

Inducción *in vitro* de brotes de dos cultivares de aguacate raza Mexicana *Persea americana* var. *drymifolia* Schldl. & Cham*

In vitro induction seedlings to two cultivars Mexican race avocado *Persea americana* var. *drymifolia* Schldl. & Cham

Alejandro Ibarra-López¹, Ma. del Carmen Ojeda-Zacarias^{1§}, Eduardo Alejandro García-Zambrano² y Adriana Gutiérrez-Diez²

¹Universidad Autónoma de Nuevo León- Facultad de Agronomía, Unidad Marín. Carretera Zuazua-Marín km 17.5. Marín, Nuevo León, México. C.P. 66700. Tel: (81) 1340-4399. (dry-alex@hotmail.com). ²Universidad Autónoma de Nuevo León- Facultad de Agronomía, Campus Ciencias Agropecuarias. Francisco Villa S/N. Col. Ex-Hacienda El Canadá. Gral. Escobedo, Nuevo León, México. C. P. 66050. Tel: (81) 1340-4399. (eagarci1@hotmail.com; mcgudiez@hotmail.com). [§]Autor para correspondencia: ojedacz@yahoo.com.mx.

Resumen

Uno de los enfoques de la micropropagación en aguacate es la multiplicación de portainjertos de interés comercial. En el presente trabajo se tuvo como objetivo la identificación del medio de cultivo adecuado para las etapas de establecimiento e inducción de brotes, de los cultivares Huevo de Toro y Mantequilla, para lo cual se establecieron segmentos internodales con yemas axilares (microestacas) en los medios de cultivo MS, DCR y Yasuda, adicionados con 2 mg L⁻¹ de 6-bencilaminopurina (BAP), 0.3 mg L⁻¹ de ácido indolbutírico (AIB), 2 g L⁻¹ de oxitetraciclina y 2 g L⁻¹ de benomilo. Se evaluaron las variables contaminación, oxidación y viabilidad de los explantes a 14 días después de la siembra. El medio de cultivo Yasuda fue adecuado para la etapa de establecimiento aséptico, el cual indujo la mayor cantidad de explantes viables (>40%). Estos fueron subcultivados en los medios de inducción de brotes, MS, DCR y Yasuda suplementados con 20% de agua de coco (AC), 2 mg L⁻¹ BAP, 0.5 mg L⁻¹ de ácido giberélico (AG₃) y 0.01 mg L⁻¹ de ácido indolacético (AIA) (M1, M2 y M3); 2 g L⁻¹ de caseína hidrolizada (CH), 1 mg L⁻¹ BAP y 0.3 mg L⁻¹ AIB (M4, M5 y M6). Se evaluó el número de brotes por explante, longitud de brotes y número de hojas a 60 y 90 días del subcultivo. En el cultivar Huevo de Toro, los medios M1 y M2 son satisfactorios para la proliferación

Abstract

One approach micropropagation avocado rootstock is the multiplication of commercial interest. In the present study aimed to identify the suitable culture medium for the stages of establishment and induction of buds of cultivars Huevo de Toro and butter, for which settled internodal segments with axillary buds (micropiles) in the media MS, DCR and Yasuda culture, added with 2 mg L⁻¹ of 6-benzylaminopurine (BAP), 0.3 mg L⁻¹ indolbutiric acid (AIB), 2 g L⁻¹ of oxytetracycline and 2 g L⁻¹ benomyl. The variables contamination, oxidation and viability of the explants were evaluated 14 days after sowing. The culture medium was Yasuda stage suitable for aseptic accommodation which induced the most viable explants (>40%). These were subcultured in mass seedlings induction, MS, DCR and Yasuda supplemented with 20% coconut water (AC), 2 mg L⁻¹ BAP, 0.5 mg L⁻¹ of gibberellic acid (AG₃) and 0.01 mg L⁻¹ indoleacetic acid (AIA) (M1, M2 and M3); 2 g L⁻¹ casein hydrolyzate (CH), 1 mg L⁻¹ BAP and 0.3 mg L⁻¹ AIB (M4, M5 and M6). The number of seedlings s per explants, seedlings length and number of leaves at 60 and 90 days subculture was evaluated. In the growing Huevo de Toro, M1 and M2 are satisfactory means for the proliferation of seedlings values 1.19-1.5, 1.07-1.09 cm

de brotes con valores de 1.19-1.5, longitud de brotes 1.07-1.09 cm, y para el número de hojas de 1.21. En el caso del cultivar Mantequilla, el M3, fue el mejor para las variables: número de brotes (1.89-2.14), longitud de brotes (1.21-1.23 cm) y número hojas (1.21-2.38).

Palabras clave: *Persea americana*, *in vitro*, agua de coco, caseína hidrolizada, organogénesis.

Introducción

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

Mediante la propagación tradicional de aguacate, los programas de mejoramiento para incorporar resistencia a enfermedades y otros rasgos deseables, son tardados y minuciosos debido al largo período juvenil y heterocigosidad de la especie (Ben-Ya'acov, 1987; Pliego-Alfaro y Bergh, 1992; Litz *et al.*, 2007; Raharjo *et al.*, 2008). De igual manera se ve afectado el uso de portainjertos a partir de semilla, los cuales no garantizan homogeneidad genética y comportamiento estable en campo (Ben-Ya'acov, 1987; Köhne, 1992). Sin embargo, la propagación clonal de aguacate se ha logrado principalmente por injerto, un proceso costoso y que consume mucho tiempo (Brokaw, 1987). Debido a esto, se deben implementar y desarrollar diversos métodos de propagación para el cultivo de aguacate (Barceló-Muñoz *et al.*, 1999).

El cultivo de tejidos vegetales permite la propagación clonal de un gran número de plántulas en un periodo breve, bajo condiciones controladas, en espacios pequeños y con poca mano de obra, además de garantizar sanidad y estabilidad genética (Kumar y Loh, 2012). La micropropagación en aguacate está enfocada en propagar masivamente portainjertos de interés comercial, principalmente con tolerancia a enfermedades transmitidas por el suelo o con resistencia a condiciones de suelos salinos o calcáreos, así como para revitalizar material adulto que posteriormente podría multiplicarse por técnicas

seedlings length, and the number of sheets 1.21. For the cultivar butter, M3, was the best for the variables: number of seedlings (1.89-2.14), seedlings length (1.21-1.23 cm) and number sheets (1.21-2.38).

