



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO

DEPARTAMENTO DE ENSEÑANZA, INVESTIGACIÓN Y
SERVICIO EN FITOTECNIA

INSTITUTO DE HORTICULTURA

PROPAGACIÓN DE PORTAINJERTOS COMERCIALES Y
POTENCIALES DE AGUACATERO MEDIANTE MICROCLONACIÓN

TESIS

Que como requisito parcial
para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS EN HORTICULTURA



Presenta:

MERCEDES MARTÍNEZ VILLAGÓMEZ

DIRECCION GENERAL ACADEMICA
DEPTO. DE SERVICIOS ESCOLARES
OFICINA DE EXAMENES PROFESIONALES

Bajo la supervisión de: **ALEJANDRO F. BARRIENTOS PRIEGO, Dr.**



Chapingo, Estado de México, 01 de junio de 2017.

PROPAGACIÓN DE PORTAINJERTOS COMERCIALES Y POTENCIALES DE AGUACATERO MEDIANTE MICROCLONACIÓN

Tesis realizada por Mercedes Martínez Villagómez, bajo la supervisión del Comité Asesor indicado, aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS EN HORTICULTURA

DIRECTOR:



Dr. Alejandro F. Barrientos Priego

ASESOR:



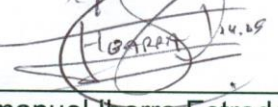
Dr. Eduardo Campos Rojas

ASESOR:



Dr. Raúl Nieto Ángel

ASESOR:



Dr. Emmanuel Ibarra Estrada

CONTENIDO

LISTA DE CUADROS.....	iv
LISTA DE FIGURAS.....	v
DEDICATORIAS.....	vii
AGRADECIMIENTOS	viii
DATOS BIOGRÁFICOS	ix
RESUMEN GENERAL	x
GENERAL ABSTRACT	xi
INTRODUCCIÓN GENERAL.....	1
1. REVISIÓN DE LITERATURA	4
1.1. Formación de raíces adventicias	4
1.2. Fases del enraizamiento adventicio	4
1.3. Patrón de formación de raíces adventicias.....	6
1.4. Competencia y determinación de los tejidos	6
1.5. Juvenilidad y maduración	7
1.6. Reguladores del crecimiento y la formación de raíces adventicias	10
1.7. Cofactores del enraizamiento.....	16
1.8. Carbohidratos	17
1.9. Nitrógeno.....	18
1.10. Luz.....	19
1.11. Temperatura.....	19
1.12. Propagación clonal de portainjertos de aguacatero.....	20
1.13. Literatura citada.....	20
2. LA CONFIGURACIÓN ANATÓMICA DEL TALLO ETIOLADO NO INTERFIERE EN EL ENRAIZAMIENTO ADVENTICIO DE PORTAINJERTOS DE AGUACATERO	34
2.1. Resumen	34
2.2. Abstract	35
2.3. Introducción.....	36
2.4. Materiales y métodos	38

2.5. Resultados y discusión.....	39
2.6. Conclusiones.....	51
2.7. Literatura citada.....	52
3. EL ENRAIZAMIENTO DE BROTES ETIOLADOS DE PORTAINJERTOS DE AGUACATERO NO SE RELACIONA CON LA PRESENCIA DE FIBRAS PERIVASCULARES.....	55
Resumen.....	55
Abstract.....	56
Introducción	57
Materiales y métodos	58
1.14. Resultados y discusión.....	62
1.15. Conclusiones.....	72
1.16. Literatura citada.....	72

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Porcentaje de enraizamiento a partir de tejidos fisiológicamente maduros en diferentes especies vegetales.....	8
Cuadro 2. Especies vegetales propagadas exitosamente mediante la aplicación de ácido indolbutírico (IBA).....	11
Cuadro 3. Efecto del etileno en el enraizamiento adventicio de diferentes especies vegetales	15
Cuadro 4. Medidas anatómicas de los tallos de cinco portainjertos de Persea americana Mill. en respuesta a la presencia y ausencia de luz.	63
Cuadro 5. Medidas anatómicas de los tallos etiolados de cinco portainjertos de aguacatero injertados sobre plantas nodrizas provenientes de dos tamaños de semilla antes de la aplicación de sal potásica de ácido indolbutírico (KIBA). ...	64
Cuadro 6. Medidas anatómicas de los tallos etiolados de cinco portainjertos de aguacatero injertados sobre plantas nodrizas provenientes de dos tamaños de semilla 30 días después de la aplicación de sal potásica de ácido indolbutírico (KIBA).	66
Cuadro 7. Medidas anatómicas de los tallos etiolados de cinco portainjertos de aguacatero injertados sobre plantas nodrizas provenientes de dos tamaños de semilla 60 días después de la aplicación de sal potásica de ácido indolbutírico (KIBA).	67
Cuadro 8. Coeficientes de correlación de las variables evaluadas en el enraizamiento de brotes etiolados de aguacatero.	71

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Anatomía de la formación de raíces adventicias (a-f) en tallos de petunia (<i>Petunia hybrida</i>) (Tomado de Ahkami <i>et al.</i> , 2009).....	5
Figura 2. Diferentes posiciones de la misma sección transversal de un tallo etiolado de <i>Persea americana</i> Mill. antes del tratamiento con sal potásica de ácido indolbutírico (KIBA).	40
Figura 3. Primeras divisiones celulares durante la formación de raíces adventicias en tallos etiolados de portainjertos de aguacatero tratados con sal potásica de ácido indolbutírico (KIBA).	41
Figura 4. Formación y alargamiento del primordio de raíz adventicia en tallos etiolados de aguacatero.....	42
Figura 5. Desarrollo de la conexión vascular en primordios y raíces adventicias de portainjertos clonales de aguacatero..	43
Figura 6. Secciones transversales de brotes etiolados de cinco portainjertos de aguacatero que muestran el inicio de la formación de primordios de raíz 30 días después de la aplicación de 7000 mg·L ⁻¹ de sal potásica de ácido indolbutírico (KIBA), la formación de raíces adventicias y la anatomía de los brotes tratados con 7000 mg·L ⁻¹ y 0 mg·L ⁻¹ de KIBA a los 60 días después de la aplicación del tratamiento.....	45
Figura 7. Desarrollo de primordios de raíz de aguacatero ante la presencia de fibras del floema.....	46
Figura 8. Sección transversal de tallo etiolado de aguacatero que muestra el daño provocado por el lesionado realizado para aplicar el tratamiento con sal potásica de ácido indolbutírico (KIBA).....	47
Figura 9. Sitios de formación de las raíces adventicias en portainjertos de aguacatero respecto a la localización de la herida realizada para la aplicación de sal potásica de ácido indolbutírico (KIBA).....	48

Figura 10. Apariencia macroscópica de la base de los brotes etiolados de cinco portainjertos de aguacatero tratados con 0, 5000 y 7000 mg·L ⁻¹ de sal potásica de ácido indolbutírico (KIBA) a los 60 días después de la aplicación del tratamiento.....	49
Figura 11. Formación de callo en tallos etiolados y lesionados del portainjerto 'Velvick'.....	51
Figura 12. Porcentaje de supervivencia de cinco genotipos de aguacatero injertados en plantas nodrizas de diferente tamaño durante el proceso de etiolación.....	62
Figura 13. Desarrollo de los tejidos del tallo en brotes de aguacatero.....	68
Figura 14. Efecto de la aplicación de sal potásica de ácido indolbutírico (KIBA) en la relación de las proporciones xilema/floema, xilema/fibras del floema + floema, xilema/fibras y floema fibras durante el enraizamiento adventicio de cinco portainjertos de aguacatero..	69
Figura 15. Efecto de la aplicación de sal potásica de ácido indolbutírico (KIBA) en la propagación vegetativa de cinco portainjertos de aguacatero.	70

DEDICATORIAS

A mis padres Antonia Villagómez Martínez y Alejandro Martínez Reyes, por su apoyo en todo momento, por sus consejos y su confianza, pero sobre todo por ser un ejemplo de perseverancia.

A mis hermanos Daniel, María Guadalupe, Claudia y Alejandro, por apoyarme siempre.

A mi sobrina Sofía que a su corta edad se ha convertido en un motivo de unión y la mayor motivación de nuestra familia.

A Claudia Reyes Quiroz por acompañarme y apoyarme en todo momento desde hace seis años, por su entrega, motivación y cariño, principalmente por compartir conmigo momentos inolvidables al lado de Cuqui y Blaqui.

A mis amigos de la Universidad Autónoma Chapingo: Itzel Sánchez García, Roman García Gutiérrez, Monserrat Tuxtla Andrade, Rubicelia Corro Contreras, Abigail Ortiz Mendoza, Xareni Vázquez Flores, Arnulfo Leal Santiago y David Luna Nieto.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo económico otorgado para el desarrollo de mis estudios de posgrado.

A la Universidad Autónoma Chapingo y al Instituto de Horticultura del Departamento de Enseñanza, Investigación y Servicio en Fitotecnia por brindarme la oportunidad de continuar con mi formación profesional.

Al Dr. Alejandro F. Barrientos Priego por sus valiosas enseñanzas, sus acertados consejos y principalmente por el apoyo incondicional y confianza brindada durante el proceso de investigación.

A mis asesores Dr. Eduardo Campos Rojas, Dr. Raúl Nieto Ángel y Dr. Emmanuel Ibarra Estrada por sus observaciones, sus recomendaciones y apoyo académico en la conducción y desarrollo del trabajo de investigación, así como en la redacción del presente documento.

A la Fundación Salvador Sánchez Colín-CICTAMEX, S.C. por el material vegetal proporcionado, sin el cual la realización del presente trabajo de investigación no habría sido posible.

Al Sr. Eusebio Moreno Silva por su ayuda incondicional durante el proceso de experimentación.

DATOS BIOGRÁFICOS



Datos personales

Nombre: Mercedes Martínez Villagómez.
Fecha de nacimiento: 24 de septiembre de 1990.
Lugar de nacimiento: Acambay, Estado de México.
CURP: MAVM900924MMCRLR01.
Profesión: Ingeniero Agrónomo Especialista en Fitotecnia.
Cédula profesional: 09583159.

