

La Serie Universitaria de la Fundación Juan March presenta resúmenes, realizados por el propio autor, de algunos estudios e investigaciones llevados a cabo por los becarios de la Fundación y aprobados por los Asesores Secretarios de los distintos Departamentos.

El texto íntegro de las Memorias correspondientes se encuentra en la Biblioteca de la Fundación (Castelló, 77. Madrid-6).

La lista completa de los trabajos aprobados se presenta, en forma de fichas, en los Cuadernos Bibliográficos que publica la Fundación Juan March.

Los trabajos publicados en Serie Universitaria abarcan las siguientes especialidades:
Arquitectura y Urbanismo; Artes Plásticas;
Biología; Ciencias Agrarias; Ciencias Sociales;
Comunicación Social; Derecho; Economía; Filosofía;
Física; Geología; Historia; Ingeniería;
Literatura y Filología; Matemáticas; Medicina,
Farmacia y Veterinaria; Música; Química; Teología.
A ellas corresponden los colores de la cubierta.

Edición no venal de 300 ejemplares que se reparte gratuitamente a investigadores, Bibliotecas y Centros especializados de toda España.

Fundación Juan March



FJM-Uni 205-Pl1
Morfogénesis del aguacate (Persea
Pliego Alfaro, Fernando.
1031572



Biblioteca FJM

Fundación Juan March (Madrid)

SERIE UNIVERSITARIA



Fundación Juan March

Fernando Pliego Alfaro

Morfogénesis del Aguacate
(*Persea americana*, Mill.)
in Vitro.

205 - Morfogénesis del Aguacate (*Persea americana*, Mill.) in Vitro/Fernando Pliego Alfaro

FJM
Uni-
205
Pl1
205

Fundación Juan March

Serie Universitaria

205



Fernando Pliego Alfaro

Morfogénesis del Aguacate
(*Persea americana*, Mill.)
in Vitro.



Fundación Juan March
Castelló, 77. Teléf. 435 42 40
Madrid-6

Fundación Juan March (Madrid)

*Este trabajo fue realizado con una Beca de la
Convocatoria de Extranjero, 1978, individual
Departamento de CIENCIAS AGRARIAS
Centro de trabajo: Department of Plant Sciences
University of California
Riverside, California (USA)*

Los textos publicados en esta Serie Universitaria son elaborados por
los propios autores e impresos por reproducción fotostática.

Depósito Legal: M-23251-1983

I.S.B.N.: 84-7075-279-0

Impresión: Ediciones Peninsular. Tomelloso, 37. Madrid-26

Fundación Juan March (Madrid)

I N D I C E

	<u>Página</u>
I. DESARROLLO DE UN BIOENSAYO DE ENRAIZAMIENTO USANDO TALLOS JUVENILES Y SU APLICACION PARA ESTUDIAR LA RESTAURACION POR INJERTO DE LA CAPACIDAD DE ENRAIZAMIENTO EN TALLOS DE ORIGEN ADULTO	5
I. 1. INTRODUCCION	7
I. 2. REVISION BIBLIOGRAFICA	8
I. 2.1. Relación entre capacidad de enraizamiento y grado de juvenilidad	8
I. 2.2. Evidencia de promotores de enraizamiento en estaquillas juveniles	9
I. 2.3. Estado juvenil y comportamiento de los tejidos de especies leñosas cultivadas in vitro	10
I. 2.4. El proceso de cambio de fase	11
I. 2.5. Reversión de fase	11
I. 2.6. Mecanismos responsables del cambio de fase	13
I. 3. MATERIAL Y METODOS	16
I. 3.1. Germinación de las semillas	16
I. 3.2. Obtención de tallos adultos	16
I. 3.3. Técnica de injerto	17
I. 3.4. Enraizamiento de tallos juveniles	17
I. 3.5. Medios de nutrición y condiciones de cultivo	19
I. 3.6. Evaluación del grado de rejuvenecimiento	20
I. 4. RESULTADOS	22
I. 4.1. Injertos de yemas adultas en patrones juveniles	22
I. 4.2. Enraizamiento de tallos juveniles	22
I. 4.3. Comparación de la capacidad de enraizamiento de tallos juveniles, adultos y adultos injertados	27

I. 5. DISCUSION	33
I. 6. BIBLIOGRAFIA	36
II. EMBRIOGENESIS SOMATICA EN CULTIVOS DE CALLO . . .	42

- Abreviaturas usadas:

Acido indolacético, (AIA); Acido indolbutírico, (AIB); Acido naftalenoacético, (ANA); Acido 2,4-diclorofenoxiacético, (2,4D); Acido giberélico, (GA₃); N⁶-benziladenina, (BA); N⁶-isopenteniladenina, (2iP); Aminoetoxivinilglicina, (AVG).

A Miguel.

I. 1. INTRODUCCION

La dificultad de enraizamiento de estaquillas procedentes de — plantas en fase adulta de desarrollo, ha sido un factor limitante en el cultivo de especies leñosas. Esta dificultad ha impedido el uso de genotipos de características superiores, v.g., resistencia a enfermedades de suelo, salinidad, etc., como portainjertos. En cultivo de tejidos, — la expresión del fenómeno de la totipotencia y la regeneración de plantas en especies leñosas han estado unidas al uso de material juvenil. — En árboles que han sido propagados por semilla, frecuentemente hay reservas de células juveniles y de tejidos que son adecuados para la propagación vegetativa. Sin embargo, en cultivares propagados por injerto, tales reservas usualmente están ausentes y es necesario llevar a cabo una reversión de fase para obtener material juvenil, capaz de ser propagado vegetativamente.

En cultivo de tejidos, se ha observado en algunas ocasiones la — reversión del propágulo, bien espontáneamente o como respuesta a algún tratamiento. Bajo condiciones de cultivo in vivo, la reversión se ha llevado a cabo con tratamientos de giberelinas o por medio del injerto. En esta investigación, se ha intentado lograr la reversión, injertando in vitro yemas adultas de aguacate en portainjertos muy juveniles. El criterio de reversión ha sido la restauración de la capacidad de enraizamiento en los tallos que emergían de las yemas adultas.

Inicialmente, se llevaron a cabo una serie de experimentos para germinar semillas de aguacate in vitro. De las plantas resultantes, — se obtenían los tallos juveniles para la puesta a punto de un bioensayo de enraizamiento, mientras que el resto se utilizaba como portainjerto. Finalmente, se examinó la capacidad de enraizamiento de los tallos procedentes de los injertos.

I. 2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

I. 2. 1. Relación entre capacidad de enraizamiento y grado de juvenilidad.

La facilidad de enraizamiento de estaquillas procedentes de plantas en fase juvenil de desarrollo ha sido señalada en gran cantidad de plantas, v.g., Acer sp. (Gardner, 1929; Thimann y Delisle, 1939), — Carya illinoensis K. (Smith, Wolstenholme y Allan, 1974), Citrus sp. — (Nasr y Abdelhamid, 1971; Singh y Singh, 1961), Cupressus macrocarpa H. (Halliwell y Larkbey, 1974), Eucalyptus sp. (Pryor y Willing, 1963), — Ficus pumila L. (Davies, 1978), Ilex sp. (Gardner, 1929), Malus sylvestris Mill. (Stoutemyer, 1937), Olea europaea L. (Porlingis y Therios, — 1976), Persea americana Mill. (Kadman, 1976), Picea sp. (Thimann y Delisle, 1939), Prunus sp. (Gardner, 1929), Pyrus sp. (Gardner, 1929), — Quercus virginiana Mill. (Morgan, McWilliams y Parr, 1980) y Ulmus americana L. (Schreider y Kawase, 1975). De hecho, la facilidad de enraizamiento de estaquillas procedentes de plantas juveniles y la dificultad de enraizamiento de aquellas procedentes de plantas adultas ha sido una característica casi universal entre las especies leñosas (Sax, 1962; Schaffalitzky de Muckadell, 1954).

Frecuentemente, los autores no han especificado la fase de desarrollo de los propágulos, sin embargo la juvenilidad, se puede asumir — de acuerdo con la edad de la planta donante, posición dentro del árbol-adulto de donde se toman las estaquillas y órganos o tejidos usados como fuente del material para propagar. Árboles menores de cinco años de — muchas especies, se pueden considerar juveniles. Ramas en la parte baja de un árbol grande se pueden considerar más juveniles que las altas. Los chupones que emergen de la base en árboles que han sido propagados por semilla, así como los tallos que emergen de las raíces son también — generalmente juveniles.

I. 2. 2. Evidencia de promotores de enraizamiento en estaquillas juveniles.

Hess (1959) propuso que la diferencia entre la capacidad de enraizamiento del material juvenil y adulto se podía atribuir a la existencia de unos cofactores de enraizamiento que favorecen este proceso al ser — combinados con las auxinas. El mismo autor, (1962), aisló cuatro fracciones distintas que satisfacían el criterio de cofactor de enraizamiento de los tejidos juveniles de Hedera helix y de la variedad roja de Hibiscus rosa-sinensis.

El cofactor de Hess número cuatro ha sido identificado como una — mezcla de terpenoides oxigenados (Girouard, 1969; Hess, 1963). Parte de la actividad del cofactor número 3 podría ser atribuida al ácido isoclorogénico (Hess, 1965) o a una mezcla de los ácidos clorogénico e isoclorogénico y del promotor P-257 (Girouard, 1969). Girouard (1969) consideró que el ácido clorogénico era una parte del cofactor número dos; Heuser y Hess (1972) añadieron que la actividad de este cofactor requería la — presencia de azúcar. Para el cofactor número 1, Heuser (1976), indicó — que una sustancia de naturaleza protéica podría ser responsable de su actividad y su acción sería muy similar a la de la gonadotropina, sustancia que promueve el enraizamiento en Vitis vinifera (Leshem y Lunenfeld, — 1968). Otros autores han descrito efectos beneficiosos de los compuestos fenólicos al ser combinados con auxina, en el enraizamiento de estaquillas, v.g., Hackett (1970) observó un incremento de enraizamiento in — vitro en tallos adultos de Hedera helix con catecol y la auxina AIA. — También Smith y Thorpe (1977) encontraron efectos sinérgicos en el enraizamiento de secciones de hipocótilo de Pinus radiata, entre fenilalanina, tirosina, ácido clorogénico o ácido ferúlico y la auxina AIB.