Keywords: *Persea americana* Mill., *in vitro*, coconut water, hydrolyzed casein, organogenesis.

Introduction

Avocado (*Persea americana* Mill.) Is an important fruit crop in the tropics and subtropics, originate from the area of Mesoamerica (Premkumar *et al.*, 2003; Galindo-Tovar *et al.*, 2008). It is an evergreen tree of the Lauraceae family cultivated for its fruits, which are a balanced source of protein, carbohydrates, vitamins and minerals, but mainly because of its high oil content (Ben-Ya'acov y Michelson, 1995; Knight, 2002; Chanderbali *et al.*, 2008).

Through traditional avocado spread, breeding programs to incorporate disease resistance and other desirable traits, they are time-consuming and thorough due to the long juvenile period and heterozygosity of the species (Ben-Ya'acov, 1987; Pliego-Alfaro and Bergh, 1992; Litz *et al.*, 2007; Raharjo *et al.*, 2008). Similarly it affected using rootstocks from seed, which do not ensure stable genetic homogeneity and field behavior (Ben-Ya'acov, 1987; Köhne, 1992). However, avocado clonal propagation is achieved mainly by grafting, an expensive process and time consuming (Brokaw, 1987). Because of this, you should implement and develop various propagation methods for growing avocado (Barceló-Muñoz *et al.*, 1999).

The plant tissue culture clonal propagation allows a large number of seedlings in a short time, under controlled conditions, in small spaces with little labor, and ensure health and genetic stability (Kumar and Loh, 2012). Micropropagation avocado is focused on spreading massively rootstocks of commercial interest, mainly tolerant soil-borne diseases or conditions with resistance to saline soils or calcareous as well as to revitalize adult material could then be multiplied by conventional techniques (Barceló-Muñoz and Pliego-Alfaro, 2003; Litz *et al.*, 2007). Moreover, the collection and conservation of germplasm is a priority to initiate breeding programs of this fruit, and avoid genetic erosion (Vidales-Fernández *et al.*, 2011).

convencionales (Barceló-Muñoz y Pliego-Alfaro, 2003; Litz *et al.*, 2007). Por otra parte, la recolecta y conservación de germoplasma es prioritario para iniciar los programas de mejoramiento genético de este frutal, además de evitar la erosión genética (Vidales-Fernández *et al.*, 2011).

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

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

Materiales y métodos

En el Laboratorio de Biotecnología Vegetal, Unidad Marín, Facultad de Agronomía, UANL, durante 2013-2014, se establecieron en invernadero, plantas de aguacate de la raza Mexicana (*P. americana* var. *drymifolia* Schltdl. & Cham), de los cultivares Huevo de Toro y Mantequilla, provenientes del municipio de Aramberri, N. L., de estas se recolectó el material vegetal utilizado en la presente investigación.

Desinfestación

La pre-desinfestación consistió en seleccionar varetas de 10 a 15 cm de longitud en óptimas condiciones y con gran número de yemas axilares, considerando la medición de la parte apical hacia abajo. Las varetas se lavaron con jabón líquido y se enjuagaron con agua potable. Posteriormente fueron seccionadas en unidades más pequeñas de 2-3

Understanding the factors that control the development process *in vitro* is essential for the establishment of an efficient regeneration system (Ahmed, 2002). Avocado, regeneration by direct organogenesis has been reported in the literature; however, several factors can significantly affect the success of this crop as grown used, the composition of the culture medium, concentration of growth regulators and their interaction with the environment, explant type and stage of development, and time collected plant material (Cooper, 1987; Dalsaso and Guevara, 1988; Zirari and Lionakis, 1994; Castro *et al.*, 1995; Barringer *et al.*, 1996; Barceló-Muñoz *et al.*, 1999; Rodríguez *et al.*, 1999; de la Viña *et al.*, 2001; Vidales-Fernández, 2002; Barceló-Muñoz y Pliego-Alfaro, 2003; Nhut *et al.*, 2008; Zulfiqar *et al.*, 2009; Cortés-Rodríguez *et al.*, 2011).

Therefore, the objective of this research is directed toward the identification medium and the combination of growth regulators and additives, suitable for the stages of establishment and seedlings induction in two cultivars of avocado Mexican race (*P. americana* var. *drymifolia* Schltdl. & Cham).

Materials and methods

In the Plant Biotechnology Laboratory, Unit Marín, Faculty of Agriculture, UANL, during 2013-2014, settled in the greenhouse, plants avocado Mexican race (*P. americana* var. *drymifolia* Schltdl. & Cham) cultivars Huevo de Toro and butter, from the municipality of Aramberri, NL, these plant material used in this research was collected.

Disinfestation

The pre-disinfestation was to select twigs of 10 to 15 cm in length in optimum conditions and with large number of axillary buds, considering the measurement of the apical side down. The braces were washed with liquid soap and rinsed with potable water. They were then sectioned into smaller units approximately 2-3 cm. In order to decrease the percentage of phenols, the plant material is placed in a soap solution for three periods of 10 min c/u and constant stirring. Followed by three washes with double distilled water to proceed to place them in a fungicide-bactericidal solution consisting of 2 g L⁻¹ Agry-Gent Plus 800 (Gowan Mexicana), 1.5 mL L⁻¹ Amistar Gold (Syngenta), 2 g L⁻¹ Antrak PH 500 (Trident Agrochemistry), 800 mg L⁻¹ citric

cm aproximadamente. Con la finalidad de disminuir el porcentaje de fenoles, el material vegetal se colocó en una solución jabonosa por tres lapsos de 10 min c/u y en constante agitación. Seguido de tres enjuagues con agua bidestilada para proceder a colocarlos en una solución fungicida-bactericida, compuesta de 2 g L⁻¹ de Agry-Gent Plus 800 (Gowan Mexicana), 1.5 mL L⁻¹ de Amistar Gold (Syngenta), 2 g L⁻¹ de Antrak 500 PH (Agroquímica Tridente), 800 mg L⁻¹ de ácido cítrico, 800 mg L⁻¹ de ácido ascórbico y 30 g L⁻¹ de sacarosa durante 1.5 horas en agitación, finalizando con un enjuague con agua bidestilada. En estas condiciones el material vegetal fue llevado a la campana de flujo laminar para realizar la desinfestación.