Desarrollo académico

Bachillerato General.
Preparatoria Oficial No. 109, Acambay, Estado de México.
Ingeniero Agrónomo Especialista en Fitotecnia.
Licenciatura: 2009-20013 Departamento de Enseñanza, Investigación y Servicio, Universidad Autónoma Chapingo.
Maestro en Ciencias en Horticultura.
Maestría: 2015-2016 Instituto de Horticultura, Departamento de Enseñanza, Investigación y Servicio, Universidad Autónoma Chapingo.

RESUMEN GENERAL

Propagación de portainjertos comerciales y potenciales de aguacatero mediante microclonación

Se probó la aplicación de concentraciones de 0, 5000 y 7000 mg·L⁻¹ de sal potásica de ácido indolbutírico (KIBA) como estímulo inductor de la formación de raíces adventicias en brotes etiolados de cinco portainjertos de aguacatero, los cuales se acodaron empleando polvillo de fibra de coco y un contenedor de 55 mL de capacidad. El inicio de las divisiones celulares que condujeron a la formación de raíces adventicias se originó en el cambium vascular. A partir de esas divisiones celulares se formaron meristemoides que dieron origen a los primordios de raíz. Los primordios se desarrollaron después de 30 días de la aplicación de KIBA y la conexión vascular de los mismos con el tallo se desarrolló completamente antes de emerger del tallo. La aplicación de 5000 y 7000 mg·L⁻¹ KIBA fue necesaria para estimular la formación de raíces en 'Duke 7', '51 Phy', 'Day' y 'ComCarr'. En 'Velvick', el lesionado y la aplicación de auxinas desencadenaron la formación de callo y no se observó la formación de primordios de raíz después de 60 días de la aplicación de KIBA. La presencia de un anillo discontinuo de fibras de floema no impidió la emergencia de los primordios de raíz. Las semillas nodrizas con un peso fresco superior a 30 g presentaron el nivel de supervivencia más alto (97.77 %) durante el proceso de etiolación, e indujeron un mayor desarrollo de xilema y fibras del floema en el injerto, sin embargo, la presencia de estas no se relacionó con la formación de raíces.

Palabras clave: *Persea americana* Mill., tamaño de semilla nodriza, auxina, anatomía.

GENERAL ABSTRACT

Propagation of commercial and potential avocado rootstocks using microcloning technique

The application of 0, 5000 and 7000 mg·L⁻¹ concentrations of potassium salt of indole-butyric acid (KIBA) was tested as an inductive stimulus for the formation of adventitious roots in etiolated shoots of five avocado rootstocks, which were layered using coconut fiber dust and a 55 mL capacity container. The beginning of the cell divisions that led to the formation of adventitious roots was originated in the vascular cambium; meristemoids were formed from these cell divisions and gave origin to root primordia. The primordia were developed 30 days after KIBA application and the vascular connection with the stem was developed completely before emerging from the stem. The KIBA application of 5000 and 7000 mg·L⁻¹ was required to stimulate root formation in 'Duke 7', '51 Phy', 'Day' and 'ComCarr'. In 'Velvick', wound and auxin application triggered the callus formation and formation of roots primordia were not observed 60 days after KIBA application. The presence of a discontinuous phloem fiber ring did not prevent the emergence of root primordia. Small nursery seeds with a fresh weight greater than 30 g showed the highest survival level (97.77 %) during the etiolation process, and induced a greater development of xylem and phloem fibers; however, their presence was not related to root formation.

Keywords: *Persea americana* Mill., nurse seed size, auxin, anatomy.

INTRODUCCIÓN GENERAL

El cultivo del aguacate (*Persea americana* Mill.) ocupaba en el año 2015 una superficie de 205,250.42 hectáreas, y generó una producción nacional de 1'889,353.51 toneladas (SIAP, 2016). México destaca como principal productor mundial (FAOSTAT, 2016).

Las plantaciones comerciales que se tienen en México se establecen con plantas injertadas en enchapado lateral, sobre portainjertos criollos de la raza mexicana (Gallegos-Espinoza, 1983), sin que se tenga un estricto control sobre la fuente de la semilla usada. Históricamente, los factores limitantes para una exitosa producción de aguacates han sido la calidad del agua, las condiciones edáficas y climáticas, y la presencia de patógenos en los suelos. Muchos de estos factores se pueden manejar mediante el uso de portainjertos clonales (Fernández, Van Rooyen & Köhne, 2011).

Desde que se desarrolló la técnica de clonación por Frolich & Platt en 1971-72, subsecuentemente modificada y mejorada para producción comercial por Brokaw Nursery en 1977 y posteriormente por otros viveros (Newett, Crane & Balerdi., 2007), el mejoramiento de los portainjertos de aguacatero se ha hecho más importante, ya que permite transferir una característica benéfica de una planta a otra.

Determinadas selecciones de aguacateros reducen el efecto de detrimento de la pudrición de raíces, mejoran la uniformidad del huerto y su productividad y por esa vía, la rentabilidad general del cultivo. Los portainjertos clonales logran incrementar los rendimientos bajo condiciones específicas (Fernández *et al.*, 2011). Sin embargo, existe una respuesta diferencial de los distintos genotipos de aguacatero en cuanto a la facilidad de emitir raíces adventicias (Muñoz-Pérez & Rogel-Castellanos, 1998).

Actualmente diferentes portainjertos clonales de aguacatero están siendo empleados comercialmente o ensayados en diferentes países del mundo, excepto en México. Debido a que cada región de cultivo presenta sus propias características y factores limitantes es necesario evaluar en diferentes áreas y bajo distintas condiciones tanto los portainjertos comerciales existentes como nuevas selecciones sujetas a emplearse como portainjertos (Fernández *et al.*, 2011).

En general, los portainjertos de la raza mexicana enraízan con mayor facilidad, los de la raza guatemalteca se encuentran en un nivel intermedio y los de la raza antillana difícilmente enraízan (Kadman & Ben-Ya'acov, 1965; Platt, 1976). Dentro de cada raza, algunos clones no se ajustan a las características de enraizamiento de dicha raza, de tal modo que es necesaria la evaluación de la capacidad enraizamiento y la influencia de las características anatómicas del tallo de diferentes materiales empleados comercialmente y con potencial para ser utilizados como portainjertos clonales, con la finalidad de obtener información que permita mejorar las técnicas de propagación vegetativa de los mismos.

El presente documento contiene tres partes principales para abordar el tema; en la primera se presenta una revisión de literatura que apoya el entendimiento de los sucesos histológicos que ocurren durante el enraizamiento adventicio, mediante una descripción general de los eventos observados en investigaciones previas, así como las técnicas que se han empleado para favorecer la propagación vegetativa en especies de difícil enraizamiento y los principales factores endógenos y exógenos que afectan la formación de raíces; en la segunda parte se presenta un estudio que tuvo como objetivos determinar el efecto de la aplicación de sal potásica de ácido indolbutírico (KIBA) en los sucesos histológicos que condujeron a la formación de raíces en cinco portainjertos de aguacatero; identificar el sitio o sitios de iniciación primordial de

las raíces, registrar el progreso de la formación de raíces y establecer si el anillo de esclerénquima formado por las fibras del floema puede interpretarse como una barrera para la iniciación y aparición de raíces adventicias; en la tercera parte se presentan los cambios anatómicos inducidos por la etiolación; el efecto del tamaño de la semilla nodriza en la supervivencia de los brotes durante los procesos de etiolación y formación de raíces adventicias; así como los aspectos anatómicos modificados por la aplicación de sal potásica de ácido indolbutírico y el tamaño de semilla nodriza.

1. REVISIÓN DE LITERATURA

1.1. Formación de raíces adventicias

El enraizamiento adventicio es un proceso de organogénesis en el cual se desarrollan nuevos tejidos radicales en lugares distintos al sistema radicular primario (Altamura, 1996); es un proceso complejo que implica fases sucesivas de desarrollo que requieren de diferentes señales hormonales y otros factores (De Klerk, Van der Krieken & De Jong, 1999). La capacidad de enraizamiento varía con el genotipo y generalmente es menor en especies leñosas que en herbáceas (Pijut, Woeste & Michler, 2011).

1.2. Fases del enraizamiento adventicio

Las fases sucesivas del enraizamiento adventicio se dividen en: fase de desdiferenciación o iniciación, fase de inducción o de formación del primordio de raíz, fase de crecimiento dentro del tallo o alargamiento y fase de crecimiento fuera del tallo o de emergencia de la raíz (De Klerk *et al.*, 1999; Ahkami *et al.*, 2009)

De acuerdo a De Klerk *et al.* (1999), durante el enraizamiento de brotes de manzano, en la fase de desdiferenciación, la activación de las células ocurrió por la acumulación de granos de almidón, la acción de compuestos relacionados con la herida de corte y las auxinas. En la fase de inducción se inició la división celular, aquí las auxinas estimularon la formación de meristemoides de raíz. En la fase de crecimiento dentro del tallo, los meristemoides se convirtieron en primordios de raíz con la típica forma de cúpula, en esta etapa las auxinas (aplicadas exógenamente) mostraron un efecto inhibitorio en la formación de los primordios. Finalmente, durante la fase de crecimiento fuera del tallo los primordios de raíz emergen del tallo (De Klerk *et al.*, 1999).

En el caso del enraizamiento adventicio de estacas de petunia (*Petunia hybrida*) en la fase de iniciación de raíz (Figura 1c) aparecieron células pequeñas con núcleos grandes y citoplasmas densos, los granos de almidón se degradaron al iniciar las primeras divisiones celulares que originaron los meristemoides. La aparición de estos meristemoides marcó la transición de la fase de iniciación de la raíz a la fase de formación del primordio de la raíz (Figura 1d). Durante la fase de formación del primordio de la raíz, los primeros meristemas de raíz bien desarrollados se hicieron visibles (Figura 1e). Las estructuras globulares desarrollaron primordios de raíz con la típica forma de cúpula que posteriormente formaron raíces con células alargadas dentro del tallo, estas raíces presentaron la morfología de una raíz completa (Figura 1f; Ahkami *et al.*, 2009).

