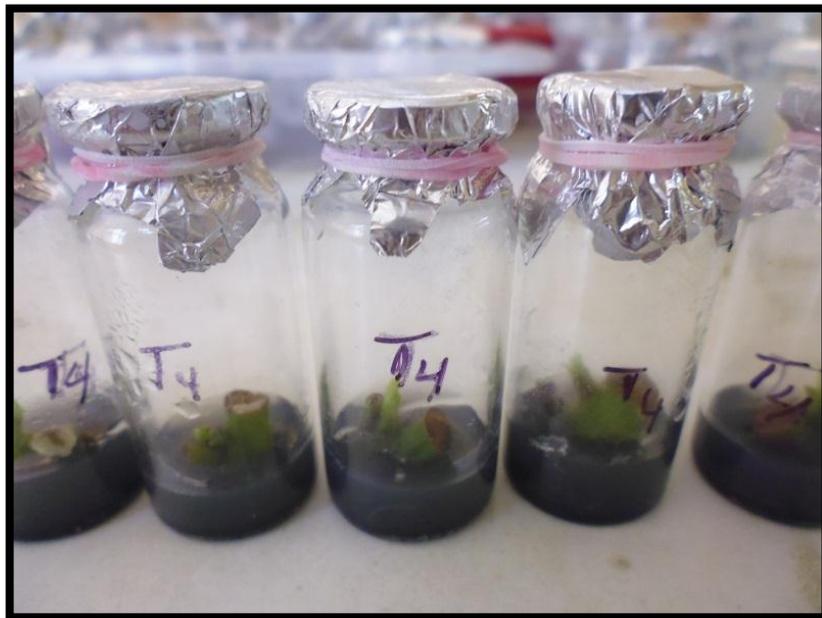
Anexo 9. Explantes a los 60 días expuestos al T1 (0.5 BAP + 0.5 AG3)



Anexo 10. Explantes a los 60 días al ser expuestos al T2 (0.5 BAP + 1.0 AG3)



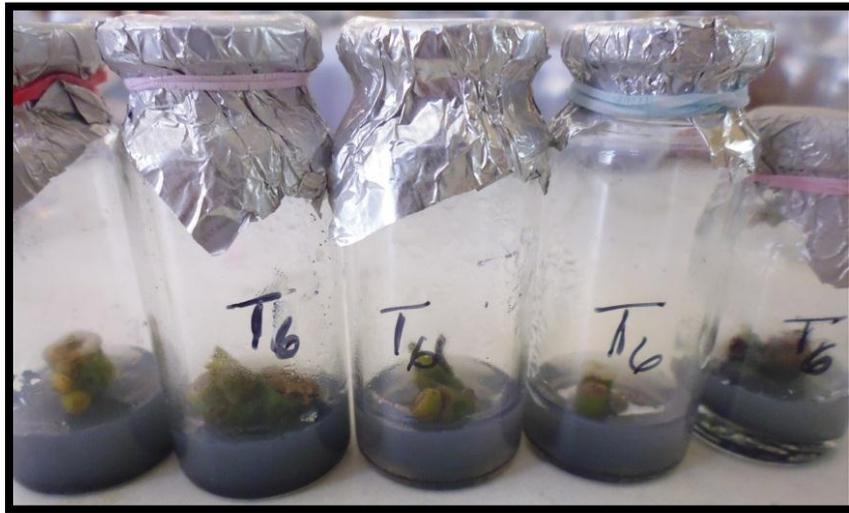
Anexo 11. Explantes a los 60 días de ser expuestos al T3
(0.5 BAP + 1.5 AG3)



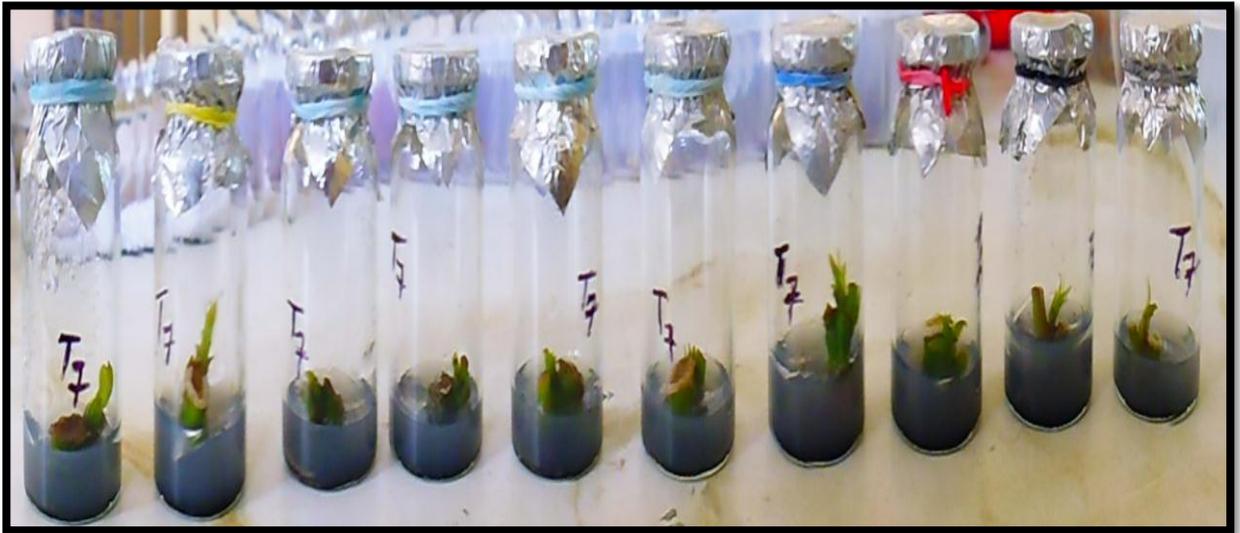
Anexo 12. Explantes a los 60 días expuestos al T4 (1.5
BAP + 0.5 AG3)



Anexo 13. Explantes a los 60 días expuestos al T5 (1.5 BAP + 1.0 AG3)



Anexo 14. Explantes a los 60 días expuestos al T6 (1.5 BAP + 1.5 AG3)



Anexo 15. Explantes a los 60 días expuestos al T7 (3.0 BAP + 0.5 AG3).