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

Establecimiento *in vitro*

El tipo de explantes utilizados fueron segmentos internodales con una o dos yemas axilares (microestacas), los cuales fueron sembrados en los medios de cultivo MS (Murashige y Skoog, 1962) con macroelementos al 50%, DCR (Gupta y Durzan, 1985) y Yasuda (Yasuda *et al.*, 1985), suplementados con vitaminas, 30 g L⁻¹ de sacarosa, 2.0 mg L⁻¹ de BAP, 0.3 mg L⁻¹ de AIB, 2 g L⁻¹ de oxitetraciclina, 2 g L⁻¹ de benomilo y 4.4 g L⁻¹ de Phytigel™. El pH se ajustó a 5.7 en los medios MS y Yasuda, mientras que en DCR fue 6, posteriormente esterilizados a 1.2 kg cm⁻² de presión a 121 °C durante 15 min. Concluida la siembra, las unidades experimentales fueron incubadas a una temperatura de 26 ± 2 °C bajo un fotoperíodo de 16 horas luz durante dos semanas. Las variables que se evaluaron fueron contaminación, oxidación y viabilidad de los explantes.

Inducción de brotes

Después de 14 días del establecimiento *in vitro*, las microestacas viables se transfirieron a los mismos medios de cultivo modificados, los cuales fueron MS con macroelementos 50%, DCR y Yasuda, adicionados con vitaminas, 30 g L⁻¹ de sacarosa y solidificados con 4.4 g L⁻¹ de

acid, 800 mg L⁻¹ of ascorbic acid and 30 g L⁻¹ sucrose stirring for 1.5 hours, ending with a rinse with bidistilled water. Under these conditions the plant material was taken to the laminar flow hood for disinfestation.

Disinfestation consisted of immersing the plant material in 100% ethanol for 1 min, followed by immersion in a solution with commercial bleach 50% v/v plus 0.2% Tween-20 for 20 min. It concluded the time was rinsed three times with sterile distilled water. Immediately the plant material is placed in a solution of PVP (polyvinylpyrrolidone) 400 mg L⁻¹ to reduce oxidation. Finally the material was sectioned into explants of 1 cm in length to be subsequently used in the setting means.

Establishing *in vitro*

The type of explants used were internodal segments with one or two axillary buds (micropiles), which are sown on media MS culture medium (Murashige and Skoog, 1962) with macroelementos 50%, DCR (Gupta and Durzan, 1985) Yasuda (Yasuda *et al.*, 1985) supplemented with vitamins, 30 g L⁻¹ sucrose, 2.0 mg L⁻¹ BAP, 0.3 mg L⁻¹ of AIB, 2 g L⁻¹ of oxytetracycline, 2 g L⁻¹ of benomyl and 4.4 g L⁻¹ Phytigel™. The pH was adjusted to 5.7 and Yasuda on MS media, while 6 DCR was then sterilized at 1.2 kg cm⁻² pressure at 121 °C for 15 min. After the sowing, the test units were incubated at a temperature of 26 ± 2 °C under a 16 hour photoperiod light for two weeks. The variables evaluated were contamination, oxidation and viability of the explants.

Seedlings induction

After 14 days of establishing *in vitro*, viable microcuttings were transferred to the same media modified crop, which was 50% MS with macroelements, DCR and Yasuda containing added vitamins, 30 g L⁻¹ sucrose and solidified with 4.4 g L⁻¹ Phytigel™; also supplemented combinations: 20% coconut water (AC), 2.0 mg L⁻¹ BAP, 0.01 mg L⁻¹ IAA and 0.5 mg L⁻¹ AG₃ (Sandoval-Prando *et al.*, 2014); and the second combination of 2 g L⁻¹ casein hydrolyzate (CH), 1 mg L⁻¹ BAP and 0.3 mg L⁻¹ of AIB (Table 1). The pH of the culture media was adjusted to 5.7 (MS and Yasuda) and 6.0 (DCR) subsequently sterilized at 1.2 kg cm⁻² pressure at 121 °C for 15 min. The micropiles were incubated under the same conditions described above. the number of seedlings s per explant, seedlings length and number of leaves at 60 and 90 days after subculture were evaluated.

Phytigel™; además suplementados de las combinaciones: 20% de agua de coco (AC), 2.0 mg L⁻¹ de BAP, 0.01 mg L⁻¹ de AIA y 0.5 mg L⁻¹ de AG₃ (Sandoval-Prando *et al.*, 2014); y la segunda combinación de 2 g L⁻¹ de caseína hidrolizada (CH), 1 mg L⁻¹ de BAP y 0.3 mg L⁻¹ de AIB (Cuadro 1). El pH de los medios de cultivo se ajustó a 5.7 (MS y Yasuda) y 6.0 (DCR) esterilizado posteriormente a 1.2 kg cm⁻² de presión a 121 °C durante 15 min. Las microestacas se incubaron bajo las mismas condiciones descritas anteriormente. Se evaluó el número de brotes por explante, longitud de brotes y número de hojas a 60 y 90 días después del subcultivo.

Análisis estadístico

Para la etapa de establecimiento, las variables cualitativas evaluadas fueron: contaminación, oxidación y viabilidad de los explantes a 14 días después de la siembra en los tres medios de cultivo de dicha etapa con ocho repeticiones, los cuales se incubaron bajo un diseño completamente al azar en condiciones homogéneas. Estas variables se analizaron mediante tablas de contingencia y la prueba de Ji-cuadrada. Mientras que, en la etapa de inducción de brotes, se evaluaron las variables: número de brotes, longitud de brotes y número de hojas a dos y tres meses después del establecimiento de los explantes. Estas variables se establecieron bajo un diseño completamente al azar con un arreglo factorial 2x6, donde el factor A fueron los cultivares y el factor B fueron los medios de inducción, obteniendo un total de 12 tratamientos con seis repeticiones. Se realizó un análisis de varianza con los datos previamente transformados con $\sqrt{X+1}$ y las diferencias entre las medias de los tratamientos se compararon mediante la prueba de Tukey a 5% de probabilidad. Los datos de ambas etapas se analizaron utilizando el paquete estadístico Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) versión 21.

Resultados y discusión

Establecimiento aséptico

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

Cuadro 1. Medios de cultivo y complementos utilizados en la etapa de inducción de brotes.