Se han propuesto dos mecanismos para explicar el incremento de — enraizamiento causado por los compuestos fenólicos. Uno ha sido el bloqueo del enzima que cataliza la oxidación del AIA, (Zenk y Muller, 1963)

y el otro, la formación de un complejo activo AIA-fenol (Leopold y Plummer, 1961). Sin embargo, tal y como señalan Hartmann y Kester (1975) y Heuser (1976) aún existe controversia en cuanto al papel de los cofactores en la iniciación de raíces. Estos autores hacen referencia a situaciones donde no se ha encontrado correlación entre cofactores y respuestas de enraizamiento.

I. 2. 3. Estado juvenil y comportamiento de los tejidos de especies leñosas cultivadas in vitro.

Winton (1978) enumera 18 gimnospermas en las cuales ha sido posible enraizar algún tallo obtenido in vitro, señalando al mismo tiempo que en la mayor parte de los casos, embriones zigóticos o plantas muy jóvenes procedentes de semilla han sido el material de donde se obtuvo el propágulo para iniciar el cultivo y que estos resultados no se pueden esperar cuando el propágulo inicial sea de origen adulto. Cheng (1978) enumera diez especies de coníferas para las cuales se ha establecido un método que permite su propagación clonal, sin embargo, solamente en la especie Pseudotsuga menziesii (Mirb.) Franco, ha sido posible la regeneración de plantas partiendo de propágulos de origen adulto. Recientemente, Teixeira (1981), partiendo de propágulos juveniles ha obtenido plantas enraizadas de Pinus canariensis C. Smith y Sequoia sempervirens (D. Don) Endl.

También en angiospermas, el éxito del cultivo in vitro, va en la mayoría de los casos ligado al uso de material juvenil, v.g., Betula sp. (Mc Cown y Amos, 1979; Pelham y Mason, 1978), Castanea sativa Mill. (Vieitez y Vieitez, 1980_a, 1980_b), Citrus sp. (Alskief y Riedel, 1978; Chaturvedi y Mitra, 1974), Diospyros Kaki L. (Yokoyama y Takeuchi, 1976), Eucalyptus grandis (Barker, de Fossard y Bourne, 1977), Malus sylvestris Mill. (Abbott y Whiteley, 1976). Olea europaea L. (Rugini, Fontanazza y Bongi, 1980), Phoenix dactylifera L. (Reynolds y Murashige, 1978), Prunus

avium L. (Ivanicka y Pretova, 1980), Prunus persica Batsch (Mosella y — Macheix, 1979) y Tectona grandis L. (Gupta et al., 1980). Estas y otras observaciones han llevado a Murashige (1979) y Winton (1978) a sugerir — que la reversión al estado juvenil puede ser un pre-requisito para la — manipulación morfogénica de plantas en fase adulta puesto que la totipotencia va siendo suprimida durante la ontogenia.

I. 2. 4. El proceso de cambio de fase.

La evidencia más clara para señalar el final del período juveniles la aparición de flores (Borchert, 1976; Zimmerman, 1973). Sin embargo, es necesario señalar que incluso cuando la parte superior del árbol ha florecido y está en fase adulta de desarrollo, la parte baja puede — permanecer juvenil (Borchert, 1976; Schaffalitzky de Muckadell, 1954).

I. 2. 5. Reversión de fases.

I. 2. 5. 1. Reactivación de meristemas axilares y formación "di novo" de meristemas apicales.

Las podas severas se han usado para rejuvenecer especies muy diversas, v.g., Acacia melanoxylon (Spaulding, 1960), Hedera helix — (Robbins, 1960), Malus robusta (Nelson, 1976), Persea americana (Gillespie, 1956) y Pinus radiata (Libby y Hood, 1976). También se ha obtenido rejuvenecimiento mediante la inducción de tallos en estaquillas de raíz en los géneros, Malus (Passeoker, 1973), Populus (Heybroek y Visser, — 1976), Prunus (Tarasenko et al., 1973) y Ulmus (Tchernoff, 1963), entre otros.

I. 2. 5. 2. Enraizamientos sucesivos.

Jaynes (1973) en Kalmia latifolia, y Morgan et al. — (1980) en Quercus virginiana han observado incrementos de enraizamiento

con respecto al material obtenido de la planta original, en tallos procedentes de estaquillas enraizadas. Este rejuvenecimiento parcial que tiene lugar durante la propagación vegetativa ha sido confirmado por — Trippi (1963) midiendo las concentraciones de los enzimas catalasa y — p-fenol oxidoreductasa, cuyas actividades decrecen y crecen con la edad, respectivamente.

I. 2. 5. 3. Inducción por agentes químicos in vivo.

Las giberelinas frecuentemente causan rejuvenecimiento. Frydman y Wareing (1974) y Robbins (1960) obtuvieron tallos juveniles — aplicando giberelinas a material adulto de Hedera helix. La baja temperatura retarda el proceso de reversión. Frydman y Wareing (1973_a) encontraron altos niveles de sustancias del tipo de las giberelinas en — ápices juveniles de H. helix. Ellos consideraron que las raíces eran — la fuente de estas sustancias (Frydman y Wareing, 1973_b). El rejuvenecimiento resultó probablemente de una modificación del ápice caulinar — debido al GA₃ (Frydman y Wareing, 1974). Trabajando con Hedera canariensis, Stoutemyer, Britt y Goodin (1961) mostraron que el material adulto rejuvenecido con la giberelina GA₃ enraizaba con una frecuencia más — alta (82,5%) que el adulto no rejuvenecido (30%). También en otros géneros, v.g., Citrus (Cooper y Peinado, 1958), Prunus (Crane, Primer y — Campbell, 1960) y Pyrus (Griggs e Iwakiri, 1961), se ha observado la re — versión al estado juvenil por medio de giberelinas.

I. 2. 5. 4. Inducción por injerto in vivo.

Doorenbos (1954) obtuvo crecimiento juvenil de ramas — maduras de H. helix después de injertar tallos adultos en estaquillas — juveniles enraizadas. Resultados similares se obtuvieron en Citrus — (Pieringer y Hanks, 1965) y Passiflora (Lewin, Montaldi y Caso, 1963).—

Otros trabajos en Eucalyptus sp. (Depommier, 1981; Martin y Quillet, — 1974), H. canariensis (Stoutemyer, Britt y Goodin, 1961), H. helix — (Hess, 1960), Hevea brasiliensis (Gregory, 1951), Malus robusta (Nelson, 1967), Pseudotsuga menziessii (Franclet, 1980) y Terminalia superba — (Martin y Quillet, 1974) han mostrado que la capacidad de enraizamiento del material rejuvenecido es superior al control adulto.

En Persea americana, Haas (1937) enraizó algunas estaquillas adultas del cultivar Fuerte, después de haber sido injertadas — en plantas juveniles. Gillespie (1957), Young (1961) y Shafrir (1969), obtuvieron análogos resultados con éste y otros cultivares. En otro — experimento, Shafrir (1970) observó que para algunas variedades el porcentaje de estaquillas enraizadas se incrementaba al realizar injertos — sucesivos en material juvenil.

I. 2. 5. 5. Inducción por cultivo in vitro.

En la tabla n^o 1 se enumeran los géneros en los que se ha observado reversión al estado juvenil al cultivar in vitro el material adulto. También se especifican las causas de la reversión.

I. 2. 6. Mecanismos responsables del cambio de fase.

Los experimentos de Robinson y Wareing (1969) en los que observaron que plantas juveniles de Betula verrucosa que crecieron sin período de reposo florecían antes que el control, y que pías de plantas juveniles de Larix leptolepis, cercanas a alcanzar la fase adulta, producían piñas mucho antes que las pías de plantas muy juveniles al ser injertadas en — patrones adultos, les llevaron a afirmar que el número de divisiones celulares en el meristemo es el factor que determina la duración del estado juvenil, y que el meristemo apical funciona como unidad autónoma, sin verse por tanto afectado por los metabolitos que le puedan llegar del — resto de la planta. Por su parte Hackett (1976), sostiene que el cambio

Tabla 1. Reversión de fase por cultivo in vitro.

<u>Género</u>	<u>Condiciones asociadas con la reversión.</u>	<u>Referencia</u>
<u>Citrus</u>	Tallos adventicios.	Bouزيد, 1975.
<u>Eucalyptus</u>	Subcultivos sucesivos de tallos axilares.	Gupta <u>et al.</u> , 1981 de Fossard, 1978.
<u>Hedera</u>	Subcultivos sucesivos de tallo en medio de alto contenido en sales.	Robbins y Hervey, 1970.
<u>Passiflora</u>	Tallos adventicios.	Montaldi <u>et al.</u> , 1963.
<u>Pinus</u>	Subcultivos sucesivos de tallos axilares.	Francolet, 1980.
<u>Populus</u>	Tallos adventicios.	Whitehead y Giles, 1977.
<u>Prunus</u>	Tallos adventicios.	Druart, 1980.
<u>Pseudotsuga</u>	Poda del ápice caulinar - in vitro.	Boulay y Francolet, 1977.
<u>Rubus</u>	Subcultivos sucesivos de tallos axilares.	Snir, 1980.
<u>Sequoia</u>	Subcultivos sucesivos de tallos axilares o cultivo prolongado en un medio — conteniendo BA.	Francolet, 1979; Teixeira, 1981.
<u>Tectona</u>	Subcultivos sucesivos de tallos axilares.	Gupta <u>et al.</u> , 1980.
<u>Vitis</u>	Tallos adventicios.	Barlasy Skene, 1980.
<u>Vitis</u>	Reducción del nivel de — nutrientes en cultivo de tallos.	Favre y Grenan, 1979.
<u>Vitis</u>	Subcultivos sucesivos de tallos axilares.	Mullins, Nair y Sampet, 1979; Nozeran y Bancilhon, 1972.
<u>Vitis</u>	Cultivo prolongado en un medio conteniendo BA.	Mullins, Nair y Sampet, 1979.

de fase está regulado por una partición de metabolitos en el meristemo apical bajo control hormonal. De acuerdo con esta teoría, la giberelina estimularía la actividad mitótica en el meristemo subapical del material adulto, dejando el meristemo apical en desventaja nutricional e induciendo por tanto el cambio a la morfología juvenil. Brink (1962)- y Brink, Styles y Artell (1968) se inclinan por un mecanismo genético, que haga posible la expresión de genes idénticos en caminos diferentes para controlar el cambio de fase. La giberelina podría entonces causar rejuvenecimiento por derepresión de zonas de ADN (Hess, 1967). Los experimentos de hibridación de ADN y ARN de Rogler y Dahmus (1974) con H. helix, muestran que el GA₃ puede alterar la transcripción de ciertos genes en ápices adultos.