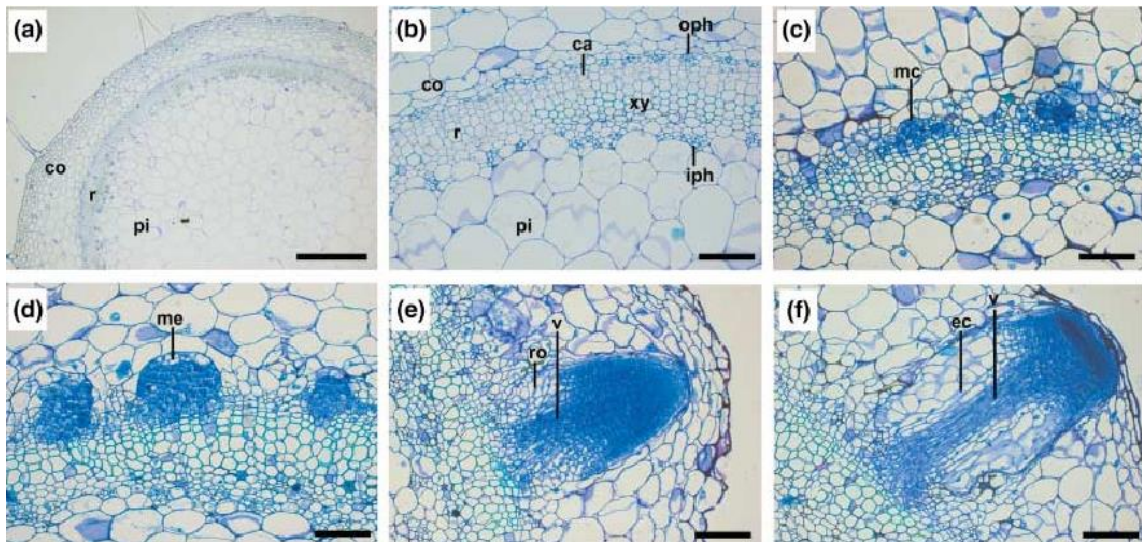


Figura 1. Anatomía de la formación de raíces adventicias (a-f) en tallos de petunia (*Petunia hybrida*). (a, b) 0 horas después del corte, la anatomía típica del tallo consistió en el córtex (co), el parénquima de la médula (pi) y un anillo de vasos (r) con floema externo (oph), xilema (xy) y floema interior (iph); (c) primeras células meristemáticas (mc) de los meristemas de raíz en desarrollo; (d) primeros meristemas de raíz (me); (e) primordios de las raíces con un meristemo organizado y una diferenciación hacia atrás de las células del cuerpo radical que contienen el cortex radical (ro) y el haz vascular (v); (f) raíz con haces vasculares (v) en el centro rodeada por células alargadas (ec) de la zona de alargamiento. Barras, (a), 500 μ m; (b-f), 100 μ m (Tomado de Ahkami *et al.*, 2009).

1.3. Patrón de formación de raíces adventicias

En plantas herbáceas y leñosas existen dos patrones de formación de raíces adventicias: indirecto y directo, el patrón indirecto se da cuando los primordios radicales se desarrollan a partir de un callo previamente formado, mientras que en el patrón directo el primordio de raíz se desarrolla a partir de células próximas al sistema vascular; ambos procesos rizogénicos pueden activarse en el mismo tejido (Altamura, 1996) y la conexión vascular del primordio con los tejidos vasculares originales no ocurre hasta que el ápice de la raíz en desarrollo se ha formado completamente y la raíz está emergiendo del tallo, en el momento en que la raíz emerge por completo debe ser funcional (Lovell & White, 1986).

1.4. Competencia y determinación de los tejidos

La competencia para la formación de raíces se define como la capacidad de células específicas en un tejido para responder a estímulos inductores de raíces específicos. La determinación ocurre cuando algunas de las células competentes se canalizan irreversiblemente hacia el desarrollo de una raíz completa y se alcanza por completo cuando las células continúan con la formación de raíces, aunque el estímulo inductor sea retirado (Mohnen, 1994).

En presencia de un factor inductor de raíz se produce un proceso de desdiferenciación en las células competentes, seguido de una fase proliferativa. Cuando el factor inductor es una auxina, las altas concentraciones actúan como estimulante hasta que aparecen los meristemoides, después la hormona tiene un efecto inhibitorio. Cuando la duración del período inductivo no es suficiente para que ocurra la determinación, no se produce el enraizamiento, lo que demuestra que la determinación puede requerir mucho tiempo para completarse y que el tiempo requerido depende del inductor (tipo y concentración de auxina utilizada), de la composición celular, de la edad del tejido y del genotipo (Altamura, 1996).

1.5. Juvenilidad y maduración

La juvenilidad es un factor importante en la propagación de plantas. Durante el período juvenil, el crecimiento es muy activo, la floración no ocurre, ni es posible inducirla, aun cuando se suministren las condiciones ambientales o los tratamientos posibles para que ocurra (Caso, 1992). La duración de la fase juvenil en plantas leñosas es variable y puede ser bastante largo. Diferentes cambios progresivos ocurren durante el periodo juvenil e involucran diferencias morfológicas, anatómicas, fisiológicas y de desarrollo que incluyen la forma de las hojas, el grosor y características de la epidermis, la filotaxia, la orientación y vigor de los brotes, la lignificación, la pigmentación de las antocianinas, características fotosintéticas, resistencia a plagas y enfermedades y la capacidad para formar yemas y raíces (Basheer-Salimia, 2007).

Muchas especies vegetales pierden su capacidad de formar raíces adventicias a medida que sus tejidos pasan de la juvenilidad a la madurez (Davies & Hartman, 1988). La disminución del potencial de enraizamiento debido al envejecimiento o madurez de las plantas ha sido reportado en varias especies (Cuadro 1), dicha pérdida en la capacidad de enraizamiento puede deberse al efecto individual o combinado de factores como la disminución de la sensibilidad de los tejidos envejecidos a los promotores de enraizamiento, la acumulación de sustancias inhibitoras del enraizamiento y la disminución del contenido de auxinas endógenas (Raviv, Reuveni & Goldschmidt, 1987; Husen & Pal, 2006; Husen & Pal, 2007). Todas estas variaciones son el resultado de la expresión genética (síntesis de proteínas, transcripción, genes) en la que se encuentra la base del fenómeno de maduración (Haffner *et al.*, 1991).

Cuadro 1. Porcentaje de enraizamiento a partir de tejidos fisiológicamente maduros en diferentes especies vegetales.

Especie	Enraizamiento (%)	Fuente
<i>Ficus pumila</i> L.	75.00	Davies & Joiner (1980)
<i>Persea americana</i> Mill.	30.00	Raviv <i>et al.</i> (1987)
<i>Persea americana</i> Mill.	30.00	Pliego-Alfaro <i>et al.</i> (1999)
<i>Castanea sativa</i> Mill.	10.00	Ballester <i>et al.</i> (1999)
<i>Prunus serotina</i>	50.00	Pijut & Espinosa (2004)
<i>Tectona grandis</i> Linn. f.	35.56	Husen & Pal (2006)
<i>Quercus bicolor</i> Willd.	46.00	Amissah & Bassuk (2009)
<i>Quercus macrocarpa</i> Michx.	7.00	Amissah & Bassuk (2009)
<i>Dalbergia melanoxylon</i> Guill. & Perr.	24.42	Amri <i>et al.</i> (2010)

En especies de difícil enraizamiento se ha logrado inducir el rejuvenecimiento de plantas maduras mediante la aplicación individual o combinada de diferentes métodos (Hartmann *et al.*, 2011):

Forzar brotes epicórmicos de ramas de 2 a 10 cm de ancho x 24 cm de largo para producir estacas de madera blanda (Hartman *et al.*, 2011) que pueden enraizarse directamente (Van Sambeek, Preece & Coggeshall, 2002; Fishel, Zaczek & Preece, 2003) o mediante técnicas de micropropagación (Pereira, 2009; Arbeloa *et al.*, 2012; Read & Bavougian, 2013).

La inducción de brotes nuevos y vigorosos de la base del tallo o de las raíces se puede conseguir mediante la poda cercana a la base del árbol donde los tejidos se consideran más antiguos cronológicamente, pero más jóvenes en términos de edad ontogénica (Hartman *et al.*, 2011). Las características juveniles se pueden mantener en el centro y la base del árbol aplicando podas selectivas de ramas y brotes apicales (Wendling, Trueman & Xavier, 2014).

El enraizamiento serial de estacas que implica la propagación repetida de estacas tomadas de otras recientemente enraizadas, se utiliza para restaurar o mantener los rasgos juveniles y es el método más común de rejuvenecimiento utilizado por los viveros (Wendling *et al.*, 2014).

A partir de plantas obtenidas mediante micropropagación se pueden obtener estacas de fácil enraizamiento; las plantas propagadas mediante este método exhiben ciertas características juveniles y producen microestacas de fácil enraizamiento (Hartman *et al.*, 2011). Varias especies como manzano (Harage, Stimart & Everta., 1993), castaño (Ballester *et al.*, 1999), aguacatero (Barceló-Muñoz *et al.*, 1999), encino (Amissah & Bassuk, 2009), cedro (Millán-Orozco, Corredoira & del Carmen, 2011) y aliso (San José, Romero & Janeiro, 2012) se han propagado exitosamente mediante esta técnica y numerosos protocolos de micropropagación se han desarrollado para especies hortícolas de importancia económica (Lambardi, Ozudogru & Jain, 2012).

La manipulación de una planta madre a través de la exposición a la oscuridad para promover la etiolación y detención o reversión del envejecimiento ontogenético es una técnica fiable para mejorar la eficacia del enraizamiento (Davies & Hartmann, 1988; Hartmann *et al.*, 2011; Steffens & Rasmussen, 2016), mostrando un efecto positivo en la formación de raíces adventicias (Rogel-Castellanos *et al.*, 2000; Husen, 2011). La etiolación aumenta la concentración interna de auxinas, disminuye la lignificación de los tejidos, aumenta la acumulación de almidón (Bassuk *et al.*, 1985) y azúcares solubles totales en la región etiolada (Husen, 2008a), disminuye el contenido de cofactores negativos del enraizamiento, especialmente de IAA-oxidasa, aumenta considerablemente la sensibilidad del tallo a las auxinas, asimismo, induce cambios anatómicos en los tejidos del tallo que podrían incrementar la iniciación de primordios de raíces, principalmente a partir las células parenquimáticas indiferenciadas (Bassuk *et al.*, 1985; Maynard & Bassuk, 1996).