Table 1. Culture media and supplements used in the stage of seedlings induction.

Medio basal	AC + BAP + AG ₃ + AIA	CH + BAP + AIB
MS	M1	M4
DCR	M2	M5
Yasuda	M3	M6

Statistic analysis

For the establishment phase, qualitative variables were: pollution, oxidation and viability of the explants to 14 days after sowing in the three culture media of said stage with eight repetitions, which were incubated under a completely randomized design under homogeneous conditions. These variables were analyzed using contingency tables and chi-square test. number of seedlings s, seedlings length and number of leaves at two and three months after the establishment of the explants: while in the seedlings induction stage, variables were evaluated. These variables were established under a completely randomized design with a factorial arrangement 2 x 6, where the factor A were the cultivars and factor B were the induction means, obtaining a total of 12 treatments with six repetitions. An analysis of variance with the data previously processed with $\sqrt{X+1}$ and the differences between treatment means was conducted were compared by Tukey test at 5% probability. Data from both stages were analyzed using the Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) version 21.

Results and discussion

Establishment aseptic

Microbial contamination and darkening of explants are major difficulties in establishing *in vitro* cultivars avocado Mexican race (Cortés-Rodríguez *et al.*, 2011). The process of disinfection of plant material had different effects on the variables evaluated.

Pollution for the media used in both cultivars established 14 days the experiment was over 50%, except in the growing medium Yasuda Huevo de Toro with 26.66% (Table 2).

La contaminación para los medios utilizados, en los dos cultivares a 14 días de establecido el experimento, fue superior al 50%, con excepción del medio Yasuda en el cultivar Huevo de Toro con 26.66 % (Cuadro 2). Es importante señalar que esta variable se vio afectada por la presencia de hongos y bacterias, los cuales impidieron el desarrollo favorable de al menos 50% de los explantes. Resultados similares muestra Cooper (1987), con 70% de contaminación en el cultivar Duke 7, reduciendo el efecto a 16% con el uso de etanol 100% y una solución de hipoclorito de sodio (NaClO) 0.5% durante 30 min. Por su parte Dalsaso y Guevara (1988), observaron el alto porcentaje de contaminación por bacterias en microestacas del cultivar Fuerte, donde el uso de bactericida en la desinfección y tratamiento de la planta madre, no fueron efectivos para disminuir la contaminación, por lo que sugieren que el patógeno se encuentra de forma endógena, situado posiblemente en los tejidos vasculares de la porción del tallo. En contribución a lo anterior, Vidales-Fernández (2002), recomienda utilizar la combinación de Agrimycin y benomilo en la pre-desinfección de los explantes, y una desinfección de hasta 40% v/v de blanqueador comercial y sembrar los explantes en medio de cultivo adicionado con benomilo hasta 2 g L⁻¹. Zulfiqar *et al.* (2009), reportan hasta 72% de contaminación por hongos y bacterias en microestacas del cultivar Fuerte, recomendando que 1% de NaClO es suficiente para la desinfección del material vegetal sin dañar gravemente al explante.

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

Table 2. Percentage of contamination, oxidation and viability of two cultivars of avocado in three culture media after two weeks of aseptic facility.

Cultivar/Medio	Contaminación	Oxidación	Viabilidad
Huevo de Toro			
MS	60.46	2.32	37.2
DCR	63.41	0	36.58
Yasuda	26.66	0	73.33
Mantequilla			
MS	65.9	6.81	27.27
DCR	78.72	0	21.27
Yasuda	58.69	0	41.3

Oxidación

En el caso de la oxidación, se hizo presente solo en el medio de cultivo MS con resultados bajos que no rebasaron el 7% en ambos cultivares (Cuadro 2). El bajo porcentaje de oxidación en los explantes puede deberse al uso de los diferentes

Importantly, this variable was affected by the presence of fungi and bacteria, which prevented the favorable development of at least 50% of the explants. Similar results shown Cooper (1987), with 70% contamination in the grown Duke 7, reducing the effect to 16% using 100% ethanol and a solution of sodium hypochlorite (NaClO) 0.5% for 30 min. For its Dalsaso and Guevara (1988) part, they noted the high percentage of bacterial contamination in micropiles cultivar Fuerte, where the use of bactericide disinfection and treatment of the mother plant, were not effective in reducing pollution, so they suggest that the pathogen is endogenously, possibly located in the vascular tissues of the stem portion. In contribution to the above, Vidales-Fernández (2002), recommended combining benomyl Agrimycin and pre-disinfection explants and disinfection of up to 40% v/v commercial bleach and plant explants amid I grow benomyl added to 2 g L⁻¹. Zulfiqar *et al.* (2009) report up to 72% contamination by fungi and bacteria in micropiles Fuerte cultivar, recommending that 1% NaClO is sufficient for disinfection of plant material without damaging severely the explant.

Oxidation

For oxidation, it was present only in the MS medium with poor results did not exceed 7% in both cultivars (Table 2). The low percentage of explants oxidation may be due to use of different antioxidants disinfection processes such

as washing the plant material with water for 30 minutes, reported by Vidales-Fernández (2002) and using PVP reported by Dalsaso and Guevara (1988). Recent research suggests the addition of ascorbic acid and activated carbon to the culture medium to reduce to 70% the oxidation process (Cortés-Rodríguez *et al.*, 2011).

agentes antioxidantes en los procesos de desinfección, como el lavado del material vegetal con agua potable durante 30 min, reportado por Vidales-Fernández (2002), así como el uso de PVP reportado por Dalsaso y Guevara (1988). Investigaciones más recientes sugieren la adición de ácido ascórbico y carbón activado al medio de cultivo para reducir hasta un 70% el proceso de oxidación (Cortés-Rodríguez *et al.*, 2011).

Viabilidad

La viabilidad de los explantes presentó valores de 22 a 37% en los medios de cultivo MS y DCR, en los cultivares utilizados. A diferencia de los anteriores, el medio de cultivo Yasuda demostró mayor viabilidad en los explantes, hasta 73.33% en el caso del cultivar Huevo de Toro. Cabe señalar que esta variable se vio afectada por el proceso de contaminación que se desarrolló en el tiempo transcurrido después del establecimiento aséptico del material vegetal (Cuadro 2).