Fortanier y Jonkers (1976) postulan que el rejuvenecimiento observado tras la aplicación de podas, puede ser debido a la mejora en el nivel de nutrientes y agua que tiene lugar en las partes de la planta que no son eliminadas. Probablemente, el hecho de que los meristemas estén más cercanos a las raíces y quizás expuestos a más altos niveles de giberelinas endógenas tal y como Wareing y Frydmann (1976) sugieren para H. helix, puede jugar también un importante papel. Sin embargo es evidente, que excepto en los casos de obtención de embriones somáticos o formación de yemas adventicias procedentes de un grupo de células no organizadas (Romberger, 1976), no es posible lograr una reversión completa al estado juvenil. De cualquier forma esta reversión, aún siendo parcial, puede ser suficiente para permitir la propagación vegetativa de genotipos superiores en gran número de especies leñosas.

I. 3. MATERIAL Y METODOS

I. 3. 1. Germinación de las semillas.

Las semillas de aguacate, cuyas cubiertas habían sido previamente eliminadas, se esterilizaban en una solución de hipoclorito al 0,5% y Tween 20 al 0,1% durante veinte minutos. Posteriormente se separaban ambos cotiledones, seccionándose el eje plúmula-radícula junto a un trozo de cotiledón, y el conjunto se transfería a un tubo de ensayo. Cuando una semilla de aguacate se divide por la mitad, el eje plúmula-radícula se encuentra usualmente unido a uno de los cotiledones. Una vez transcurridas 4 semanas, estas plantas se podían utilizar como portainjertos o como fuente de material para los experimentos de enraizamiento.

Las condiciones de enraizamiento se establecieron con tallos juveniles del cultivar Topa-Topa. De este mismo cultivar, así como de otros de la raza Mejicana, fueron las plantas utilizadas como patrones. En los tests para comparar capacidades de enraizamiento, los tallos se obtenían de plantas del cultivar Duke 7.

I. 3. 2. Obtención de tallos adultos.

Los tallos en fase adulta, usados como control en los experimentos de enraizamiento, se obtenían de segmentos nodales procedentes de plantas del cultivar Duke 7 crecidas en invernadero. Los segmentos nodales se obtuvieron de tallos tiernos, creciendo activamente y con una longitud entre 15 y 25 cms. Las hojas eran eliminadas y los tallos se desinfectaban sumergiéndolos en una solución diluida de hipoclorito durante 10 minutos. Posteriormente, los tallos se dividían en secciones nodales de 1 a 1.5 cm de longitud que nuevamente se desinfectaban en solución de hipoclorito durante 10 minutos, se lavaban con agua esterili-

zada en autoclave eliminándose la parte de tejido dañado por el desinfectante y finalmente, cada sección se colocaba en un tubo de ensayo.— Después de 7 semanas aproximadamente el 50% de las yemas habían producido tallos de 0.5 a 1 cm de longitud que tenían de 1 a 3 hojas pequeñas.

I. 3. 3. Técnica de injerto. (Fig. 1).

Los tallos de las plantas procedentes de las semillas se acortaban hasta una longitud de 0.5 cm eliminándose también las yemas axilares (Fig. 1.1.a y 1.1.b). Posteriormente se hacía una incisión longitudinal cuya profundidad era las $\frac{3}{4}$ partes del diámetro del tallo. — Esta incisión se abría cuidadosamente un poco más para asegurar la fijación de la yema de injerto (Fig. 1.1.c).

Las yemas laterales se obtenían de secciones nodales de tallos adultos (Fig. 1.2.a). Las dos brácteas exteriores se eliminaban, haciéndose dos cortes transversales en diagonal y hacia abajo a través del tallo, uno sobre y el otro bajo la yema. Esto aislaba la yema — junto a una sección de tallo de 1 mm de espesor (Fig. 1.2.b y 1.2.c).— La yema preparada de esta forma se colocaba en el patrón, con la porción de tallo totalmente encerrada en la incisión y la porción de yema expuesta sobre la superficie cortada del tallo (Fig. 1.3). El problema de la desecación se resolvió aplicando una capa fina del medio de cultivo conteniendo agar, sobre la zona de injerto, pero no sobre la yema, y uniéndolo con el resto del medio contenido en el tubo. Después de una semana, este agar se iba eliminando gradualmente.

I. 3. 4. Enraizamiento de tallos juveniles.

Se puso a punto un bioensayo de enraizamiento para secciones — apicales de tallo de 2 a 3 cm de longitud procedentes de las plantas —

Fig. 1. Técnica de injerto in vitro de yema adulta en patrón juvenil.

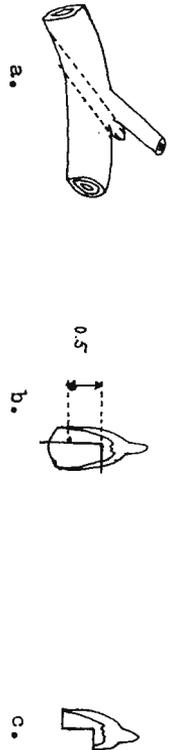


Fig. 1.2. Preparación yema injerto. a) Sección nodal con yema lateral. b) Yema con sección de tallo de 1 mm de espesor. c) Yema lista para ser injertada.

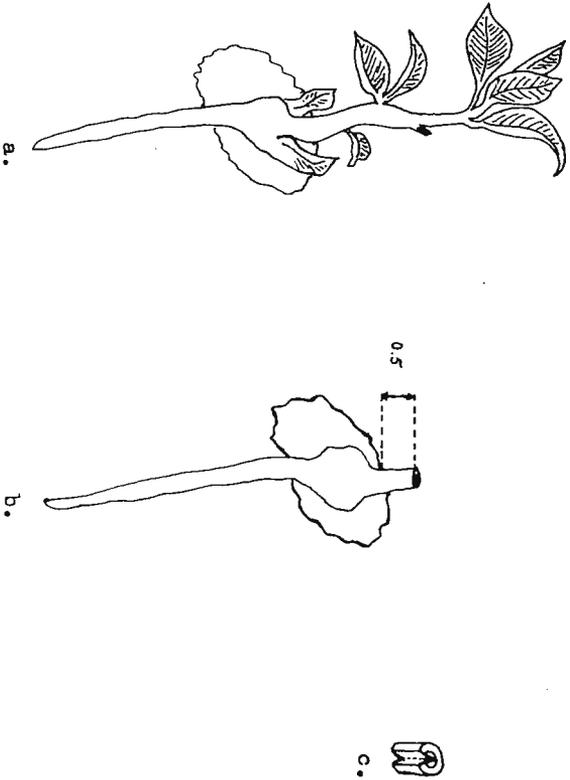


Fig. 1.3. Planta injertada

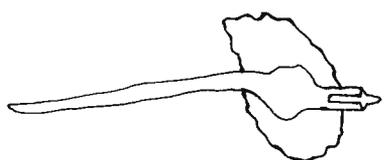


Fig. 1.1. Preparación patrón. a) Planta de semilla germinada in vitro. b) Planta decapitada. c) Detalle de la zona de injerto.

juveniles obtenidas in vitro. En un experimento, se comparó la capacidad de enraizamiento entre tallos etiolados, procedentes de semillas — que habían germinado en la obscuridad, y tallos estandar verdes. Se — evaluaron los efectos de sales inorgánicas, auxinas, y ciertos compuestos fénolicos en enraizamiento. Quince o veinte tubos fueron usados — por tratamiento, oada tubo conteniendo una estaquilla terminal. Los — datos se tomaron una vez transcurridas 8 semanas.

I. 3. 5. Medios de nutrición y condiciones de cultivo.

El medio para la germinación de las semillas contenfa las sales de Murashige y Skoog (Murashige y Skoog, 1962) y las siguientes concentraciones de sacarosa, 30.000 mg/l; i-inositol 100 mg/l; tiamina ·HCl, 0,4 mg/l; carbón activado (Sigma Chemical Co.), 1000 mg/l y agar TC (KC Biological Inc.), 8000 mg/l. Para el crecimiento de tallos adultos e injertos, este medio se suplementaba con 85 mg/l de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ y 50 mg/l de BA.

El medio inicial para los experimentos de enraizamiento en tallos juveniles era el mismo que el usado para germinar semillas. Finalmente, el procedimiento adoptado tenía dos fases: (1) 3 días en un medio conteniendo AIB (25 mg/l) y (2) 4 a 8 semanas en un medio sin auxina. Ambos medios contenfan 0.3X la concentración estandar de la mezcla de sales de Murashige y Skoog, y sacarosa, tiamina ·HCl, i-inositol, y agar TC a las concentraciones señaladas anteriormente. El medio sin auxina también — contenfa 1g/l de carbón activado y como suplemento opcional, ácido caféi — oo a 450 mg/l.

El pH se ajustaba a 5.7 antes de añadir el agar. Los tubos de — ensayo de 25 x 150 mm, contenfan 25 ml de medio de cultivo y se cubrían con tapones de polipropileno (Bellco Glass, Inc.), siendo esterilizados—

en autoclave durante 15 minutos a 1.05 kg/cm². Los tubos para germinación de las semillas, así como los de los injertos, se mantenían erectos en gradillas de acero inoxidable, mientras que el resto se mantenía — con una inclinación de 45°. La incubación tuvo lugar a 27°C con 16 horas de exposición a una intensidad luminosa de 1000 lux, excepto para los injertos que era de 6000 lux (lámparas Gro Lux de Sylvania de espectro regular).

I. 3. 6. Evaluación del grado de rejuvenecimiento.

I. 3. 6. 1. Comparación de la capacidad de enraizamiento.

Se examinó la capacidad de enraizamiento de tallos juveniles, procedentes de las plantas obtenidas de semilla, tallos adultos, procedentes de secciones nodales, y tallos adultos injertados, procedentes de los injertos, usando la secuencia de enraizamiento en dos fases antes mencionada.

I. 3. 6. 2. Investigación con etileno.

En los experimentos para comparar la capacidad de enraizamiento de tallos juveniles, adultos, y adultos injertados, se observó que tanto los tallos adultos como los adultos injertados sufrían defoliaciones severas, que a veces podían conducir a la degeneración total del tallo. Los tallos juveniles, sin embargo, crecían de forma vigorosa enraizando profusamente. Se sospechó que estos efectos adversos podían ser causados por una alta producción de etileno en los tejidos adultos. Por este motivo, se examinó el contenido de etileno de muestras gaseosas típicas por oromatografía de gases. Las muestras ga

seosas de 1 ml se inyectaron en un cromatógrafo de gases Varian Aerograph 1400, equipado con una columna de acero inoxidable (0.3 x 450 cm) conteniendo Porapak Q. El cromatógrafo se mantuvo isotérmicamente a 50° C. - Se usó como estandar una muestra gaseosa conteniendo 8 ppm de etileno.