El injerto en serie de yemas maduras en portainjertos juveniles puede utilizarse como una herramienta de renovación y rejuvenecimiento para aumentar el

potencial de enraizamiento (Pijut *et al.*, 2011) y retrasar la floración (Wendling *et al.*, 2014). La combinación de esta técnica con la etiolación ha permitido rejuvenecer y propagar arboles de 95 años de edad (Husen & Pal, 2003).

1.6. Reguladores del crecimiento y la formación de raíces adventicias

1.6.1. Auxinas

Las auxinas son un grupo de reguladores del crecimiento de las plantas que incluyen sustancias químicas naturales y sintéticas (Bellini, Pacurar, & Perrone, 2014) que, aplicadas son las únicas que mejoran consistentemente el desarrollo de primordios de raíz, al menos en tejidos fáciles de enraizar (Haissig, 1974a). Sin embargo, la inducción de primordios de raíz además del estímulo de las auxinas requiere aparentemente la presencia de compuestos sinergistas llamados cofactores del enraizamiento (Lischweski *et al.*, 2015).

La principal auxina endógena es el ácido indol-3-acético (IAA), pero hay otros ácidos [ácido indol-3-butírico (IBA), ácido 4-cloroindol-3-acético (4-Cl-IAA), ácido fenilacético (PAA)] y compuestos sintéticos [ácido 1-naftalenoacético (NAA), ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), ácido 3,6-dicloro-2-metoxibenzoico (dicamba) y 4-amino-5,6-tricloropicolínico (picloram)] con actividad auxínica (Porfírio *et al.*, 2016). El IAA y el IBA son las auxinas más estudiadas (Bellini *et al.*, 2014) y aunque el IAA es la auxina natural más abundante y fue la primera utilizada para estimular el desarrollo de raíces adventicias en estacas de tallo (Cooper, 1935), no se utiliza rutinariamente en programas de propagación vegetativa, donde se prefiere el IBA, que es un promotor eficaz del enraizamiento adventicio en varias especies (Cuadro 2) y probablemente actúa después de su conversión a IAA, que se ha demostrado ocurre en algunas especies (Schlicht *et al.*, 2013; Strader & Bartel, 2011). Sin embargo, el IBA no se degrada o se convierte a IAA durante su transporte a larga distancia, lo que sugiere que los sistemas de transporte de ambas sustancias son independientes y pueden proporcionar un mecanismo para mover específicamente el precursor inactivo a

un sitio de acción, evitando respuestas de la auxina durante su transporte (Strader & Bartel, 2011).

Cuadro 2. Especies vegetales propagadas exitosamente mediante la aplicación de ácido indolbutírico (IBA).

Especie	Concentración de IBA (mg·L ⁻¹)	Enraizamiento (%)	Fuente
<i>Tectona grandis</i> Linn. f.	4000	67.00	Husen & Pal (2007)
<i>Vitis vinifera</i>	4000	No reportado	Galavi <i>et al.</i> (2009)
<i>Jatropha curcas</i> L.	10000	74.00	Noor Camellia <i>et al.</i> (2009)
<i>Punica granatum</i> L.	9000	81.76	Owais (2010)
<i>Olea europea</i> L.	4000	67.50	Lazaj <i>et al.</i> (2015)
<i>Prunus serrulata</i>	2700	80.00	Fragoso <i>et al.</i> (2016)
<i>Psidium guajava</i> L.	4000	No reportado	Kareem <i>et al.</i> (2016)

El IBA es especialmente preferible en la propagación en condiciones *in vivo*, en las que la auxina se absorbe durante un breve período inicial. El IAA se oxida rápidamente en el tejido vegetal, mientras que los conjugados de IBA (especialmente el ácido indol-3-acetilaspártico) sirven como fuente de auxina durante las últimas etapas del enraizamiento (Nordström, Jacobs & Eliasson, 1999; Epstein & Ludwig-Müller, 1993). Algunos estudios sugieren que el IBA actúa como una auxina por sí sola y no a través de su conversión a IAA (Ludwig-Müller, 2000) y que la influencia de ambos en el enraizamiento es independiente (Štefančič *et al.*, 2007). Sin embargo, estudios con mutantes de *Arabidopsis* indicaron que el IBA actúa principalmente a través de su conversión a IAA, en un proceso de múltiples etapas similar a la β -oxidación de los ácidos grasos en el peroxisoma (Zolman, Yoder & Bartel, 2000; Schlicht *et al.*, 2013).

El tratamiento con auxinas para promover el enraizamiento adventicio suele limitarse a una corta duración, de unas pocas horas a unos pocos días y la aparición de las raíces puede no ocurrir durante semanas o meses después de la aplicación (Srivastava, 2002). La efectividad de las aplicaciones exógenas de las auxinas para promover el enraizamiento depende de la absorción adecuada por el tejido vegetal que puede verse influida por la concentración de auxina y la duración del tratamiento (Howard, 1986). La profundidad del tratamiento también puede afectar la absorción y la posterior respuesta de enraizamiento, a mayor profundidad una cantidad mayor de solución adicional puede correr por la epidermis y ser absorbida través de la superficie de corte (Kenney, Sudi & Blackman, 1969; Blythe *et al.*, 2007). La translocación de las auxinas puede ocurrir mediante transporte polar basípeto, transporte pasivo a través del floema y transporte acrópeto en el xilema (con aplicación exógena) (Blythe *et al.*, 2007).

Las auxinas como promotores del enraizamiento pueden estimular las primeras divisiones celulares del primordio de la raíz sin afectar la iniciación de la misma (Hassigs, 1970). También pueden influir en la utilización de los carbohidratos, se ha demostrado que la aplicación de auxinas activa el metabolismo de los carbohidratos para liberar energía (Husen, 2008b; Agulló-Antón *et al.*, 2011; Husen, 2012; Steffens & Rasmussen, 2016) y proporcionar esqueletos de carbono para la síntesis de otros compuestos esenciales como proteínas (Haissig, 1974a). La respuesta al estímulo de las auxinas está regulada por las proteínas AUX/IAA y ARF (Auxin Response Factor) (Overvoorde *et al.*, 2005).

1.6.2. Citocininas

Las citocininas (CK) son compuestos orgánicos derivados del metabolismo secundario y están consideradas como promotoras del crecimiento de las plantas, implicadas en la determinación de las células embrionarias, el mantenimiento de las células meristemáticas, la formación de brotes y el desarrollo del sistema vascular (Shahriari *et al.*, 2016). Las citocninas naturales y sintéticas incluyen zeatina, zeatina ribosida, cinetina, isopenteniladenina (2iP), tidiazurón (TDZ) y benciladenina (BA) (Hartmann *et al.*, 2011). Este grupo de

reguladores del crecimiento normalmente inhibe la formación de raíces adventicias (Kuroha *et al.*, 2002; Tiberia, Pamfil & Bellini, 2011). En especies con altos niveles naturales de citocininas, el enraizamiento ha sido más difícil que en aquellas con bajos niveles (Bollmark, & Eliasson, 1986; Kuroha *et al.*, 2002; Ramírez-Carvajal *et al.*, 2009) por lo que la influencia de las citocininas en la formación de raíces adventicias puede depender principalmente de su concentración (Higuchi *et al.*, 2004; Kuroha & Shinobu 2007). En discos de tallo de manzano, la BA inhibió fuertemente el enraizamiento, especialmente cuando se aplicó al inicio del periodo de enraizamiento (Pawlicki & Welander 1992). En otras especies con cierta capacidad natural de regeneración radical, la aplicación de citocininas disminuyó el número de primordios radicales macroscópicamente visibles (Haissig, 1972). En concentraciones relativamente altas, las citoquininas pueden promover la formación adventicia de brotes e inhibir la formación de raíces (Hartman *et al.*, 2011), por lo tanto, la formación de raíces adventicias se favorece cuando existe una alta relación auxina/citocinina (Yazaki & Kikuchi, 2005; Kuroha & Satoh, 2007).

1.6.3. Giberelinas

Las giberelinas (GAs) son un grupo de compuestos naturales, estrechamente relacionados y conocidos principalmente por promover el alargamiento de células y en consecuencia del tallo (Hartman *et al.*, 2011).

Las GAs inhiben la formación de raíces adventicias (Pawlicki & Welander, 1992; Suleiman, Bhat, Jacob & Thomas, 2011; Sevik & Guney, 2013) pero tienen un efecto estimulante sobre el alargamiento de las raíces (Niu *et al.*, 2013). Las GAs tienen una función en la regulación de la síntesis de los ácidos nucleicos y las proteínas, además de que pueden suprimir la iniciación de las raíces al interferir con estos procesos, particularmente la transcripción (Hartman *et al.*, 2011).

La aplicación de ácido giberélico en sauce redujo la división celular intraprimordio bloqueando la acción de la auxina después de la fase de iniciación (Haissig, 1972). En álamo blanco y *arabidopsis* se ha mostrado que las GAs causan un efecto inhibitorio del enraizamiento adventicio al alterar el transporte polar de

auxinas (Mauriat, Petterle, Bellini & Moritz, 2014). En estacas de madera dura de vid, la aplicación de inhibidores de la biosíntesis de la GAs incrementó el número y longitud de las raíces, sin embargo, este efecto fue inconsistente al aplicar los inhibidores a estacas de madera suave (Keeley, Preece & Taylor, 2003).

1.6.4. Etileno

El etileno es un regulador de crecimiento que se manifiesta en forma gaseosa, cuya biosíntesis está fuertemente potenciada por lesiones (Druege, 2006), inundación (Vidoz, Loreti, Mensuali, Alpi & Perata, 2010) y otros factores de estrés, ha mostrado un efecto estimulante, inhibitorio o sin respuesta durante la formación de raíces adventicias (Cuadro 3).