Tablas de contingencia

Las tablas de contingencia con pruebas de Ji-cuadrada (Cuadro 3), demostraron que en los medios de cultivo MS y DCR en el tiempo establecido, las variables contaminación, oxidación y viabilidad resultaron no estar relacionadas a los cultivares utilizados, por lo que no existe relación significativa entre las variables y los cultivares ($p \leq 0.05$). Lo contrario sucedió para las mismas variables en el medio de cultivo Yasuda, donde muestran dependencia a los cultivares, es decir, si existe relación significativa entre la contaminación, oxidación y viabilidad con los cultivares ($p \leq 0.05$).

Inducción de brotes

Explantes viables provenientes de la etapa de establecimiento aséptico de ambos cultivares, se transfirieron en los medios de inducción de brotes y se evaluaron las variables número de brotes, longitud de brotes (cm) y número de hojas a los 60 y 90 días del subcultivo.

Número de brotes

La interacción de los factores cultivar x medio de inducción, demostraron que en el caso de Huevo de Toro, los medios M1 y M2 son favorables para el desarrollo de brotes, con valores de 1.32 y 1.5 brotes por explante respectivamente, (sig. $p \leq 0.05$) a 12 semanas del subcultivo. Los medios M3, M4, M5 y M6, no propiciaron el desarrollo de brotes en el cultivar Huevo de Toro. Mientras que en el caso del cultivar

Viability

The viability of the explants showed values of 22-37% in mass MS and DCR crop, cultivars used. Unlike the above, the culture medium showed higher viability Yasuda explants, to 73.33% in case of growing Huevo de Toro. Note that this variable is affected by the contamination process was developed in the time after the aseptic establishment of plant material (Table 2).

Contingency tables

The contingency tables with tests chi-square (Table 3) showed that in the mass MS and DCR cultivation in the set time, the variables contamination, oxidation and viability were not be related to the cultivars used, so no there is significant relationship between the variables and cultivars ($p \leq 0.05$). The opposite happened for the same variables in the middle of Yasuda culture, where they show dependence cultivars, ie, if there is significant relationship between pollution, oxidation and feasibility cultivars ($p \leq 0.05$).

Cuadro 3. Significancia y prueba de Ji-cuadrada de las variables contaminación, oxidación y viabilidad después de dos semanas.

Table 3. Significance and chi-square variable contamination, oxidation and viability after two weeks.

Medio de cultivo	Sig. $p \leq 0.05$	χ^2
MS	0.422	1.724
DCR	0.112	2.523
Yasuda	0.002	9.529

Seedlings induction

Viable explants from step aseptic establishing both cultivars were transferred on seedlings induction media and variable number of seedlings s, seedlings length (cm) and leaf number at 60 and 90 days subculture were evaluated.

Number of seedlings

The interaction of the factors cultivar for induction medium showed that in the case of Huevo de Toro, M1 and M2 means favorable for the development of buds, with values of 1.32 and 1.5 seedlings s per explant respectively (sig. $p \leq 0.05$) at 12 weeks of subculture. The M3, M4, M5 and M6, led means no seedlings development in the growing egg Toro. While in the case of butter cultivar, the average M3, was the most favorable seedlings growth in the times evaluated, 1.89 and 2.14 seedlings s per explant (sig. $p \leq 0.05$). In significance

Mantequilla, el medio M3, resultó ser el más favorable en el crecimiento de brotes en los tiempos evaluados, 1.89 y 2.14 brotes por explante (sig. $p \leq 0.05$). En significancia continuaron los medios M2 y M6 con valores de 1.13 a 1.5. No se presentó la formación de brotes en los medios M1, M4 y M5 en el cultivar Mantequilla (Cuadro 4; Figura 1). Resultados semejantes se han obtenido en el mismo tipo de explante, pero con modificaciones en la cantidad de reguladores de crecimiento utilizados, en diferentes cultivares, época de desarrollo, así como tipo y concentración de sales en el medio de cultivo; considerando que todos son constantes en el uso de BAP (0.1 hasta 5 mg L⁻¹) adicionado al medio de cultivo (Cooper, 1987; Dalsaso y Guevara, 1988; Barceló-Muñoz *et al.*, 1999; Vidales-Fernández, 2002; Zulfiqar *et al.*, 2009; Cortés-Rodríguez *et al.*, 2011). Sandoval-Prando *et al.* (2014), mencionan que los reguladores de crecimiento desempeñan un papel clave en el desarrollo cualitativo y cuantitativo de los brotes.

they continued M2 and M6 means with values of 1.13 to 1.5 Seedlings formation in the media M1, M4 and M5 farming Butter were not presented (Table 4; Figure 1). Similar results were obtained in the same type of explant, but with changes in the amount of plant growth regulators used in different cultivars, time of development and type and concentration of salts in the culture medium; Whereas all are consistent in the use of BAP (0.1 to 5 mg L⁻¹) added to the culture medium (Cooper, 1987; Dalsaso and Guevara, 1988; Barceló-Muñoz *et al.*, 1999; Vidales-Fernández, 2002; Zulfiqar *et al.*, 2009; Cortés-Rodríguez *et al.*, 2011). Sandoval-Prando *et al.* (2014) mention that the growth regulators play a key role in the qualitative and quantitative development of seedlings.

These results as well as previous investigations indicate that BAP, plays an important role in the induction of seedlings and explants length avocado (Barceló-Muñoz and Pliego-Alfaro, 2003; Zulfiqar *et al.*, 2009; Cortés-Rodríguez *et al.*, 2011;

Cuadro 4. Comparación de medias de la interacción cultivar por medio de inducción, en las variables número y longitud de brotes y número de hojas en el tiempo evaluado.

Table 4. Comparison of means of interaction grown through induction variables in number and seedlings length and number of leaves evaluated over time.