Para complementar el análisis de etileno, se examinaron los efectos del AVG, un inhibidor de la biosíntesis de etileno, en el enraizamiento y defoliación de los tallos adultos injertados.

I. 4. RESULTADOS

I. 4. 1. Injertos de yemas adultas en patrones juveniles.

El principal problema de los injertos in vitro fué la desecación de las yemas. Sin embargo, cubriendo la zona del injerto desde la base de la yema hasta la superficie del medio de cultivo con este mismo medio que contenía agar, se resolvió el problema obteniéndose un porcentaje de éxito próximo a 70.

La adición de BA al medio en una concentración de 50 mg/l favoreció la emergencia y alargamiento de las yemas de injerto, así como el crecimiento de hojas (Tabla 2).

La adición de fosfato en forma de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, a una concentración de 85 mg/l producía un follaje más verde, por lo que se incluyó como un componente estandar en el medio de cultivo.

Los injertos podían hacerse a lo largo de todo el año pero los realizados en Junio, crecían más vigorosamente que los realizados en otros meses.

I. 4. 2. Enraizamiento de tallos juveniles.

I. 4. 2. 1. Sales inorgánicas.

Una reducción del suministro de sales incrementó la capacidad de enraizamiento de los tallos juveniles. Este experimento preliminar tuvo una sola fase, empleándose un medio de cultivo que no contenía auxina. Los resultados aquí obtenidos fueron confirmados cuando el enraizamiento se hizo en dos fases, en la primera de las cuales se usaba un medio suplementado con AIB. Las sales se variaron en ambas

Tabla 2. Efecto de la citoquinina BA, en el crecimiento de yemas laterales adultas del cultivar Duke 7, injertadas in vitro en patrones juveniles. La composición del medio básico era en — mg/l: Sales de Murashige y Skoog a la concentración estandar, sacarosa, 30.000; tiamina ·HCl, 0.4; i-inositol, 100; carbón-activado Sigma, 1.000 y agar TC, 8.000. Los datos se tomaron a las 6 semanas de realizarse los injertos.

<u>BA, mg/l</u>	<u>Longitud del tallo, cm</u>	<u>Nº hojas/tallo</u>
0	1.0 ± 0.2	2.6 ± 0.7
25	1.1 ± 0.2	2.8 ± 0.6
50	1.4 ± 0.3	3.2 ± 0.7
75	0.9 ± 0.2	2.3 ± 0.5
100	1.2 ± 0.3	2.7 ± 0.6

fases. La incidencia de tallos enraizados se incrementó de 50% a 100% cuando la mezcla de sales se redujo de 1X a 0,3X o más baja. Los tallos del medio sin sales iniciaron raíces con una frecuencia del 100%; sin embargo, las raíces eran largas y delgadas. Al disminuir la concentración de sales se redujo el desarrollo de callo en la base de los tallos. Tal y como se observa en la fig. 2, las concentraciones de 0.3X hacia abajo también produjeron mayor número de raíces por tallo. El alargamiento y el vigor general de los tallos fué mejor al nivel de 0.3X, por lo que éste se eligió como la concentración más idónea para el bioensayo de enraizamiento.

I. 4. 2. 2. Requerimiento de auxina.

También los efectos de las auxinas AIA, AIB, ANA y 2,4-D, se estudiaron inicialmente en experimentos que constaban de una sola fase, pero no se obtuvieron resultados positivos.

La segunda serie de experimentos, examinó las respuestas de tallos juveniles a su cultivo por un cierto período de tiempo en medio con alta concentración de auxina. Los tallos se cultivaron en un medio que contenía 100 mg/l AIB por 0,3 y 12 días, transfiriéndolos después a un medio sin auxina. El experimento también comparó tallos etiolados y no etiolados. Los tallos etiolados mostraron un enraizamiento pobre. — Los tallos verdes respondieron mucho mejor. Los tratamientos de 3 días en el medio de AIB, resultaron en porcentajes de enraizamiento próximos a 100. El tratamiento de 3 días produjo además, el mayor número de raíces por tallo (Fig. 3). Este tratamiento fué por tanto escogido como estandar.

La concentración de 100 mg/l AIB dió lugar a la formación de abundante callo en la base de los tallos, por tanto se estudió

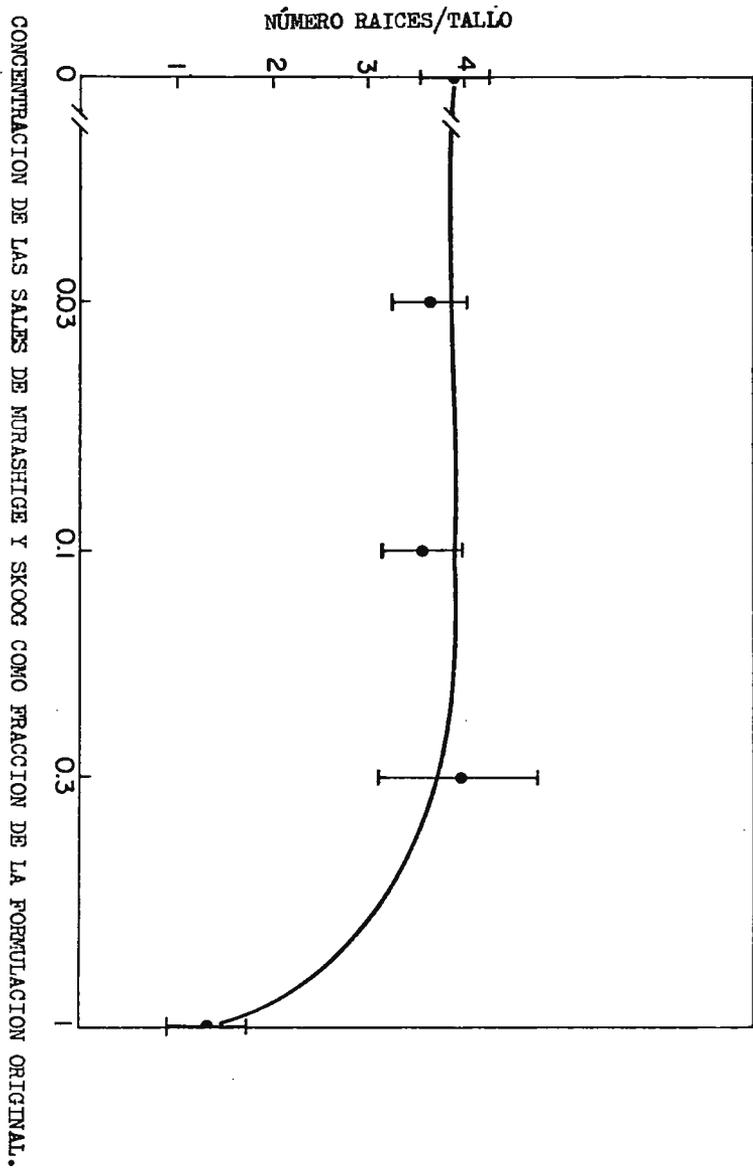


Fig. 2. Efecto del nivel de las sales de Murashige y Skoog, en número de raíces producidas por tallo juvenil de agaveate.

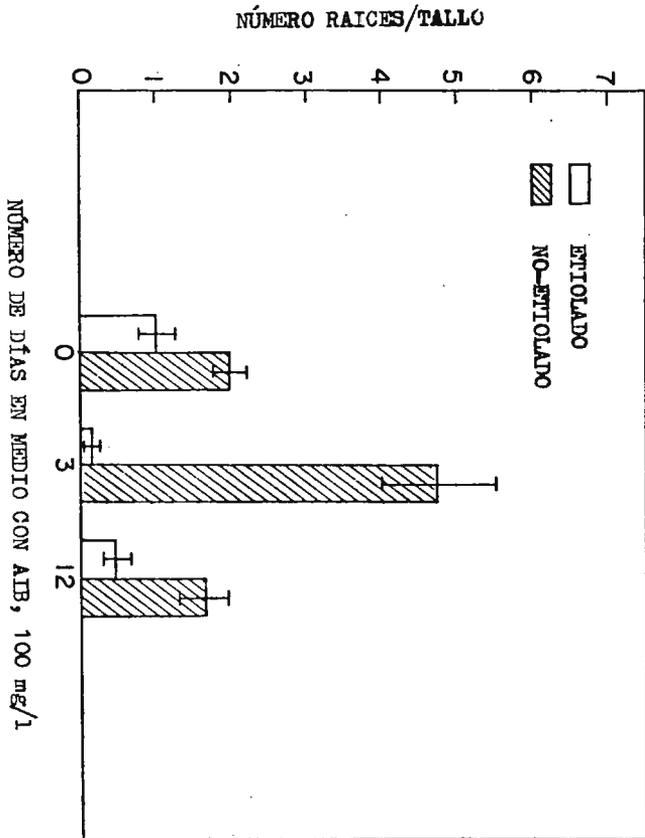


Fig. 3. Influencia del tiempo de cultivo en medio conteniendo auxina, sobre el enraizamiento de tallos juveniles normales y etiolados de aguacate.

el efecto de niveles inferiores de AIB. Al reducir la auxina no disminuyó la frecuencia de tallos enraizados ni el número de raíces por tallo; la cantidad de callo tampoco disminuyó de manera sustancial, sin embargo la eliminación total de la auxina ocasionó una disminución del enraizamiento (Fig. 4); por tanto se eligió una concentración de 25 mg/l para su inclusión en el medio de la primera fase del proceso de enraizamiento.

I. 4. 2. 3. Compuestos fenólicos.

Se examinaron el ácido caféico, catecol y floroglucinol como cofactores en el enraizamiento de tallos juveniles. Dichos — compuestos se incorporaron en la segunda fase del proceso de enraizamiento. Solamente el ácido caféico a una concentración de 450 mg/l incrementó el número de raíces por tallo, sin afectar el porcentaje de tallos — enraizados. Este compuesto se consideró como suplemento opcional del — medio de la segunda fase. Por lo que respecta al catecol y floroglucinol, ninguno de los dos mejoró significativamente la capacidad de enraizamiento de los tallos.