La promoción del enraizamiento por etileno ocurre con más frecuencia en plantas intactas, en plantas herbáceas y en plantas que tienen iniciales de raíz preformadas (Hartman *et al.*, 2011). El efecto del etileno sobre el crecimiento de las raíces está mediado por la regulación de la biosíntesis y la distribución local de las auxinas. El etileno estimula la biosíntesis y el transporte de las auxinas conduciendo a la inhibición del alargamiento celular (Stepanova, *et al.*, 2005; Růžicka *et al.*, 2007). El enraizamiento de brotes de tomates mutantes insensibles a etileno ha demostrado que el efecto promotor de la auxina en el enraizamiento adventicio se incrementa en las plantas que son sensibles al etileno (Clark *et al.*, 1999).

En las etapas posteriores del enraizamiento el etileno induce la síntesis de peroxidasas ácidas involucradas en la biosíntesis de la lignina, celulasas y pectinasas que facilitan la emergencia de las raíces a través de los tejidos del tallo (Faivre-Rampant *et al.*, 1991). Por tanto, la relación entre el etileno y el enraizamiento podría considerarse como multifacética, siendo estimulante durante la etapa inicial y presentando efectos inhibitorios en las fases sucesivas del enraizamiento (De Klerk *et al.*, 1999; De Klerk & Hanecakova, 2008; da Costa *et al.*, 2013); además, el efecto de la aplicación de etileno o de sus inhibidores depende del contenido endógeno de etileno en las plantas que a su vez depende de la concentración de auxinas (De Klerk & Hanecakova, 2008).

Cuadro 3. Efecto del etileno en el enraizamiento adventicio de diferentes especies vegetales

Especie	Efecto	Fuente
<i>Phaseolus aureus</i> Roxb.	Promotor	Krishnamoorthy (1970)
<i>Phaseolus aureus</i> Roxb.	Sin respuesta	Mudge & Swanson (1978)
<i>Vigna radiata</i> (L.) R. Willcz.	Inhibidor	Robbins <i>et al.</i> (1983)
<i>Coiyhis avellan</i>	Promotor	González <i>et al.</i> (1991a)
<i>Rumex palustris</i> Sm.	Promotor	Visser <i>et al.</i> (1996)
<i>Malus domestica</i> Borkh.	Sin respuesta	Harbage & Stimart (1996)
<i>Oryza sativa</i> L.	Promotor	Mergemann & Sauterm (2000)
<i>Vigna radiata</i> (L.) R. Willcz.	Promotor	De Klerk & Hanecakova (2008)
<i>Vigna radiata</i> (L.) R. Willcz.	Inhibidor	De Klerk & Hanecakova (2008)
<i>Solanum lycopersicum</i> L.	Promotor	Negi <i>et al.</i> (2010)
<i>Phaseolus radiatus</i> L.	Promotor	Pan <i>et al.</i> (2012)
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Promotor	Veloccia <i>et al.</i> (2016)

1.6.5. Ácido abscísico

Los informes del efecto del ácido abscísico (ABA) en la formación de raíces adventicias son contradictorios, dependiendo de la concentración, el ambiente y el estado nutricional de las plantas. El ABA antagoniza los efectos de las giberelinas y las citoquininas, las cuales pueden inhibir el enraizamiento (Hartman *et al.*, 2011). En algunas especies los niveles endógenos de ABA pueden limitar la producción de etileno causando la inhibición del crecimiento de las raíces (Sharp, 2002; Sharp & LeNoble, 2002).

El ABA también influye en la capacidad de las estacas para soportar el estrés hídrico durante la propagación (Hartman *et al.*, 2011). Además, inhibe la inducción de raíces adventicias provocada por etileno, así como la emergencia de las mismas promovida por las GAs (Steffens *et al.*, 2006). En plantas mutantes de arroz se observó que un menor nivel de ABA y una concentración superior de etileno provocan un mayor crecimiento de las raíces adventicias, lo que apoya la idea de que las alteraciones en las concentraciones de ABA y etileno son un

requisito previo para el crecimiento de las raíces adventicias (Ma *et al.*, 2014). Además, la aparición de raíces adventicias debe ser coordinada con la muerte programada de las células epidérmicas que cubren los primordios de las raíces que es controlada por etileno, GAs y ABA (Steffens *et al.*, 2006).

1.6.6. Jasmonatos

El ácido jasmónico (JA) y el metil jasmonato (MeJA) son reguladores del crecimiento de las plantas con muchos efectos en el desarrollo (Fattorini *et al.*, 2009). Su papel durante la formación de raíces adventicias ha mostrado que existe una interacción con las auxinas a diferentes niveles modulando su biosíntesis o transporte (Bellini *et al.*, 2014; Legué, Rigal, & Bhalerao, 2014; Wasternack, & Hause, 2013). En capas de células delgadas de tabaco bajo condiciones *in vitro*, se observó que la interacción entre jasmonatos y auxinas regula la formación de raíces adventicias (Fattorini *et al.*, 2009). Por otra parte, niveles reducidos de jasmonatos endógenos afectaron la formación de raíces adventicias provocando una disminución del número de raíces en estacas de hoja de petunia, lo que sugiere que los jasmonatos actúan como reguladores positivos de la formación de raíces adventicias (Lischweski *et al.*, 2015). La escisión de esquejes de petunia se caracteriza por un aumento rápido y transitorio en el nivel de JA seguido por la inducción de genes que codifican enzimas que degradan la sacarosa a hexosas dentro del apoplasto (Ahkami *et al.*, 2009); no obstante, el aumento en los niveles de jasmonatos en los esquejes de petunia, inducido por la herida parece no ser causal del incremento de los niveles de auxinas y etileno (Lischweski *et al.*, 2015).

1.7. Cofactores del enraizamiento

Durante la formación de raíces adventicias, se requiere de la presencia de factores que actúan de forma sinérgica llamados cofactores del enraizamiento que permiten o mejoran la iniciación y desarrollo del primordio de raíz inducido por las auxinas. El tipo o la concentración del cofactor parece determinar parcialmente si los primordios de la raíz se inician fácilmente, con dificultad o no se inician (Haissig, 1974a).

Varios resultados han indicado que algunos compuestos fenólicos (ácido clorogénico, epicatequina, ácido cafeico, catecol, ácido gálico, ácido ferúlico) actúan como cofactores de enraizamiento (Krajnc, Turinek, & Ivančič, 2013) que modulan la actividad de la peroxidasa; pueden prevenir la degradación de las auxinas (De Klerk *et al.*, 2011; Trobec *et al.*, 2005) y proteger el tejido vegetal del estrés oxidativo causado por las heridas del corte (De Klerk *et al.*, 1999, 2011). Los flavonoides, una clase importante de compuestos fenólicos, pueden influir en el transporte de las auxinas (Peer & Murphy, 2007; Buer, Imin & Djordjevic, 2010) y su acumulación se ha asociado con una mayor sensibilidad a las auxinas, que favorece la formación de raíces adventicias (Curir *et al.*, 1990).

1.8. Carbohidratos

La iniciación y formación de raíces adventicias requieren energía y esqueletos de carbono necesarios para las divisiones celulares que se obtienen de la presencia de carbohidratos ya que estos compuestos promueven la iniciación celular (Husen & Pal, 2007). Una importante fuente de carbono es la sacarosa, que se forma en los tejidos fotosintéticamente activos y se traslada hacia las partes de demanda de la planta. La sacarosa se puede usar como una fuente directa de carbono o convertirse en compuestos de almacenamiento como almidón (Ahkami *et al.*, 2009; Krajnc *et al.*, 2013). Además, hay indicios de que los carbohidratos tienen un papel regulador en la formación de raíces adventicias (da Rocha *et al.*, 2005; Calamar & De Klerk, 2002; Gibson, 2005) y de que pueden desempeñar un papel más importante en el crecimiento de las raíces que en su iniciación (Ahkami *et al.*, 2009). Niveles bajos de carbohidratos al comienzo del enraizamiento limitan la velocidad o intensidad de la formación de raíces subsiguiente (Druege, Zerche & Kadner, 2004). El aumento de la demanda de carbohidratos durante el crecimiento de las raíces adventicias puede ser cubierto por la fotosíntesis si las condiciones de luz y otros factores ambientales permiten una actividad fotosintética suficientemente alta (Agulló-Antón *et al.*, 2011).

1.9. Nitrógeno

Los efectos del nitrógeno en el desarrollo están relacionados con el metabolismo general de los carbohidratos, los ácidos nucleicos y las proteínas. La redistribución de los recursos metabólicos, principalmente carbohidratos, puede perjudicar al enraizamiento, dependiendo del estado fisiológico particular del tejido vegetal (Geiss, Gutierrez, & Bellini, 2009).

La inhibición del enraizamiento se ha asociado con el aumento de las concentraciones endógenas de arginina, alanina, ácido aspártico, asparagina, ácido glutámico y glutamina (Haissig, 1986); aparentemente, estos aminoácidos podrían incrementar sustancialmente el nivel de nitrógeno, provocando bajas relaciones C/N, características de tejidos con bajo enraizamiento (Haissig, 1974b). Altos niveles de nitrógeno disminuyen las tasas de enraizamiento (Porfirio *et al.*, 2016) y aumentan el crecimiento de los brotes vegetativos si el nivel de nitrógeno supera el óptimo para la iniciación y desarrollo del primordio de la raíz (Haissig, 1974b), colocando a la formación de raíces adventicias en una desventaja competitiva por carbohidratos, nutrientes minerales y hormonas (Haisig, 1986).

El nitrógeno es necesario para la síntesis de ácidos nucleicos y proteínas (Hartman *et al.*, 2011). La glutamina suministra nitrógeno para la síntesis de aminoácidos y su translocación basípeta es un proceso importante para satisfacer la demanda de las células durante la formación de raíces (Krajnc *et al.*, 2013). El análisis de los tallos de petunia antes de la escisión mostró la síntesis y transporte de glutamina y asparagina, sin embargo, su contenido decreció y se mantuvo bajo después de la separación del tejido de la planta madre, indicando una alta rotación de los aminoácidos translocados en otros que parecen ser esenciales para la síntesis acelerada de proteínas durante la formación de raíces adventicias (Ahkami *et al.*, 2009).