Cultivar	Variable	Semana	Medio de inducción						Tukey†
			1	2	3	4	5	6	
Huevo de Toro	Brotes	8	1.32 a	1.19 a	1.0 b	1.0 b	1.0 b	1.0 b	0.176
		12	1.32 a	1.5 a	1.0 b	1.0 b	1.0 b	1.0 b	0.261
	Longitud**	8	1.08 a	1.09 a	1.0 b	1.0 b	1.0 b	1.0 b	0.051
		12	1.09 a	1.07 a	1.0 b	1.0 b	1.0 b	1.0 b	0.038
	Hojas	8	1.2 a	1.0 b	1.0 b	1.0 b	1.0 b	1.0 b	0.169
		12	1.21 a	1.2 a	1.0 b	1.0 b	1.0 b	1.0 b	0.151
Mantequilla	Brotes	8	1.0 c	1.41 b	1.89 a	1.0 c	1.0 c	1.13 c	0.176
		12	1.0 c	1.5 b	2.14 a	1.0 c	1.0 c	1.34 b	0.261
	Longitud**	8	1.0 c	1.03 c	1.23 a	1.0 c	1.0 c	1.13 b	0.051
		12	1.0 c	1.02 c	1.21 a	1.0 c	1.0 c	1.08 b	0.038
	Hojas	8	1.0 d	1.21 c	2.28 a	1.0 d	1.0 d	1.45 b	0.169
		12	1.0 c	1.21 b	2.38 a	1.0 c	1.0 c	1.3 b	0.151

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

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

Sandoval-Prando *et al.*, 2014). However, Barceló-Muñoz and Pliego-Alfaro (2003) and Cortés-Rodríguez *et al.* (2011) mention that high concentrations of this controller not only reduce the number of buds formed, but also stops the growth thereof.

Sandoval-Prando *et al.* (2014), indicate that the use of coconut water in the culture medium is usually not enough to promote a satisfactory multiplication, so suggest combination with BAP and AG₃.

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

Longitud de brotes

De acuerdo a la interacción cultivar por medio de inducción, en el cultivar Huevo de Toro, los medios M1 y M2 son propicios para el crecimiento de los brotes, presentándose en valores de 1.07 a 1.09 cm en los tiempos evaluados (sig. $p \leq 0.05$). Sin embargo, no se presentó crecimiento de los brotes en los medios M3, M4, M5 y M6 en este cultivar. En el cultivar Mantequilla, el medio M3 fue el más satisfactorio en el crecimiento de los brotes en los tiempos evaluados, 1.23 y 1.21 cm respectivamente (sig. $p \leq 0.05$). En los medios M6 y M2 se observaron resultados menores, en valores de 1.02 a 1.13 cm; mientras que en los medios M1, M4 y M5 no se presentó el crecimiento de brotes (Cuadro 4; Figura 1). Estos resultados coinciden con trabajos anteriores donde se reporta un crecimiento de 0.89 hasta 2.5 cm en diferentes cultivares de aguacate, utilizando los medios de cultivo MS con macroelementos modificados y DF (Dixon y Fuller, 1976); ambos con la presencia de BAP en concentraciones de 0.5 a 5.0 mg L⁻¹ (Dalsaso y Guevara, 1988; Rodríguez *et al.*, 1999; Zulfiqar *et al.*, 2009; Cortés-Rodríguez *et al.*, 2011). Vidales-Fernández (2002), menciona que la reducción de los macroelementos en el medio MS resulta benéfico para el desarrollo de brotes, pero induce una reducción de los mismos y por consecuencia una menor cantidad de yemas axilares. Esto puede sugerir el bajo crecimiento de los brotes en los tratamientos utilizados, ya que el medio MS se utilizó con macroelementos al 50%, mientras que el Yasuda es una modificación del MS con macroelementos al 25% y vitaminas de Gamborg (Gamborg *et al.*, 1985); el medio DCR difiere en la cantidad de nitrato de amonio y nitrato de potasio y además se complementa con la adición de nitrato de calcio.

Número de hojas

La cantidad de hojas desarrolladas en el cultivar Huevo de Toro, fue en mayor grado en los medios M1 y M2, con hasta 1.21 hojas por brote (sig. $p \leq 0.05$). De igual forma los medios M3, M4, M5 y M6 no presentaron la formación de hojas en los explantes utilizados. Con respecto al cultivar Mantequilla, el medio Yasuda + AC, BAP, AG₃ y AIA, presentó los mayores valores en la formación de hojas, en los tiempos evaluados, 2.28 y 2.38 respectivamente

Seedlings length

According to the interaction cultivar through induction in the growing Huevo de Toro, M1 and M2 media is conducive to the growth of seedlings, appearing in securities of 1.07 to 1.09 cm in the days evaluated (sig. $p \leq 0.05$). But not seedlings growth in M3, M4, M5 and M6 media in this cultivar was presented. Butter in the cultivar, the average M3 was the most successful in the growth of seedlings in the times evaluated, 1.23 and 1.21 cm respectively (sig. $p \leq 0.05$). In the M6 and M2 means lower results were observed in the securities of 1.02 to 1.13 cm; while the M1, M4 and M5 means not seedlings growth (Table 4; Figure 1) was presented. These results are consistent with previous work where growth is reported 0.89 to 2.5 cm in different avocado cultivars using MS culture media with modified macro and DF (Dixon and Fuller, 1976); both in the presence of BAP in concentrations from 0.5 to 5.0 mg L⁻¹ (Dalsaso y Guevara, 1988; Rodríguez *et al.*, 1999; Zulfiqar *et al.*, 2009; Cortés-Rodríguez *et al.*, 2011). Vidales-Fernández (2002) mentions that the reduction of macroelements in MS medium is beneficial for the growth of seedlings, but induces a reduction of the same and consequently a smaller amount of axillary buds. This may suggest the low growth of buds on the treatments used, as the MS medium was used with macroelementos 50%, while Yasuda is a modification of macro-MS with 25% and vitamins Gamborg (Gamborg *et al.*, 1985); DCR medium differs in the amount of ammonium nitrate and potassium nitrate and further supplemented with the addition of calcium nitrate.