I. 4. 3. Comparación de la capacidad de enraizamiento de tallos juveniles, adultos y adultos injertados.

Los tallos juveniles enraizaron en un porcentaje próximo a 100 usando el proceso de enraizamiento de dos fases. Por el contrario, ni uno solo de los tallos adultos que emergían de las secciones nodales enraizó. Los tallos adultos injertados lo hicieron con una frecuencia de alrededor del 50% (Fig. 5). Interesa señalar sin embargo, — que tanto los adultos injertados como sin injertar respondieron desfavorablemente a las condiciones que favorecen el enraizamiento y crecimiento de tallos juveniles. Los tallos de origen adulto perdieron sus hojas

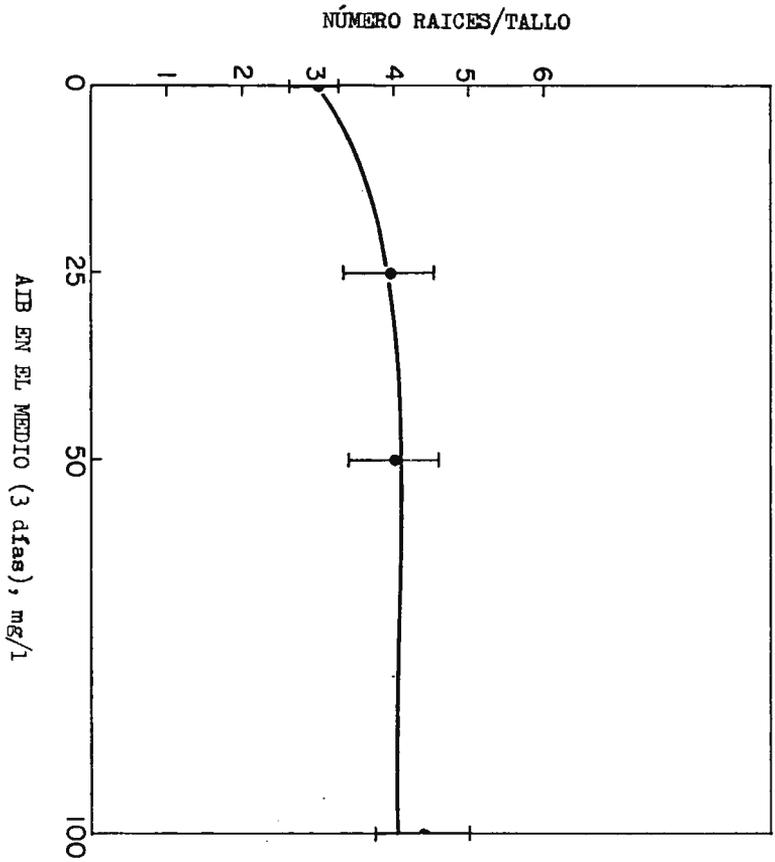


Fig. 4. Efecto de la concentración de auxina en el medio de la primera fase de enraizamiento sobre el número de raíces por tallo juvenil de aguacate.

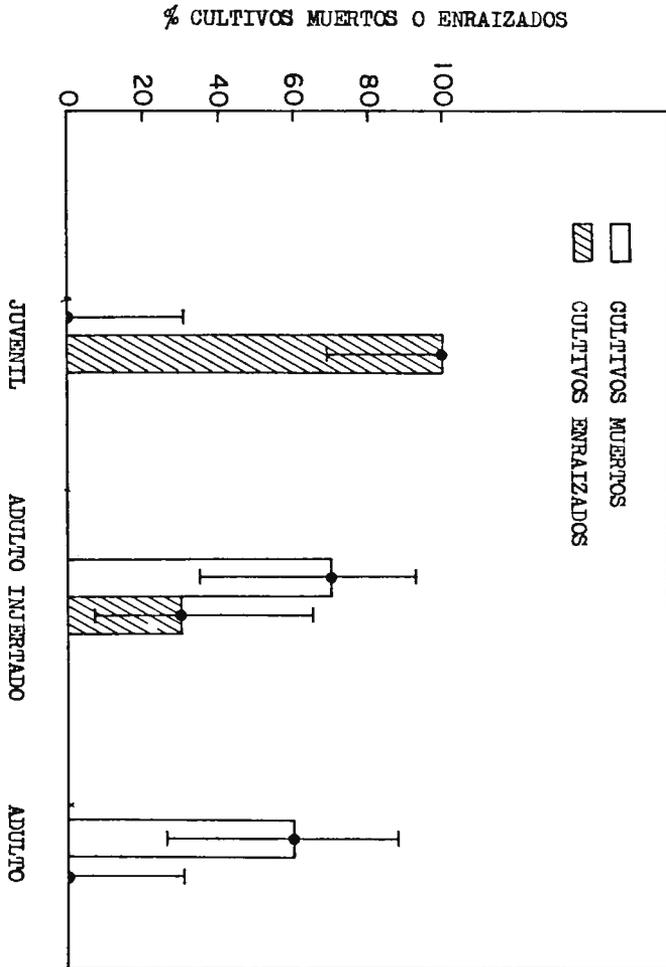


Fig. 5. Comportamiento de tallos juveniles, adultos y adultos injertados, en el test de enraizamiento puesto a punto con tallos juveniles.

y muchos morían tras ser cultivados en el medio que contenía 25 mg/l AIB. Se sospechó entonces que el etileno podía ser la causa de estos efectos - desfavorables. Sin embargo, el análisis de la fase gaseosa en los cultivos, demostró que los tallos adultos sin injertar producían el doble de etileno que los juveniles o los adultos injertados. El etileno por consiguiente, no parecía ser la causa de la defoliación y degeneración de los tallos adultos y adultos injertados. Esta interpretación fué reforzada - por la falta de efectos favorables observada al incluir AVG en el medio - de cultivo. De hecho, AVG en concentraciones de 10 mg/l y mayores aceleró la muerte de los tallos. A cualquier concentración, AVG inhibía el - enraizamiento de los tallos adultos injertados (Fig. 6).

Pareció por tanto que los tallos adultos, injertados o no, eran más sensibles o tenían una menor tolerancia al AIB. Otros experimentos revelaron que la defoliación no era un problema serio y la muerte no ocurría - entre tallos adultos injertados al omitir el AIB. Por tanto se buscó un - nivel más favorable de AIB para los tallos de origen adulto. Una serie - de experimentos reveló que un tratamiento de 3 días en un medio que - contenía 1 mg/l de AIB podía causar hasta un 50% de enraizamiento en tallos - adultos injertados, con 1.2 ± 0.4 raíces por tallo.

Los efectos adversos en los tallos de origen adulto no eran causados únicamente por el AIB. La auxina AIA también causó defoliación al - usarla en una concentración de 30 mg/l, sin embargo no estimuló el enrai - zamiento.

La pérdida de hojas de los tallos adultos injertados influyó proba - blemente en su pobre enraizamiento. El uso de una solución de BA que se - vertía en el tubo de ensayo una vez colocado el propágulo no mejoró el - porcentaje de enraizamiento o el número de raíces por tallo. Sin embargo,

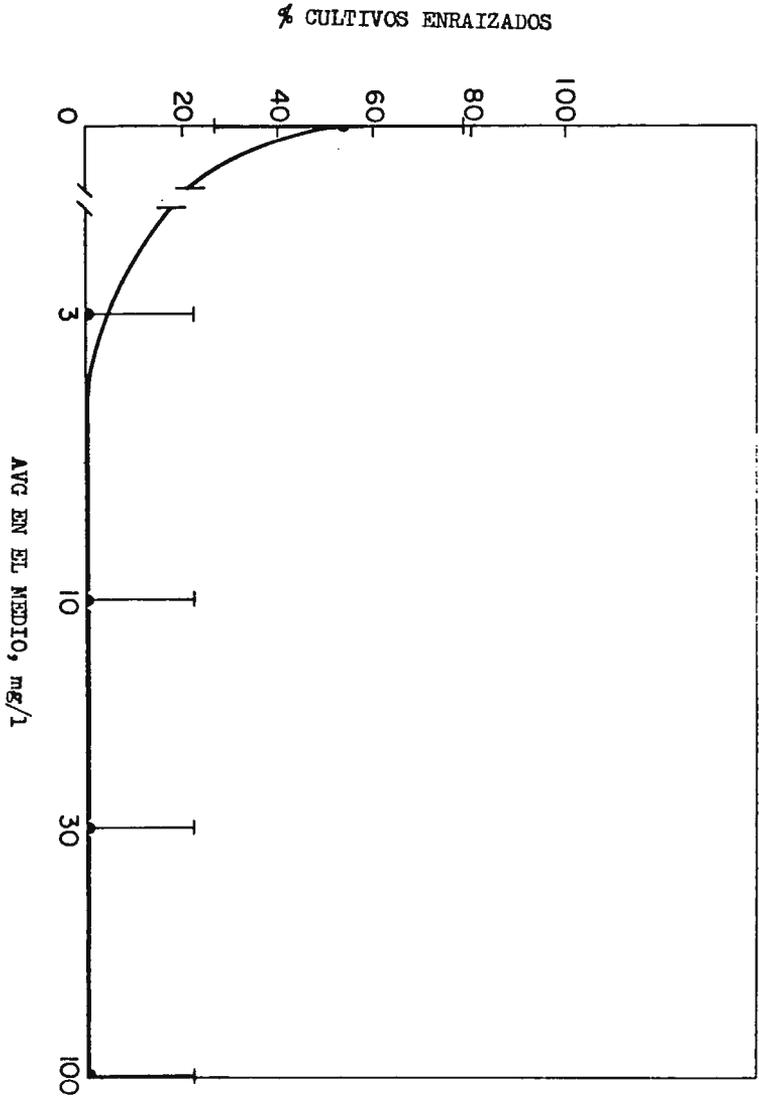


Fig. 6. Efectos de AVG en porcentaje de enraizamiento de tallos adultos injertados del cultivar Duke 7.

los tratamientos con BA, especialmente 10 mg/l, retrasaban el daño en la hoja produciendo cultivos más vigorosos.

Contrariamente a lo esperado, el reinjerto de los tallos adultos— hasta 3 veces consecutivas en nuevos patrones juveniles, no mejoró el enraizamiento o el vigor general de los tallos. Los tallos juveniles mostraron de forma consistente un alargamiento rápido y un crecimiento vigoroso. Por el contrario los adultos no injertados mostraron un crecimiento pobre, gran producción de callo y alta tendencia de las hojas al desprendimiento. El crecimiento de los tallos adultos durante el tiempo — que permanecían injertados en el patrón juvenil era vigoroso, con abundante follaje y poca producción de callo; al separarlos del patrón y cultivar las secciones apicales individualmente, el crecimiento se parecía al de los tallos adultos no injertados. Sin embargo, las secciones nodales de estos tallos, después de ser sometidas al proceso de enraizamiento en dos fases, exhibían un desarrollo de tallos axilares más vigoroso y con follaje más abundante que el de las secciones nodales sin injertar. — Estos tallos axilares continuaban su crecimiento normal al ser transferidos al medio basal.