La modificación en el suministro de nitrógeno influye fuertemente en los procesos de asimilación, asignación y partición de carbono, y por lo tanto afecta la distribución de carbohidratos dentro de una planta (Geiss *et al.*, 2009). La

reducción de la fertilización nitrogenada de la planta madre, podría favorecer la acumulación de carbohidratos y mejorar el enraizamiento, también es recomendable emplear para la propagación brotes laterales, ya que tienen bajas tasas de crecimiento y elevadas concentraciones de carbohidratos (Hartman *et al.*, 2011).

1.10. Luz

La luz es uno de los principales factores ambientales que influyen en el desarrollo de raíces adventicias al reducir o aumentar las sustancias fenólicas endógenas (Sen, 1985) que pueden actuar como inhibidores o promotores de enraizamiento (Krajnc *et al.*, 2013) bloqueando la fotooxidación de las auxinas (De-Klerk *et al.*, 2009; De-Klerk *et al.*, 2011); además de desempeñar un papel importante en el metabolismo de los carbohidratos mediante la fotosíntesis (Rapaka *et al.*, 2005) la luz también puede afectar la concentración de citoquininas endógenas, que pueden funcionar como inhibidores del enraizamiento (Fett-Neto *et al.*, 2011). Otros efectos potenciales de la luz incluyen cambios en la absorción de nutrientes y auxinas, ya que puede afectar la transpiración y la apertura y cierre de estomas (de Assis, Fett-Neto & Alfenas, 2004).

1.11. Temperatura

La temperatura puede influir en el estado fisiológico de la planta madre y afectar posteriormente el desarrollo de las raíces adventicias (Geiss *et al.*, 2009) en aspectos tales como la absorción de agua y nutrientes (Taiz & Zeiger, 2002) y el metabolismo en general (Haissig, 1986), promoviendo o inhibiendo la acción enzimática (Geiss *et al.*, 2009) y modulando el transporte endógeno de auxinas, así como la absorción y el metabolismo de las fuentes exógenas de esta fitohormona (da Rocha & Fett-Neto, 2004).

En general, en áreas de clima frío, el enraizamiento se limita a los meses más cálidos, ya que el porcentaje de enraizamiento disminuye en los meses fríos del invierno, sin embargo, puede extenderse para todo el año si se emplea un invernadero (de Assis *et al.*, 2004).

1.12. Propagación clonal de portainjertos de aguacatero

El aguacatero es una especie de polinización cruzada, monoembriónica y altamente heterocigota, características que se manifiestan en una muy resaltada variabilidad genética. Debido a estas características, los portainjertos obtenidos de semilla, incluso a partir de una sola planta madre, son genéticamente desuniformes (Calabrese, 1992). De modo que es poco probable conservar alguna característica sobresaliente de algún genotipo, por lo que se hace necesaria la propagación clonal (González-Rosas & Salazar-García, 1984). De esta manera, las plantas definitivas de una plantación comercial serán genéticamente idénticas entre sí, tanto en patrón como en copa (Ernst, 1999), lográndose uniformizar el tamaño de los árboles y la producción solo cuando la variedad injertada crece sobre portainjertos que son genéticamente idénticos; asimismo ocurre en otros factores, como una amplitud de susceptibilidad a enfermedades, tolerancia a diferentes condiciones de suelo, resistencia a insectos, calidad de la fruta y largo periodo de vida productiva (Gillespie, 1954).

Varios programas de selección y mejoramiento genético en el mundo han identificado patrones con un alto grado de resistencia a *P. cinnamomi* (Engelbrecht, & Van den Berg, 2013), tolerancia a la salinidad, mejora de la productividad, compatibilidad del portainjerto y el vástago, enanismo y uniformidad genética del huerto (Hofshi, 1996).

La propagación comercial emplea el sistema 'semilla nodriza/etiolacion' (Ernst, Whiley & Bender, 2013) mediante la técnica de microclonación 'Allesbeste' (Ernst, 1999), la cual permite producir varios clones a partir de una semilla nodriza y separar completamente el sistema radical del brote de la planta nodriza. Este método es rápido, produce un gran número de raíces, y no destruye la semilla nodriza (Hofshi, 1996).

1.13. Literatura citada

Altamura, M. M. (1996). Root histogenesis in herbaceous and woody explants cultured in vitro. A critical review. *Agronomie-Sciences des Productions Vegetales et de l'Environnement*, 16(10), 589-602.

- Agulló-Antón, M. Á., Sánchez-Bravo, J., Acosta, M., & Druege, U. (2011). Auxins or sugars: what makes the difference in the adventitious rooting of stored carnation cuttings?. *Journal of Plant Growth Regulation*, 30(1), 100-113. doi:10.1007/s00344-010-9174-8
- Ahkami, A. H., Lischewski, S., Haensch, K. T., Porfirova, S., Hofmann, J., Rolletschek, H., ... & Hajirezaei, M. R. (2009). Molecular physiology of adventitious root formation in *Petunia hybrida* cuttings: involvement of wound response and primary metabolism. *New Phytologist*, 181(3), 613-625. doi:10.1111/j.1469-8137.2008.02704.x
- Amissah, J. N., & Bassuk, N. (2009). Cutting back stock plants promotes adventitious rooting of stems of *Quercus bicolor* and *Quercus macrocarpa*. *Journal of Environmental Horticulture*, 27(3), 159.
- Amri, E., Lyaruu, H. V. M., Nyomora, A. S., & Kanyeka, Z. L. (2010). Vegetative propagation of African Blackwood (*Dalbergia melanoxylon* Guill. & Perr.): effects of age of donor plant, IBA treatment and cutting position on rooting ability of stem cuttings. *New Forests*, 39(2), 183-194. doi:10.1007/s11056-009-9163-6
- Arbeloa A, Andreu P, Lorente P, García E, Marín J. A. (2012). Recuperación in vitro de clones envejecidos y amenazados de ciruelo. *ITEA-Información Técnica Económica Agraria* 108 (2): 165-171
- Ballester, A., San-José, M. C., Vidal, N., Fernández-Lorenzo, J. L., & Vieitez, A. M. (1999). Anatomical and biochemical events during *in vitro* rooting of microcuttings from juvenile and mature phases of chestnut. *Annals of Botany*, 83(6), 619-629. doi:10.1006/anbo.1999.0865
- Barceló-Muñoz, A., Encina, L. C., Simón-Pérez, E., & Pliego-Alfaro, F. (1999). Micropropagation of adult avocado. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 58: 11-17.
- Basheer-Salimia, R. (2007). Juvenility, maturity, and rejuvenation in woody plants. *Hebron University Research Journal*, 3, 17-43.
- Bassuk, N., Miske, D., & Maynard, B. (1985). Stock plant etiolation for improved rooting of cuttings. *Proceedings of the International Plant Propagator's Society*, 35, 543-550.
- Bellini, C., Pacurar, D. I., & Perrone, I. (2014). Adventitious roots and lateral roots: similarities and differences. *Annual Review of Plant Biology*, 65, 639-666. doi:10.1146/annurev-arplant-050213-035645

- Blythe, E. K., Sibley, J. L., Tilt, K. M., & Ruter, J. M. (2007). Methods of auxin application in cutting propagation: A review of 70 years of scientific discovery and commercial practice. *Journal of Environmental Horticulture*, 25(3), 166.
- Bollmark, M., & Eliasson, L. (1986). Effects of exogenous cytokinins on root formation in pea cuttings. *Physiologia Plantarum*, 68(4), 662-666. doi:10.1111/j.1399-3054.1986.tb03414.x
- Buer, C. S., Imin, N., & Djordjevic, M. A. (2010). Flavonoids: new roles for old molecules. *Journal of Integrative Plant Biology*, 52(1), 98-111. doi:10.1111/j.1744-7909.2010.00905.x
- Calabrese, F. (1992). *El aguacate*. Madrid, España: Ediciones Mundi-Prensa.
- Calamar, A., & De Klerk, G. J. (2002). Effect of sucrose on adventitious root regeneration in apple. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 70, 207-212. doi:10.1023/A:1016356123367
- Caso, O. H. (1992). Juvenilidad, rejuvenecimiento y propagación vegetativa de las especies leñosas. *Agriscientia*, 9(1).
- Clark, D. G., Gubrium, E. K., Barrett, J. E., Nell, T. A., & Klee, H. J. (1999). Root formation in ethylene-insensitive plants. *Plant Physiology*, 121(1), 53-60. doi:10.1104/pp.121.1.53
- Cooper, W. C. (1935). Hormones in relation to root formation on stem cuttings. *Plant Physiology*, 10(4), 789.
- Curir, P., VanSumere, C. F., Termini, A., Barthe, P., Marchesini, A., & Dolci, M. (1990). Flavonoid accumulation is correlated with adventitious roots formation in *Eucalyptus gunnii* Hook micropropagated through axillary bud stimulation. *Plant Physiology*, 92(4), 1148-1153. doi:10.1104/pp.92.4.1148
- da Costa, C. T., De Almeida, M. R., Ruedell, C. M., Schwambach, J., Maraschin, F. D. S., & Fett-Neto, A. G. (2013). When stress and development go hand in hand: main hormonal controls of adventitious rooting in cuttings. *Frontiers in Plant Science*, 4, 133. doi:10.3389/fpls.2013.00133
- da Rocha, C. L., Cristiano, P. D., Schwambach, J., & Fett-Neto, A. G. (2005). Carbohydrates as regulatory factors on the rooting of *Eucalyptus saligna* Smith and *Eucalyptus globulus* Labill. *Plant Growth Regulation*, 45(1), 63-73. doi:10.1007/s10725-004-6125-z
- da Rocha, C. L., & Fett-Neto, A. G. (2004). Effects of temperature on adventitious root development in microcuttings of *Eucalyptus saligna* Smith and *Eucalyptus globulus* Labill. *Journal of Thermal Biology*, 29(6), 315-324. doi:10.1016/j.jtherbio.2004.05.006