Anexo 16. Explantes a los 60 días expuestos al T8 (3.0 BAP + 1.0 AG3)



Anexo 17. Explantes a los 60 días expuestos al T9 (3.0 BAP + 1.5 AG3)

Anexo 18. Procedimiento de preparación de las Hormonas:

A. BAP [1000 ppm]

- Pesar 0.05 g de BAP y disolverlo en gotas de NaOH 1N.
- Añadir 50 ml de H₂O destilada (aforar).
- Colocar el contenido en un frasco hermético y oscuro (forrar con papel aluminio).

B. AG3[1000 ppm]

- Pesar 0.05 g de AG3 y disolverlo en gotas de alcohol.
- Aforar a 50 ml de H₂O destilada.
- Colocar el contenido en un frasco hermético y oscuro.

Anexo 19. Conteo de hojas a los 60 días expuestos a los diferentes tratamientos de BAP Y AG₃.

Tabla 01. Resultados de los explantes a los 60 días expuestos a los diferentes tratamientos de BAP Y AG₃.

TRATAMIENTOS	TOTAL DE N° DE HOJAS	PROMEDIO DE N° DE HOJAS
T0	15	1.5
T1	36	3.6
T2	2	0.2
T3	17	1.7
T4	22	2.2
T5	15	1.5
T6	2	0.2
T7	54	5.4
T8	12	1.2
T9	22	2.2

Anexo 20. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Tabla 02. Diseño experimental completamente al azar.

Repeticiones	T0	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9
1	2	8	0	1	0	0	0	8	2	2
2	1	5	2	0	0	6	0	7	3	3
3	1	8	0	2	5	0	2	3	4	4
4	1	4	0	0	3	5	0	6	3	2
5	2	3	0	4	5	0	0	7	0	0
6	0	1	0	3	0	0	0	3	0	5
7	1	7	0	6	5	4	0	4	0	4
8	0	0	0	0	3	0	0	5	0	2
9	4	0	0	1	1	0	0	7	0	0
10	3	0	0	0	0	0	0	4	0	0
Yi	15	36	2	17	22	15	2	54	12	22

- Suma de todos los valores experimentales:

$$\Sigma = 197$$

- Valor N: Tratamientos por repeticiones

$$N = t \times r$$

$$N = 10 \times 10$$

$$N = 100$$

- Nivel de significancia:

$$\alpha = 0.05$$

- Varianza de tratamientos :

$$T_{yy} = \sum_{r_i} \frac{Y_i^2}{N} - \frac{y^2}{N}$$

$$T_{yy} = \frac{(15)^2 + 36^2 + 4^2 + 17^2 + 22^2 + 15^2 + 2^2 + 54^2 + 12^2 + 22^2}{10} - \frac{(197)^2}{100}$$

$$T_{yy} = \frac{6071}{10} - \frac{38809}{100}$$

$$T_{yy} = 607.1 - 388.09$$

$$T_{yy} = 219.01$$

- Suma de cuadrados de tratamientos:

$$W_{yy} = \sum y_{ij}^2 - \frac{y^2}{N}$$

$$W_{yy} = (15 + 36 + 2 + 17 + 22 + 15 + 2 + 54 + 12 + 22) - \frac{197}{100}$$

$$W_{yy} = 197 - 1.97$$

$$\mathbf{W_{yy} = 195.03}$$

- Restando Suma de cuadrados de tratamientos y Varianza de tratamientos:

$$E_{yy} = W_{yy} - T_{yy}$$

$$E_{yy} = 195.03 - 219.01$$

$$\mathbf{E_{yy} = -23.98}$$

- Media cuadrática de los tratamientos:

$$CMT = \frac{T_{yy}}{t-1}$$

$$t-1$$

$$CMT = \frac{219.01}{9}$$

$$9$$

$$\mathbf{CMT = 24.33}$$

- Media cuadrática del error

$$CME = \frac{E_{yy}}{N-t}$$

$$N-t$$

$$CME = \frac{-23.98}{90}$$

$$90$$

$$\mathbf{CME = -0.26}$$

- Grado de libertad error:

$$N - t = 100 - 10 = 90$$

$$F_{tab} = F_{r, N-t, \alpha}$$

$$F_{tab} = F_{10, 90, 0.05}$$

$$\mathbf{F_{tab} = 1.938}$$

$$F_{cal} = CMT / CME$$

$$F_{cal} = 24.33 / -0.26$$

$$\mathbf{F_{cal} = -93.58}$$



Anexo 18. Curva de Fisher

Se rechaza el H_0 debido a que no se encuentra en la región de aceptación. Por lo tanto, existe suficiente evidencia para decir que los tratamientos no son iguales y corrobora los resultados obtenidos en donde el tratamiento 7 (3mg/L^{-1} de BAP y 0.5 mg/L^{-1} de AG_3) es el que induce una mayor cantidad de brotes y formación de hojas.