I. 5. DISCUSIÓN

En un gran número de especies leñosas, la regeneración de plantas asexualmente con procedimientos distintos al del injerto, requiere el uso de propágulos procedentes de plantas en la fase juvenil de desarrollo. Si no existen fuentes naturales de tejidos juveniles, los tejidos adultos deben ser rejuvenecidos. En cultivo de tejidos, existen muchos ejemplos donde se ha observado reversión de fase durante el curso normal de subcultivos o por tratamientos especiales (Barlass y Skene, 1980; Boulay y Franclet, 1977; Bouzid, 1975; de Fossard, 1978; Druart, 1980; Favre y Grenan, 1979; Franclet, 1979, 1980; Gupta et al., 1980, 1981; Montaldi et al., 1963; Mullins et al., 1979; Nozeran y Bancilhon, 1972; Robbins y Hervey, 1970; Snir, 1980; Teixeira, 1981; Whitehead y Giles, 1977). También in vivo son numerosos los casos en los que se ha obtenido reversión al estado juvenil del material adulto, tras su injerto en patrón juvenil (Depommier, 1981; Doorenbos, 1954; Franclet, 1979; Gregory, 1951; Hess, 1960; Lewin et al., 1963; Martin y Quillet, 1974; Nelson, 1967; Pieringer y Hanks, 1965; Stoutemyer et al., 1961). En aguacate, se ha logrado enraizar material adulto después de haberlo injertado en patrón juvenil (Haas, 1937; Shafrir, 1970). En esta investigación se intentó ver la capacidad de rejuvenecimiento del material adulto, medido como restauración de la capacidad de enraizamiento, tras su injerto in vitro en patrones juveniles.

El primer objetivo fué poner a punto un bioensayo de enraizamiento in vitro, usando tallos juveniles procedentes de semillas maduras — germinadas asépticamente. Para germinar las semillas, se cultivaba in vitro el eje radícula-plúmula junto a un trozo pequeño de cotiledón. — El uso de tallos juveniles permitió observaciones de máximo enraizamiento del aguacate in vitro y sirvió como un estándar con el que se comparaba la capacidad de enraizamiento de los tallos adultos. Después de tomar los tallos juveniles, el resto de la planta se usaba como portainjerto. Los tallos adultos usados como referencia para los tests de en-

raizamiento se obtenían tras cultivar secciones nodales de plantas adultas que crecían en invernadero. Las yemas laterales de las mismas plantas eran las que se injertaban sobre los patrones juveniles.

El enraizamiento de tallos juveniles requería dos fases; en la primera, el medio contenía auxina y en la segunda, no. En casi todos los medios se incluyó una pequeña cantidad de carbón activado, principalmente porque mejoró el crecimiento. Esta mejora se debió probablemente a la absorción de inhibidores producidos por los tejidos de aguacate, análogamente a lo que se ha observado en otras ocasiones donde también se ha usado carbón activado (Wang y Huang, 1976; Weatherhead *et al.*, 1978, 1979). Solamente fué necesario un período corto de cultivo en el medio que contenía la auxina. Es interesante notar que los tallos juveniles eran más tolerantes a la auxina que aquellos de origen adulto. Una concentración de 25 mg/l de AIB era casi óptima para los tallos juveniles, mientras que en los de origen adulto causaba daño en las hojas, que finalmente se desprendían. Esta concentración era también letal para algunos tallos. Para los adultos injertados, un nivel de 1 mg/l de AIB era más apropiado. La evolución de etileno frecuentemente asociada a fenómenos de abscisión (Lavee y Martin, 1981), pareció no ser la base de los efectos adversos causados por la auxina. Tubos cerrados de cultivos juveniles y adultos injertados acumulaban cantidades comparables de etileno, después de una semana; sin embargo, el inhibidor de la biosíntesis de etileno AVG, no impidió la abscisión, aunque el efecto del AVG en el desprendimiento de etileno no se midió directamente. La citoquinina BA pareció reducir el daño de hoja, además de retardar su abscisión. La conveniencia de un proceso de enraizamiento en dos fases, ya observada en otras especies por Snir y Erez, (1980) y Teixeira (1981), confirma el concepto tradicional de requerimientos hormonales diferentes en las distintas fases de desarrollo de las plantas. En este caso, una alta dosis de auxina era favorable al proceso de iniciación de raíces pero no a la emergencia y alargamiento de las mismas. La dosis requerida para estas últimas era considerablemente menor y el nivel usado para el primer proceso hubiera sido tóxico.

La mezcla de sales inorgánicas en la dosis recomendada por — Murashige y Skoog dificulta el enraizamiento en muchas especies (Kwei et al., 1978; Snir y Erez, 1980; Teixeira, 1981). El aguacate también dió una respuesta favorable a la disminución de las sales. La razón de los efectos regresivos de altas concentraciones de sales no está clara. Probablemente las concentraciones de nitrógeno, especialmente amonio, potasio, fosfato y otros macrom nutrientes en la dosis recomendada por Murashige y Skoog son muy altas.

Ciertos compuestos fenólicos se usan rutinariamente para mejorar el enraizamiento de estaquillas de diversas plantas, v.g., ácido-caféico (Paupardin, 1969; Rücker y Paupardin, 1969), catecol (Hackett, 1970) y floriglucinol (James, 1979; Jones y Hatfield, 1976). Los — efectos beneficiosos de los compuestos fenólicos se han atribuido a — su acción protectora contra la inactivación de auxina (Zenk y Muller, 1963). En aguacate, catecol y floriglucinol fueron inefectivos, mien tras que el ácido caféico incrementó el número de raíces por tallo.

El injerto de yemas adultas en patrones juveniles in vitro, — dió lugar a tallos que enraizaban en un porcentaje próximo a 50. El cultivo de las yemas laterales de estos tallos originaba nuevos tallos que conservaban su capacidad de enraizamiento; sin embargo, al injertar estas yemas laterales en nuevos patrones juveniles, no se aumentó la capacidad para enraizar de los tallos que emergían de estas yemas. Las secciones nodales con yema lateral, de los tallos procedentes de los injertos, creofan más rápidamente que las procedentes de tallos no injertados, siendo además su crecimiento más parecido al de los tallos juveniles. Estas observaciones sugieren que la restaurada capacidad — de enraizamiento en tallos adultos tras su injerto en patrones juveniles, es una manifestación de un cambio de fase de adulto a juvenil por un mecanismo desconocido. Otros experimentos adicionales están en mar cha para probar esta hipótesis.

I. 6. BIBLIOGRAFÍA

- Abbott, A. J., E. Whiteley, 1976 - *Sci. Hort.* 4: 183-189.
- Alskief, J., M. Riedel, 1978 - *C. R. Acad. Sci. Paris*, 287: 249-252.
- Barker, P. K., R. A. de Fossard, R. A. Bourne, 1977 - *Proc. Int. Plant Prop. Soc.* 27: 546-556.
- Barlass, M., K. G. M. Skene, 1980 - *J. Exp. Bot.* 31: 489-495.
- Borchert, R., 1976 - *Acta Horticulturae*, 56: 21-36.
- Boulay, M., A. Franclet, 1977 - *C. R. Acad. Sci. Paris*, 284: 1405-1407.
- Bouzid, S., 1975 - *C. R. Acad. Sci. Paris*, 280: 1689-1692.
- Brink, R. A., 1962 - *Quart. Rev. Biol.* 37: 1-22.
- Brink, R. A., E. D. Styles, J. D. Artell, 1968 - *Science*, 159: 161-170.
- Chaturvedi, H. C., G. C. Mitra, 1974 - *HortScience*, 9: 118-120.
- Cheng, T. -y., 1978 - *Proc. Int. Plant Prop. Soc.* 28: 139-155.
- Cooper, W. C., A. Peynado, 1958 - *Proc. Amer. Soc. Hort. Sci.* 72: 284-289.
- Crane, J. C., P. E. Primer, R. C. Campbell, 1960 - *Proc. Amer. Soc. Hort. Sci.* 75: 129-137.
- Davies, F. T., Jr., 1978 - Ph. D. Dissertation, Univ. Florida, Gainesville.
- de Fossard, R. A., 1978 - *Proc. Symp. Plant Tissue Culture, Peking*, — 425-438.
- Depommier, D., 1981 - IUFRO Symposium. A. F. O. C. E. L. Fontainebleau, France.
- Doorenbos, J., 1954 - *Proc. Kon. Ned. Akad. Wet. C.* 57: 99-102.
- Druart, P., 1980 - *Sci. Hort.* 12: 339-342.
- Favre, J. M., S. Grenan, 1979 - *Ann. Amélior. Plantes*, 29: 247-252.
- Fortanier, E. J., H. Jonkers, 1976 - *Acta Horticulturae*, 56: 37-44.
- Franclet, A., 1979 - *Études et Recherches*, 12: 3-18.
- Franclet, A., 1980 - *Annales Afocel*: 12-41.
- Frydman, V. M., P. F. Wareing, 1973a - *J. Exp. Bot.* 24: 1131-1138.