- Davies, F. T., & Hartmann, H. T. (1988). The physiological basis of adventitious root formation. *Acta Horticulturae*, 227: 113–120.
- Davies, F. T., & Joiner, J. N. (1980). Growth regulator effects on adventitious root formation in leaf bud cuttings of juvenile and mature *Ficus pumila*. *Journal of American Society for Horticultural Sciences*, 105: 91-95.
- de Assis, T. F., Fett-Neto, A. G., & Alfenas, A. C. (2004). Current techniques and prospects for the clonal propagation of hardwoods with emphasis on *Eucalyptus*. *Plantation Forest Biotechnology for the 21st century*, 303-333.
- De Klerk, G. J., Guan, H., Huisman, P., & Marinova, S. (2011). Effects of phenolic compounds on adventitious root formation and oxidative decarboxylation of applied indoleacetic acid in *Malus* 'Jork 9'. *Plant Growth Regulation*, 63(2), 175-185. doi:10.1007/s10725-010-9555-9
- De Klerk, G. J., & Hanecakova, J. (2008). Ethylene and rooting of mung bean cuttings. The role of auxin induced ethylene synthesis and phase-dependent effects. *Plant Growth Regulation*, 56(2), 203-209. doi:10.1007/s10725-008-9301-8
- De Klerk, G. J., Van der Krieken, W., & De Jong, J. C. (1999). Review the formation of adventitious roots: new concepts, new possibilities. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 35(3), 189-199. doi:10.1007/s11627-999-0076-z
- Druege, U. (2006). Ethylene and plant responses to abiotic stress. In *Ethylene Action in Plants* (pp. 81-118). Springer Berlin Heidelberg. doi:10.1007/978-3-540-32846-9_5
- Druege, U., Zerche, S., & Kadner, R. (2004). Nitrogen-and storage-affected carbohydrate partitioning in high-light-adapted *Pelargonium* cuttings in relation to survival and adventitious root formation under low light. *Annals of Botany*, 94(6), 831-842. doi:10.1093/aob/mch210
- Engelbrecht, J., & Van den Berg, N. (2013). Expression of defence-related genes against *Phytophthora cinnamomi* in five avocado rootstocks. *South African Journal of Science*, 109(11-12), 1-8.
- Epstein, E., & Ludwig-Müller, J. (1993). Indole-3-butyric acid in plants: occurrence, synthesis, metabolism and transport. *Physiologia Plantarum*, 88(2), 382-389. doi:10.1111/j.1399-3054.1993.tb05513.x
- Ernst, A. A. (1999). Micro cloning: a multiple cloning technique for avocados using micro containers. *Revista Chapingo Serie Horticultura*, 5, 217-220.

- Ernst, A. A. Whiley, A. W. & Bender, G. S. (2013). In B. A. Schaffer, B. N. Wolstenholme, & A. W. Whiley (eds.), *The avocado: botany, production and uses* (pp. 234-267). London, United Kingdom: CAB International.
- Faivre-Rampant, O., Kevers, C., Bellini, C., & Gaspar, T. (1998). Peroxidase activity, ethylene production, lignification and growth limitation in shoots of a nonrooting mutant of tobacco. *Plant Physiology and Biochemistry*, 36(12), 873-877.
- FAOSTAT. 2016. FAO statistical databases. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy. Consultado en: <http://www.fao.org>
- Fattorini, L., Falasca, G., Kevers, C., Rocca, L. M., Zadra, C., & Altamura, M. M. (2009). Adventitious rooting is enhanced by methyl jasmonate in tobacco thin cell layers. *Planta*, 231(1), 155-168. doi:10.1007/s00425-009-1035-y
- Fernández, N. C, Van Rooyen, Z., & Köhne, S. (2011). Reasons for the use of clonal avocado rootstocks around the world. *Proceedings of the VII World Avocado Congress*.
- Fett-Neto, A. G., Fett, J. P., Goulart, L. V., Pasquali, G., Termignoni, R. R., & Ferreira, A. G. (2001). Distinct effects of auxin and light on adventitious root development in *Eucalyptus saligna* and *Eucalyptus globulus*. *Tree Physiology*, 21(7), 457-464.
- Fishel, D. W., Zaczek, J. J., & Preece, J. E. (2003). Positional influence on rooting of shoots forced from the main bole of swamp white oak and northern red oak. *Canadian Journal of Forest Research*, 33(4), 705-711. doi:10.1139/x02-201
- Fragoso, R. D. O., Stuepp, C. A., Rickli, H. C., Zuffellato-Ribas, K. C., & Koehler, H. S. (2017). Maximum efficiency concentration of indole butyric acid in promoting the rooting of Japanese Flowering Cherry. *Ciência Rural*, 47(1). doi:10.1590/0103-8478cr20150894
- Frolich, E. F., & Platt, R. G. (1971-72). Use of the etiolation technique in rooting avocado cuttings. *California Avocado Society Yearbook*, 55, 97-109.
- Galavi, M., Karimian, M. A., & Mousavi, S. R. (2013). Effects of different auxin (IBA) concentrations and planting-beds on rooting grape cuttings (*Vitis vinifera*). *Annual Review & Research in Biology*, 3(4), 517-523.
- Gallegos-Espinoza, R. (1983). Algunos aspectos del aguacate y su producción en Michoacán. Chapingo, México: Universidad Autónoma de Chapingo y Grupo Editorial Gaceta. 251 p.

- Geiss, G., Gutierrez, L., & Bellini, C. (2009). Adventitious root formation: new insights and perspectives. *Annual Plant Reviews: Root Development*, 37, 127-156. doi:10.1002/9781444310023.ch5
- Gibson, S. I. (2005). Control of plant development and gene expression by sugar signaling. *Current Opinion in Plant Biology*, 8(1), 93-102. doi:10.1016/j.pbi.2004.11.003
- Gillespie, H. (1954). Development and evaluation of clonal rootstocks in the avocado-phase two. *California Avocado Association Yearbook*, 38, 87-95.
- González, A., Rodríguez, R., & Tamés, R. S. (1991a). Ethylene and *in vitro* rooting of hazelnut (*Corylus avellana*) cotyledons. *Physiologia Plantarum*, 81(2), 227-233. doi:10.1111/j.1399-3054.1991.tb02134.x
- González, A., Tamés, R. S., & Rodríguez, R. (1991b). Ethylene in relation to protein, peroxidase and polyphenol oxidase activities during rooting in hazelnut cotyledons. *Physiologia Plantarum*, 83(4), 611-620. doi:10.1111/j.1399-3054.1991.tb02477.x
- González-Rosas, H., & Salazar-García, S. (1984). Root induction and vegetative development from avocado plantules (*Persea americana* Mill.). *California Avocado Society Yearbook* 48: 167-171.
- Haffner, V., F. Enjalric, L. Lardet, and M. P. Carron. (1991). Maturation of woody plants: a review of metabolic and genomic aspects. *Annales des Sciences Forestieres* 48:615-630.
- Haissig, B. E. (1970). Influence of indole-3-acetic acid on adventitious root primordia of brittle willow. *Planta*, 95(1), 27-35. doi:10.1007/BF00431118
- Haissig, B. E. (1972). Meristematic activity during adventitious root primordium development influences of endogenous auxin and applied gibberellic acid. *Plant Physiology*, 49(6), 886-892. doi:10.1104/pp.49.6.886
- Haissig, B. E. (1974a). Influences of auxins and auxin synergists on adventitious root primordium initiation and development. *New Journal of Forestry Science*, 4(31), 1-323.
- Haissig, B. E. (1974b). Metabolism during adventitious root primordium initiation and development. *New Zealand Journal of Forestry Science*, 4(2), 324-37.
- Haissig, B. E. (1986). Anatomical changes during adventitious root formation. In M. B. Jackson (Ed.), *New root formation in plants and cuttings* (pp. 141-189). Lancaster, United Kingdom: Martinus Nijhoff Publishers.

- Harbage, J. F., Stimart, D. P., & Evert, R. F. (1993). Anatomy of adventitious root formation in microcuttings of *Malus domestica* Borkh. 'Gala'. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 118(5), 680-688.
- Harbage, J. F., & Stimart, D. P. (1996). Ethylene does not promote adventitious root initiation on apple microcuttings. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 121(5), 880-885.
- Hartmann, H. T., Kester, D. E., Davies, F. T. & Geneve. R. L. (2011). *Plant propagation: principles and practices*. (8th ed.). Ine, New Jersey, USA: Prentice-Hall.
- Higuchi, M., Pischke, M. S., Mähönen, A. P., Miyawaki, K., Hashimoto, Y., Seki, M., ... & Helariutta, Y. (2004). In planta functions of the Arabidopsis cytokinin receptor family. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(23), 8821-8826. doi:10.1073/pnas.0402887101
- Hofshi, R. (1996). Experiments with cloning avocado rootstocks. *California Avocado Society Yearbook*, 80, 103-108.
- Howard, B. H. (1985). Factors affecting the response of leafless winter cuttings of apple and plum to IBA applied in powder formulation. *Journal of horticultural Science*, 60(2), 161-168. doi:10.1080/14620316.1985.11515615
- Husen, A. (2008a). Stock-plant etiolation causes drifts in total soluble sugars and anthraquinones, and promotes adventitious root formation in teak (*Tectona grandis* L. f.) coppice shoots. *Plant Growth Regulation*, 54(1), 13-21. doi:10.1007/s10725-007-9222-y
- Husen, A. (2008b). Clonal propagation of *Dalbergia sissoo* Roxb. and associated metabolic changes during adventitious root primordium development. *New Forests*, 36, 13-27. doi:10.1007/s11056-007-9079-y
- Husen, A. (2012). Changes of soluble sugars and enzymatic activities during adventitious rooting in cuttings of *Grewia optiva* as affected by age of donor plants and auxin treatments. *American Journal of Plant Physiology*, 7(1). doi:10.3923/ajpp.2012.1.16
- Husen, A. (2011). Coppice-shoot cuttings of *Tectona grandis* as affected by stock-plant etiolation. *American Journal of Plant Sciences*, 2: 370-374. doi: 10.4236/ajps.2011.23042
- Husen, A. & Pal, M. (2003). Effect of serial bud grafting and etiolation on rejuvenation and rooting cuttings of mature trees of *Tectona grandis* Linn. f. *Silvae Genetica*, 52(2): 84-88.