Number of sheets

The number of sheets developed in the growing Huevo de Toro was a greater degree in the M1 and M2 media, up 1.21 leaves per seedlings (sig. $p \leq 0.05$). Likewise, the M3, M4, M5 and M6 media showed no sheet formation in the explants used. Regarding the growing butter, the average Yasuda + AC, BAP, GA₃ and IAA, showed the highest values in the formation of leaves, in the evaluated times, 2.28 and 2.38 respectively (sig. $p \leq 0.05$). In the middle Yasuda continued significance + CH, BAP and AIB, with values up to 1.45 leaves per seedlings. Lower results were presented in the middle M2, 1.21 leaves per seedlings. M1, M4 and M5 media did not cause induction of leaves in this cultivar (Table 4; Figure 1). These results are low compared with those reported by Zirari and Lionakis (1994), for Topa Topa, Fuerte, Hass and Duke cultivars with values of 3.9 to 8.25 leaves per explant, using etiolated etiolated material

(sig. $p \leq 0.05$). En significancia continua el medio Yasuda + CH, BAP y AIB, con valores de hasta 1.45 hojas por brote. Se presentaron resultados menores en el medio M2, 1.21 hojas por brote. Los medios M1, M4 y M5 no provocaron la inducción de hojas en este cultivar (Cuadro 4; Figura 1). Estos resultados son bajos comparándolos con lo reportado por Zirari y Lionakis (1994), para los cultivares Topa-Topa, Fuerte, Hass y Duke con valores de 3.9 hasta 8.25 hojas por explante, utilizando material etiolado y no etiolado en medio MS de doble fase. De igual forma, de la Viña *et al.* (2001), obtuvieron valores de hasta 4.8 hojas por microestaca en el cultivar RR-86, utilizando el medio de cultivo MS con 50% de macroelementos y 1.3 μM de BAP. Dalsaso y Guevara (1988), aportaron que las microestacas del cultivar Fuerte, presentan hojas muy desarrolladas de lámina totalmente extendida, a diferencia de utilizar yemas axilares, las cuales separadas de la porción del tallo, quedan libres de las correlaciones que estas tenían con el tejido e inician un proceso morfológico diferente, modulado por la capacidad interna y el medio de cultivo.

Conclusiones

En la etapa de establecimiento, los tres medios de cultivo permitieron el desarrollo de los explantes; sin embargo, el medio Yasuda favoreció la mayor viabilidad. En la etapa de inducción de brotes, los medios M1 y M2, son los más satisfactorios para iniciar la presencia, proliferación, longitud y número de hojas para el cultivar Huevo de Toro. En comparación con el cultivar Mantequilla, el medio M3 es el que presenta los mayores valores para la formación y crecimiento de brotes y desarrollo de hojas.

Agradecimientos

El autor principal agradece al Laboratorio de Biotecnología Vegetal, Unidad Marín de la Facultad de Agronomía, Universidad Autónoma de Nuevo León por el apoyo brindado durante el periodo de la investigación, así como al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo financiero brindado durante el periodo de estudios de posgrado.

and not in MS dual phase. Similarly, Viña *et al.* (2001), values obtained until 4.8 leaves microestaca in cultivating RR-86, using the MS medium with 50% macroelements and 1.3 μM BAP. Dalsaso and Guevara (1988), provided that microcuttings cultivar Fuerte, present highly developed fully extended foil sheets, unlike using axillary buds, which separate stem portion, are free of these had correlations with tissue and initiate a different morphogenetic process, modulated by the internal capacity and the culture medium.

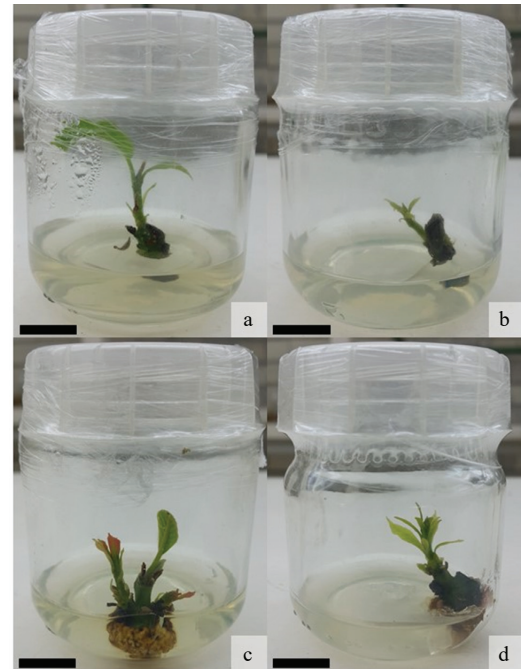


Figura 1. Respuesta de los cultivares de aguacate utilizados en los medios de inducción de brotes a 8 semanas. a-b: cultivar Huevo de Toro; c-d: cultivar Mantequilla. a: M1; b: M2; c: M2; d: M3. Barra: 1 cm.

Figure 1. Response avocado cultivars used in vehicles seedlings induction to 8 weeks. a-b: cultivating Huevo de Toro; c-d: Butter grow. a: M1; b: M2; c: M2; d: M3. Barra: 1 cm.

Conclusions

In the establishment phase, the three culture media allowed the development of the explants; however, the average viability Yasuda most favored. At the stage of seedlings induction, M1 and M2, are the most successful means to start the presence, proliferation, length and number of leaves for