- Frydman, V. M., P. F. Wareing, 1973b - J. Exp. Bot. 24: 1139-1148.
- Frydman, V. M., P. F. Wareing, 1974 - J. Exp. Bot. 25: 420-429.
- Gardner, F. E., 1929 - Proc. Amer. Soc. Hort. Sci. 26: 101-104.
- Gillespie, H. L., 1956 - Ca. Avoc. Soc. Yearb. 40: 132-134.
- Gillespie, H. L., 1957 - Ca. Avoc. Soc. Yearb. 41: 94-96.
- Girouard, R. M., 1969 - Can. J. Bot. 47: 687-699.
- Gregory, L. E., 1951 - Turrialba, 1: 201-203.
- Griggs, W. H., B. T. Iwakiri, 1961 - Proc. Amer. Soc. Hort. Sci. —
77: 73-89.
- Gupta, P. K., A. F. Mascarenhas, V. Jagannathan, 1981 - Plant Sci.—
20: 195-201.
- Gupta, P. K., A. L. Nadgir, A. F. Mascarenhas, V. Jagannathan, 1980
- Plant Sci. Lett. 17: 259-268.
- Haas, A. R. C., 1937 - Ca. Avoc. Soc. Yearb. 22: 126-130.
- Hackett, W. P., 1970 - J. Amer. Soc. Hort. Sci. 95: 398-402.
- Hackett, W. P., 1976 - Acta Horticulturae, 56: 143-154.
- Halliwell, B., F. Larkbey, 1974 - Plant Propagator, 20: 12-13.
- Hartmann, H. T., D. E. Kester, 1975 - Prentice-Hall, Inc., Englewood
Cliffs, New Jersey.
- Hess, C. E., 1959 - Proc. 9th Ann. Mtgs. Plant Prop. Soc. 39-43.
- Hess, C. E., 1960 - Proc. Int. Plant Prop. Soc. 10: 118-123.
- Hess, C. E., 1962 - Proc. 16th Int. Hort. Cong. 4: 385-386.
- Hess, C. E., 1963 - In: Regulateurs Naturels de la Croissance Vegetale, J. P. Nitsch, National de la Recherche Scientifique, Paris,
France. pp. 517-527.
- Hess, C. E., 1965 - Comb. Proc. Int. Plant Prop. Soc. 15: 181-186.
- Hess, C. E., 1967 - Proc. XVII Int. Hort. Congr. 3: 443-451.
- Heuser, Ch. W., 1976 - Acta Horticulturae, 56: 251-261.
- Heuser, C. W., C. E. Hess, 1972 - J. Amer. Soc. Hort. Sci. ———
97: 392-396.

- Heybroek, H. M., T. Visser, 1976 - *Acta Horticulturae*, 56: 71-80.
- Ivanioka, J., A. Pretova, 1980 - *Sci. Horticulturae*, 12: 77-82.
- James, D. J., 1979 - *J. Hort. Sci.* 54: 273-277.
- Jaynes, R. A., 1973 - *Amer. Nurseryman*, 137: 65-69.
- Jones, O. P., S. G. J. Hatfield, 1976 - *J. Hort. Sci.* 51: 495-499
- Kadman, A. 1976 - *Ca. Avoc. Soc. Yearb.* 59: 58-60.
- Kwei, Y.-L., T.-r. Tsai, H.-h. An, J.-r. Wang, 1978 - *Proc. ———*
Symp. Plant Tissue Culture, Peking, 726.
- Lavee, S., G. C. Martin, 1981 - *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* ———
 106: 14-18.
- Leopold, A. C., T. H. Plummer, 1961 - *Plant Physiol.* 36: 589-592.
- Leshem, Y., B. Lunenfeld, 1968 - *Plant Physiol.* 43: 313-317.
- Lewin, I. J., E. R. Montaldi, O. H. Caso, 1963 - *Rev. Investiga -*
ciones Agrícolas, B. Aires 17: 407-411.
- Libby, W. J., J. V. Hood, 1976 - *Acta Horticulturae*, 56: 91-98.
- Martin, B., G. Quillet, 1974 - *Bois et Forest des Tropiques, —*
 157: 21-40.
- McCown, B., R. Amos, 1979 - *Int. Plant Prop. Soc.* 29: 387-393.
- Montaldi, E. R., O. H. Caso, I. J. Lewin, 1963 - *Rev. Invest. ———*
Agri., B. Aires 17: 441-445.
- Morgan, D. L., E. L. McWilliams, W. C. Parr, 1980 - *HortScience, -*
 15: 493-494.
- Mosella, L. Ch., J. J. Macheix, 1979 - *C. R. Acad. Sci. Paris, —*
 289: 567-570.
- Mullins, M. G., Y. Nair, P. Sampet, 1979 - *L. Ann. Bot.* 44: 623-
 627.
- Murashige, T., 1979 - *In: Prop. of Higher Plants Through Tissue -*
Culture, K. W. Hughes, R. Heuke and M. Constantin, Eds., —
Univ. Tenn. Symp. Proc. pp 14-24.
- Murashige, T., F. Skoog, 1962 - *Physiol Plant.* 15: 473-497.

- Nasr, T. A., F. I. Abdel-Hamid, 1971 - *Alexandria J. Agric. Res.* — 19: 331-341.
- Nelson, S. H., 1967 - *Can. J. Plant Sci.* 47: 327-329.
- Nelson, S. H., 1976 - *Plant Propagator*, 23: 4-5.
- Nozeran, R., L. Bancilhon, 1972 - *Ann. Amélior. Plantes*, 22: 167-185.
- Passecker, F., 1973 - *Die Bodenkultur*, 24: 132-140.
- Paupardin, C., 1969 - *C. R. Acad. Sci. Paris*, 269: 1352-1354.
- Pelham, J., P. A. Mason, 1978 - *Ann. Appl. Biol.* 88: 415-419.
- Pieringer, A. P., R. Hanks, 1965 - *A. R. Fla. Agric. Exp. Stat.* — 1964-1965, 228-229.
- Porlingis, I. C., I. Therios, 1976 - *J. Hort. Sci.* 51: 31-39.
- Pryor, L. D., R. R. Willing, 1963 - *Aust. For.* 27: 52-62.
- Reynolds, J. F., T. Murashige, 1978 - *In Vitro* 15: 383-387.
- Robbins, W. J., 1960 - *Amer. J. Bot.* 47: 485-491.
- Robbins, W. J., A. Hervey, 1970 - *Amer. J. Bot.* 57: 452-457.
- Robinson, L. W., P. F. Wareing, 1969 - *New Phytol.* 68: 67-78.
- Rogler, G. E., M. E. Dahmus, 1974 - *Plant Physiol.* 54: 88-94.
- Romberger, J. A., 1976 - *Acta Horticulturae*, 56: 301-317.
- Rugini, E., G. Fontanazza, G. Bonghi, 1980 - In: Plant and Cell Cultures: Results and Perspectives, F. Sala, B. Parisi, R. Cella and O. Ciferri, Eds., pp. 317-318.
- Rücker, W., C. Paupardin, 1969 - *C. R. Acad. Sci. Paris*, 268: 1279-1281.
- Sax, K., 1962 - *Ann. Rev. Plant Physiol.* 13: 489-506.
- Schaffalitzky de Muckadell, M., 1954 - *Physiol. Plant*, 7: 782-796.
- Schreider, L. R., M. Kawase, 1975 - *HortScience*, 10: 615.
- Shafir, M., 1969 - *HortScience*, 4: 97-98.
- Shafir, M., 1970 - *Agricult. Res. Organiz.* (10 years report, 1960-69) Bet Dagan, Israel, 50-54.

- Singh, R. P., S. M. Singh, 1961 - *Indian J. Hort.* 18: 202-211.
- Smith, D. R., T. A. Thorpe, 1977 - *Bot. Gaz.* 138: 434-437.
- Smith, I. E., B. N. Wolstenholme, P. Allan, 1974 - *Agroplanta*, 6: 21-28.
- Snir, I., 1980 - *Sci. Hort.* 14: 139-143.
- Snir, I., A. Erez, 1980 - *HortScience*, 15: 597-598.
- Spaulding, S. E., 1960 - U.C.L.A. M. S. Dissertation.
- Soutemyer, V. T., 1937 - *Iowa Agr. Exp. St. Res. Bull.* 220: - 308-352.
- Soutemyer, V. T., O. K. Britt, J. R. Goodin, 1961 - *Proc. Amer. Soc. Hort. Sci.* 77: 552-557.
- Tarasenko, M. T., M. A. Agafonova, T. E. Usevich, 1973 - *Izvest. Timiry. Sel'sk. Akad.* 6: 111-123. Cited by E. Ulyatt, - 1974. In: *Annotated Bibliography on Juvenility in Woody - Plants*, Query File No. 32/74-6216.
- Tchernoff, V., 1963 - *Acta Bot. Neerland*, 12: 40-50.
- Teixeira, S. L., 1981 - Ph. D. Dissertation, U. C. Riverside.
- Thimann, K. V., A. L. Delisle, 1939 - *J. Arnold Arbor.* — 20: 116-136.
- Trippi, V. S., 1963 - *Phyton, Argentina*, 20: 160-166.
- Vieitez, A. M., M. L. Vieitez, 1980a - *J. Hort. Sci.* 55: 83-84.
- Vieitez, A. M., E. Vieitez, 1980b - *Physiol. Plant.* 50: — 127-130.
- Wang, P. J., L. C. Huang, 1976 - *In Vitro* 12: 260-262.
- Wareing, P. F., V. M. Frydman, 1976 - *Acta Horticulturae*, — 56: 57-69.
- Weatherhead, M. A., J. Burdon, G. G. Henshaw, 1978 - *Z. Pflanzenphys.* 89: 141-147.
- Weatherhead, M. A., J. Burdon, G. G. Henshaw, 1979 - *Z. Pflanzenphys.* 94: 399-405.

- Whitehead, H. C. M., K. L. Giles, 1977 - N. Z. J. For. Sci. ———
7: 40- 43.
- Winton, L. L., 1978 - In: Frontiers of Plant Tissue Culture. —
T. A. Thorpe, Ed., I.A.P.T.C. pp. 419 - 426.
- Yokoyama, T., M. Takeuchi, 1976 - *Phytomorphology*, 26: 273-275.
- Young, L. B., 1961 - *Calif. Avoc. Soc. Yearb.* 45: 63-66.
- Zenk, M. H., G. Muller, 1963 - *Nature*, 200: 761-763.
- Zimmerman, R. H., 1973 - *Acta Horticulturae*, 34: 139 - 142.

II. EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA EN CULTIVOS DE CALLO.

El desarrollo de embriones procedentes de células distintas al cigoto es evidencia de la totipotencia de las células vegetales. De acuerdo con Tisserat, Esan y Murashige (1979), la existencia natural de embriones no-zigóticos se ha observado al menos en 59 familias de angiospermas; este fenómeno también se ha manifestado in vitro en otras 12 familias. - La embriogénesis somática no ha sido observada previamente en aguacate.- En esta investigación se señala por primera vez la ocurrencia de este fenómeno en tejidos de oallo procedentes de embriones zigóticos obtenidos de frutos inmaduros.