Literatura citada

- Ahmed, M. F. 2002. Studies on the tissue culture and potential for the development of a genetic transformation system for avocados (*Persea americana* Mill). Ph. D. Thesis, Univ. of Sydney, Australia. 3-4 pp.
- Barceló-Muñoz, A.; López-Encina, C.; Simón-Pérez, E. and Pliego-Alfaro, F. 1999. Micropropagation of adult avocado. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 58:11-17.
- Barceló-Muñoz, A. and Pliego-Alfaro, F. 2003. Micropropagation of avocado (*Persea americana* Mill). En: Jain, S. M., K. Ishii. (Eds.). Micropropagation of Woody Trees and Fruits. 519-542.
- Barringer, S. A.; Yasseen, Y. M. and Splittstoesser, E. W. 1996. *In vitro* multiplication and plantlet establishment of avocado. *In vitro Cellular Dev. Biol. Plant*. 32(2):119-121.
- Ben-Ya'acov, A. 1987. Avocado rootstock-scion relationships. South Afric. Avocado Growers Assoc. Yrbk. 10:30-32.
- Ben-Ya'acov, A. and Michelson, E. 1995. Avocado rootstocks. *Horticultural Reviews*. John Wiley & Sons, Inc., New York. 17:381-429.
- Brokaw, W. H. 1987. Avocado clonal propagation. *Proc. Int. Plant Prop. Soc.* 37:97-103.
- Castro, M.; Oyanedel, E. and Cautin, R. 1995. *In vitro* shoot proliferation in avocado (*Persea americana* Mill) induced by CPPU. *Proceedings of the World Avocado Congress III*. 223-226 pp.
- Chanderbali, A. S.; Albert, V. A.; Ashworth, V. E.; Clegg, M. T.; Litz, R. E.; Soltis, D. E. and Soltis, P. S. 2008. *Persea americana* (avocado): bringing ancient flowers to fruit in the genomics era. *BioEssays*, 30:386-389.
- Cooper, P. A. 1987. Advantages in the micropropagation of avocado (*Persea americana* Mill). *Acta Horticulturae*. 212(2):571-575.
- Cortés-Rodríguez, M. A.; López-Gómez, R.; Martínez-Pacheco, M. M.; Suárez-Rodríguez, L. M.; Hernández-García, A. and Salgado-Garciglia, R. 2011. *In vitro* propagation of Mexican race avocado (*Persea americana* Mill var. *drymifolia*). *Acta Hort.* 923:47-52.
- Dalsaso, L. y Guevara, E. 1988. Multiplicación clonal *in vitro* del aguacate (*Persea americana*) cv. "Fuerte". *Agronomía Costarricense*. 13(1):61-71.
- De la Viña, G.; Barceló-Muñoz, A. and Pliego-Alfaro, F. 2001. Effect of culture media and irradiance level on growth and morphology of *Persea americana* Mill microcuttings. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 65:229-237.
- Dixon, A. and Fuller, K. W. 1976. Effect of syntetic auxin levels on *Phaseolus vulgaris* L. *Physiological Plant Pathology*. 11:287-292.
- Galindo-Tovar, M. E.; Ogata-Aguilar, N. and Arzate-Fernández, A. M. 2008. Some aspects of avocado (*Persea americana* Mill.) diversity and domestication in Mesoamerica. *Genet Resour Crop Evol*. 55:441-450.
- Gamborg, O. L.; Miller, R. A. and Ojima, K. 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp. Cell Res*. 50:148-151.
- Gupta, P. K. and Durzan, D. J. 1985. Shoot multiplication from mature trees of Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*) and sugar pine (*Pinus lambertiana*). *Plant Cell Reports*. 4:177-179.
- Knight, R. and Jr, J. 2002. History, distribution and uses. In: Whiley, A. W.; Schaffer, B.; Wolstenholme, B. N. (Eds.). *The avocado: botany, production and uses*. CABI, Wallingford. 1-14 pp.
- farming Huevo de Toro. In compared to cultivate butter, M3 medium is the one with the highest values for the formation and growth of buds and leaves develop.

End of the English version



- Köhne, J. S. 1992. Field evaluation of "Hass" avocado grown on Duke-7, G6 and G755C rootstocks. In: proceedings of the Second World Avocado Congress. Lovatt, C.; Holthe, P.A.; Arpaia, M. L. (Eds.). Vol. 1 University of California, Riverside, California. 301-303 pp.
- Kumar, P. P. and Loh, C. S. 2012. Plant tissue culture for biotechnology. In: Altman, A. and Hasegawa P. M. (Eds.). *Plant biotechnology and agriculture. Prospects for the 21st Century*. Elsevier. 131-138 pp.
- Litz, R. E.; Raharjo, S. H. T. and Gómez-Lim, M. A. 2007. Avocado. In: Pua, E. C. and Davey, M. R. (Eds.). *Transgenic crops V. Biotechnology in agriculture and forestry*. Springer, Berlin. 167-187 pp.
- Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*. 15:473-497.
- Nhut, D. T.; Thi, N. N.; Khiet, B. L. T. and Luan, V. Q. 2008. Peptone stimulates *in vitro* shoot and root regeneration of avocado (*Persea americana* Mill). *Scientia Horticulturae*. 115:124-128.
- Pliego-Alfaro, F. and Bergh, B. O. 1992. Avocado. In: Hammerschlag, F. A. and Litz, R. E. (Eds.). *Biotechnology of perennial fruit crops*. CAB International, Wallingford. 323-333 pp.
- Premkumar, A.; Pliego-Alfaro, F.; Quesada, M. A.; Mercado, J. F. and Barceló-Muñoz, M. A. 2003. Influence of sucrose concentrations on *in vitro* rooting, growth, endogenous sugars and *ex vitro* survival of juvenile avocado. *J. Hort. Sci. Biotechnol*. 78(1):46-50.
- Raharjo, S. T.; Witjaksono, Y.; Gómez-Lim, M.; Padilla, G. and Litz, R. 2008. Recovery of avocado (*Persea americana* Mill) plants transformed with the antifungal plant defensin gene PDF1.2. *In vitro Cell. Dev. Biol. Plant*. 44:254-262.
- Rodríguez, N. N.; Capote, M. and Zamora, V. 1999. Cultivo *in vitro* del aguacatero (*Persea americana* Mill). *Revista Chapingo Serie Horticultura*. 5:231-237.
- Sandoval-Prando, M. A.; Chiavazza, P.; Faggio, A. and Contessa, C. 2014. Effect of coconut water and growth regulator supplements on *in vitro* propagation of *Corylus avellana* L. *Scientia Horticulturae*, 171:91-94.
- Vidales-Fernández, I. 2002. Efecto de los reguladores de crecimiento en los procesos de organogénesis y embriogénesis somática de aguacate (*Persea americana* Mill.). Tesis. Universidad de Colima, Tecomán, Colima, México. 62-119.
- Vidales-Fernández, I.; Larios-Guzmán, A. L.; Tapia-Vargas, M.; Guillén-Andrade, H. and Villaseñor-Ramírez, F. 2011. Criopreservación d germoplasma de aguacate. *Proceedings of the VII World Avocado Congress*. Cairns, Australia. 673-679.
- Yasuda, T.; Fujii, Y. and Yamaguchi, T. 1985. Embryogenic callus induction from *Coffea arabica* leaf explants by benzyladenine. *Plant Cell Physiol*. 26(3):595-597.
- Zirari, A. and Lionakis, S. M. 1994. Effect of cultivar, explant type, etiolation pretreatment and the age of plant material on the *in vitro* regeneration ability of avocado (*Persea americana*). *Acta Hort.* 365:69-76.
- Zulfiqar, B.; Abbasi, N. A.; Ahmad, T. and Hafiz, I. A. 2009. Effect of explant sources and different concentrations of plant growth regulators on *in vitro* shoot proliferation and rooting of avocado (*Persea americana* Mill.) cv. "Fuerte". *Pak. J. Bot.* 41(5):2333-2346.