El embrión joven fué el propágulo seleccionado inicialmente puesto que las investigaciones con otras plantas, v.g., Phoenix dactylifera — (Reynolds y Murashige, 1978), Theobroma cacao (Pence, Hasegawa y Janick, 1979) y Zea mays (Green y Philips, 1975), han mostrado que cuando todo lo demás da resultados negativos, el fenómeno de embriogénesis somática puede aún ser observado en cultivos de células originadas a partir de un joven embrión zigótico. Frutos de 9 mm de longitud del cultivar Haas se desinfectaron sumergiéndolos durante 10 minutos en una solución conteniendo 0.5% de hipoclorito sódico y 0.1% de Tween 20 como emulsificador; posteriormente se lavaron 3 veces con agua estéril de autoclave. Se separaba la región chalazal del óvulo seleccionado transversalmente. El pericarpio y la parte del óvulo que había sido retenida se cortaban cuidadosamente hasta aislar el embrión. En los frutos utilizados, los embriones tenían de 0.6 a 0.8 mm de longitud y se encontraban embebidos en el endospermo gelatinoso de la zona micropilar del óvulo. Se elevaba cuidadosamente el embrión en el extremo de la cuohilla y se transfería inmediatamente al medio nutritivo. Se plantó un embrión por cada tubo.-

Los cultivos se incubaron a 27° C y bajo 16 horas de iluminación a — 1000 lux (lámparas Gro Lux de Sylvania, de espectro regular).

El medio de nutrición contenía como ingredientes basales las sales de Murashige y Skoog (Murashige y Skoog, 1962) y lo siguiente en mg/l: sacarosa, 30.000; tiamina ·HCl, 0.4; i-inositol, 100; y agar TC (KC — Biological, Inc.), 8000. 25 ml de medio fueron distribuidos en tubos de vidrio de 25- x 150-mm. El pH de los medios se ajustaba a 5.7 antes de añadir el agar. Los tubos se cubrían con tapones de polipropileno (Bello Glass, Inc. Kaputs) y se autoclavaban durante 15 minutos a — 1.05 kg/cms². En los experimentos realizados, 20 cultivos fueron usados por tratamiento. En un experimento inicial usando un medio suplementado con 1g/l de carbón activado (Sigma Chemical Co., neutralizado) y 0-100 mg/l 2,4D (ácido 2,4 diclorofenoxiacético), se obtuvo un callo vigoroso en los medios que contenían 3 o 10 mg/l de auxina. Sin embargo, no se observó la formación de ningún órgano, incluso después de — transferir el callo a un medio sin auxina. Posteriormente, se llevaron a cabo una serie de experimentos con picloram (ácido 4-amino-3,5,6 — tricloropicolínico). Se observaron entonces dos tipos de callo. Uno era de consistencia amorfa y color gris o marrón, el otro presentaba — crecimientos claramente delimitados, de forma esférica u ovoide, con 2-3 mm de diámetro y 2-4 mm de longitud, textura suave y color brillante, crema claro. Evidentemente, estas estructuras eran los pro-embri^ones somáticos. Al ser subcultivados, algunos de ellos dieron lugar a otras estructuras, duras, blancas, brillantes y en forma ovoidal que — al crecer adquirieron la apariencia de cotiledones. Algunas de ellas germinaron, dando lugar a tallos verdes.

Se obtuvieron muestras de tejidos representativos durante el desarrollo, se fijaron en FAA (95% etanol: ácido acético glacial: 37% formaldehído: H₂O: 50:5:10:35, V:V:V:V), se embebieron en parafina, se —

cortaron en secciones de 12 micras de grosor, y se tiñeron con hierro-hematoxilina (Berlyn y Miksche, 1976). Se encontraron similitudes muy estrechas en la anatomía de las estructuras aisladas del callo y las de los embriones zigóticos procedentes de los jóvenes frutos de aguacate. Pero los embriones que se diferenciaban del callo in vitro carecían del eje radícula-plúmula bien delineado y compacto, que se encuentra usualmente comprendido entre los cotiledones de los embriones zigóticos. Sin embargo, los embriones somáticos contenían cotiledones bien definidos, y entre los cotiledones había tejidos desarrollando solamente ápices de raíz y tallo.

Se hicieron grandes esfuerzos para estimular el proceso embriogénico. Los pro-embryones se formaban igual en un callo que había sido establecido en constante obscuridad o bajo una iluminación de 16 horas. Para la iniciación de un callo que eventualmente originara embriones, un suplemento de 0,1 mg/l de picloram pareció ser crítico. La proporción de pro-embryones era más alta en concentraciones de picloram de 0.01 a 0.1 mg/l. La iniciación de embriones no se vio afectada por las concentraciones de sacarosa, aunque no hubo crecimiento de callo en la ausencia de sacarosa. Tampoco se vio alterada por adiciones de 1 a 3 mg/l de caseína hidrolizada o 0.1% de carbón activado.— Similarmente, tratamientos con 10 mg/l de ABA (ácido abscísico) no afectaron el proceso de transformación de los pro-embryones en embriones claramente reconocibles. Los intentos para inducir un porcentaje más alto de germinación de los embriones perfectamente desarrollados— con 0.1 - 10 mg/l GA₃ (ácido giberélico), 3-100 mg/l BA (N⁶-benziladénina) y temperatura fría (12° C) tampoco tuvieron éxito.

Esta investigación muestra que el fenómeno de embriogénesis somática puede ser observado en otra especie y reconfirma el concepto de que la totipotencia es una cualidad universal de las células vegetales.

Pero la expresión del potencial, aunque se observa en todas las células zigóticas, es progresivamente reprimida durante la ontogenia. Por consiguiente, el éxito en la regeneración de plantas entre especies muy — difíciles de manipular in vitro, radica en el propágulo elegido, como — embriones zigóticos muy jóvenes. Las variaciones de los ingredientes — usuales del medio de cultivo o de los parámetros de las condiciones ambientales permanecen inadecuadas como medio para manipular la expresión de la totipotencia de la célula.

- Berlyn, G. P., J. P. Miksche, 1976 - Iowa State University Press, — Ames, Iowa.
- Green, C. E., R. L. Phillips, 1975 - Crop Sci. 15: 417-427.
- Murashige, T., F. Skoog, 1962 - Physiol. Plant, 15: 473-497.
- Pence, V. C., P. M. Hasegawa, J. Janick, 1979 - J. Amer. Soc. Hort.-Sci. 104: 145-148.
- Reynolds, J. F., T. Murashige, 1978 - In Vitro 15: 383-387.
- Tisserat, B., E. B. Esan, T. Murashige, 1979 - Hort. Rev. 1: 1-78.-



FUNDACION JUAN MARCH
SERIE UNIVERSITARIA

TITULOS PUBLICADOS

Serie Roja

(Geología, Ciencias Agrarias, Ingeniería, Arquitectura y Urbanismo)

- | | | | |
|----|---|----|---|
| 3 | Velasco, F.:
Skarns en el batolito de Santa Olalla. | 38 | Lasa Dolhagaray, J. M., y Silván López, A.:
Factores que influyen en el espigado de la remolacha azucarera. |
| 6 | Alemán Vega, J.:
Flujo inestable de los polímeros fundidos. | 41 | Sandoval Hernández, F.:
Comunicación por fibras ópticas. |
| 9 | Fernández-Longoria Pinazo, F.:
El fenómeno de inercia en la renovación de la estructura urbana. | 42 | Pero-Sanz Elorz, J. A.:
Representación tridimensional de texturas en chapas metálicas del sistema cúbico. |
| 13 | Fernández García, M.ª P.:
Estudio geomorfológico del Macizo Central de Gredos. | 43 | Santiago-Alvarez, C.:
Virus de insectos: multiplicación, aislamiento y bioensayo de Baculovirus. |
| 15 | Ruiz López, F.:
Proyecto de inversión en una empresa de energía eléctrica. | 46 | Ruiz Altisent, M.:
Propiedades físicas de las variedades de tomate para recolección mecánica. |
| 23 | Bastarreche Alfaro, M.:
Un modelo simple estático. | 58 | Serradilla Manrique, J. M.:
Crecimiento, eficacia biológica y variabilidad genética en poblaciones de dípteros. |
| 24 | Martín Sánchez, J. M.:
Moderna teoría de control: método adaptativo-predictivo. | 64 | Farré Muntaner, J. R.:
Simulación cardiovascular mediante un computador híbrido. |
| 31 | Zapata Ferrer, J.:
Estudio de los transistores FET de microondas en puerta común. | 79 | Fraga González, B. M.:
Las Giberelinas. Aportaciones al estudio de su ruta biosintética. |
| 33 | Ordóñez Delgado, S.:
Las Bauxitas españolas como mena de aluminio. | 81 | Yáñez Parareda, G.:
Sobre arquitectura solar. |
| 35 | Juvé de la Barreda, N.:
Obtención de series aneuploides en variedades españolas de trigo común. | 83 | Díez Viejobueno, C.:
La Economía y la Geomatemática en prospección geoquímica. |
| 36 | Alarcón Alvarez, E.:
Efectos dinámicos aleatorios en túneles y obras subterráneas. | 90 | Pernas Galí, F.:
Master en Planificación y Diseño de Servicios Sanitarios. |

- 97 Joyanes Pérez, M.ª G.:
Estudio sobre el valor nutritivo de la proteína del mejillón y de su concentrado proteico.
- 99 Fernández Escobar, R.:
Factores que afectan a la polinización y cuajado de frutos en olivo (*Olea europaea* L.).
- 104 Oriol Marfá i Pagés, J.:
Economía de la producción de flor cortada en la Comarca de el Mesme.
- 109 García del Cura, M.ª A.:
Las sales sódicas, calcosódicas y magnésicas de la cuenca del Tajo.
- 112 García-Arenal Rodríguez, F.:
Mecanismos de defensa activa en las plantas ante los patógenos. Las Fitalexinas en la interacción *Phaseolus vulgaris*-*Botrytis cinerea*.
- 114 Santos Guerra, A.:
Contribución al conocimiento de la flora y vegetación de la isla de Hierro (Islas Canarias).
- 120 Vendrell Saz, M.:
Propiedades ópticas de minerales absorbentes y su relación con las propiedades eléctricas.
- 123 Pulido Bosch, A.:
Datos hidrogeológicos sobre el borde occidental de Sierra Nevada.
- 137 Berga Casafont, L.:
Estudio del comportamiento reológico de la sangre humana. Aplicaciones al flujo sanguíneo.
- 146 Arribas Moreno, A.:
Distribución geoquímica de los elementos en trazas de los yacimientos españoles del tipo B. G. P. C.
- 172 García Hoffmann, M.:
Sobre el estudio y diseño de protocolos de comunicación.
- 202 Fernández de la Cruz, M. N.:
Vulcanismo permo-carbonífero en la Cordillera Ibérica. (Rama Occidental.)