- Husen, A., & Pal, M. (2006). Variation in shoot anatomy and rooting behaviour of stem cuttings in relation to age of donor plants in teak (*Tectona grandis* Linn. f.). *New Forests*, 31(1), 57-73. doi:10.1007/s11056-004-6794-5
- Husen, A., & Pal, M. (2007). Metabolic changes during adventitious root primordium development in *Tectona grandis* Linn. f. (teak) cuttings as affected by age of donor plants and auxin (IBA and NAA) treatment. *New Forests*, 33(3), 309-323. doi:10.1007/s11056-006-9030-7
- Kadman, A., & Ben-Ya'acov, A. (1965). A review of experiments on some factors influencing the rooting of avocado cuttings. *California Avocado Society Yearbook*, 49, 67-72.
- Kareem, A., Manan, A., Saeed, S., Rehman, S. U., Shahzad, U., & Nafees, M. (2016). Effect of different concentrations of IBA on rooting of guava *Psidium guava* L. in low tunnel under shady situation. *Journal of Agriculture and Environment for International Development (JAEID)*, 2(110), 197-203. doi:10.12895/jaeid.20162.432
- Keeley, K., Preece, J. E., & Taylor, B. H. (2003). Increased rooting of 'Norton' grape cuttings using auxins and gibberellin biosynthesis inhibitors. *HortScience*, 38(2), 281-283.
- Kenney, G., Sudi, J., & Blackman, G. E. (1969). The uptake of growth substances: XIII. Differential uptake of indol-3yl-acetic acid through the epidermal and cut surfaces of etiolated stem segments. *Journal of Experimental Botany*, 20(4), 820-840. doi:10.1093/jxb/20.4.820
- Krajnc, A. U., Turinek, M., & Ivančič, A. (2013). Morphological and physiological changes during adventitious root formation as affected by auxin metabolism: stimulatory effect of auxin containing seaweed extract treatment. *Agricultura (Slovenia)*, 10(1/2), 17-27.
- Krishnamoorthy, H. N. (1970). Promotion of rooting in mung bean hypocotyl cuttings with ethrel, an ethylene releasing compound. *Plant and Cell Physiology*, 11(6), 979-982.
- Kuroha, T., & Satoh, S. (2007). Involvement of cytokinins in adventitious and lateral root formation. *Plant Root*, 1, 27-33. doi:10.3117/plantroot.1.27
- Lambardi, M., Ozudogru, E. A., & Jain, S. M. (2012). *Protocols for Leakey, R. R. B. (2004). Physiology of vegetative reproduction*. In Burley, J., Evans, J. & Youngquist, J. A., (Eds.), *Encyclopaedia of Forest Sciences* (pp. 1655-1668). London, UK: Academic Press.
- Lazaj, A., Rama, P., & Vuksani, G. (2015). The interaction of season collection of cuttings, indol butyric acid (IBA) and juvenility factors on root induction in

Olea europaea L. cultivar Kokërr Madhi i Beratit. *Albanian Journal of Agricultural Sciences*, 14(1), 41-46.

- Legué, V., Rigal, A., & Bhalerao, R. P. (2014). Adventitious root formation in tree species: involvement of transcription factors. *Physiologia Plantarum*, 151(2), 192-198. doi:10.1111/ppl.12197
- Lischweski, S., Muchow, A., Guthörl, D., & Hause, B. (2015). Jasmonates act positively in adventitious root formation in petunia cuttings. *BMC plant Biology*, 15(1), 229. doi:10.1186/s12870-015-0615-1
- Lovell, P. H., & White, J. (1986). Anatomical changes during adventitious root formation. In M. B. Jackson (Ed.), *New root formation in plants and cuttings* (pp. 111-140). Lancaster, United Kingdom: *Martinus Nijhoff Publishers*.
- Ludwig-Müller, J. (2000). Indole-3-butyric acid in plant growth and development. *Plant Growth Regulation*, 32(2-3), 219-230. doi:10.1023/A:1010746806891
- Ma, B., Yin, C. C., He, S. J., Lu, X., Zhang, W. K., Lu, T. G., ... & Zhang, J. S. (2014). Ethylene-induced inhibition of root growth requires abscisic acid function in rice (*Oryza sativa* L.) seedlings. *PLoS Genet*, 10(10), e1004701. doi:10.1371/journal.pgen.1004701
- Mauriat, M., Petterle, A., Bellini, C., & Moritz, T. (2014). Gibberellins inhibit adventitious rooting in hybrid aspen and Arabidopsis by affecting auxin transport. *The Plant Journal*, 78(3), 372-384. doi:10.1111/tpj.12478
- Maynard, B. K., & Bassuk, N. L. (1996). Effects of stock plant etiolation, shading, banding, and shoot development on histology and cutting propagation of *Carpinus betulus* L. fastigiata. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 121(5), 853-860.
- Mergemann, H., & Sauter, M. (2000). Ethylene induces epidermal cell death at the site of adventitious root emergence in rice. *Plant Physiology*, 124(2), 609-614. doi:10.1104/pp.124.2.609
- Millán-Orozco, L., Corredoira, E., & del Carmen, S. J. M. (2011). In vitro rhizogenesis: histoanatomy of *Cedrela odorata* (Meliaceae) microcuttings. *Revista de Biología Tropical*, 59(1):447-453.
- Mohnen, D. (1994). Novel experimental systems for determining cellular competence and determination. In T. D. Davis, & B. E. Haissig (Eds.), *Biology of adventitious root formation* (pp. 87-98). New York: Plenum Press.

- Mudge, K. W., & Swanson, B. T. (1978). Effect of ethephon, indole butyric acid, and treatment solution pH on rooting and on ethylene levels within mung bean cuttings. *Plant Physiology*, 61(2), 271-273. doi:10.1104/pp.61.2.27
- Muñoz-Pérez, R.B., & Rogel-Castellanos, I. (1998). *Ensayos sobre propagación clonal de portainjertos de aguacate*. Coatepec Harinas, Estado de México: Fundación Salvador Sánchez Colín, CICTAMEX, S.C.
- Negi, S., Sukumar, P., Liu, X., Cohen, J. D., & Muday, G. K. (2010). Genetic dissection of the role of ethylene in regulating auxin-dependent lateral and adventitious root formation in tomato. *The Plant Journal*, 61(1), 3-15. doi:10.1111/j.1365-313X.2009.04027.x
- Newett, S. D. E., Crane, J. H., & Balerdi, C. F. (2007). Cultivars and rootstocks. In A. W. Whiley, B. A. Schaffer, & B. N. Wolstenholme (Eds.). *Avocado: botany, production and uses* (167-187). New York, USA: CAB Publishing.
- Niu, S., Li, Z., Yuan, H., Fang, P., Chen, X., & Li, W. (2013). Proper gibberellin localization in vascular tissue is required to regulate adventitious root development in tobacco. *Journal of Experimental Botany*, 64(11), 3411-3424. doi:10.1093/jxb/ert186
- Noor Camellia, N. A., Thohirah, L. A., Abdullah, N. A. P., & Mohd Khidir, O. (2009). Improvement on rooting quality of *Jatropha curcas* using indole butyric acid (IBA). *Research Journal of Agriculture and Biological Sciences*, 5(4), 338-343.
- Nordström, A. C., Jacobs, F. A., & Eliasson, L. (1991). Effect of exogenous indole-3-acetic acid and indole-3-butyric acid on internal levels of the respective auxins and their conjugation with aspartic acid during adventitious root formation in pea cuttings. *Plant Physiology*, 96(3), 856-861. doi:10.1104/pp.96.3.856
- Overvoorde, P. J., Okushima, Y., Alonso, J. M., Chan, A., Chang, C., Ecker, J. R., ... & Smith, A. (2005). Functional genomic analysis of the AUXIN/INDOLE-3-ACETIC ACID gene family members in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Cell*, 17(12), 3282-3300. doi:10.1105/tpc.105.036723.2
- Owais, S. J. (2010). Rooting response of five pomegranate varieties to indole butyric acid concentration and cuttings age. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 13(2), 51. doi:10.3923/pjbs.2010.51.58
- Pan, R., Wang, J., & Tian, X. (2002). Influence of ethylene on adventitious root formation in mung bean hypocotyl cuttings. *Plant Growth Regulation*, 36(2), 135-139. doi:10.1023/A

- Pawlicki, N., & Welander, M. (1992). The effects of benzyladenine and gibberellic acid on adventitious root formation in apple stem discs. *Agronomie*, 12(10), 783-788.
- Peer, W. A., & Murphy, A. S. (2007). Flavonoids and auxin transport: modulators or regulators?. *Trends in Plant Science*, 12(12), 556-563. doi:10.1016/j.tplants.2007.10.003
- Pereira, M. J. (2009). Reversion to juvenility: the use of epicormics in the micropropagation of mature wild shrubs of *Vaccinium cylindraceum* Smith (Ericaceae). *ARQUIPÉLAGO-Life and Marine Sciences*, 63-68.
- Platt, R. G. (1976). Current techniques of avocado propagation. *Proceedings of the first international tropical fruit short course: the avocado*. 92-95.
- Pliego-Alfaro, F., Barceló-Muñoz, A., Simón-Pérez, E., de la Viña-Nieto, G., Sánchez-Romero, C., & Perán-Quesada, R. (1999). La micropropagación en la mejora de patrones de aguacate (*Persea americana* Mill.): problemas y limitaciones. *Revista Chapingo Serie Horticultura*, 5, 239-244.
- Pijut, P.M. & Espinosa, A.C. (2005). Development of a rooted cutting propagation method for *Prunus serotina*. *The International Plant Propagator's Society Combined Proceedings*, 54, 129-131.
- Pijut, P. M., Woeste, K. E., & Michler, C. H. (2011). Promotion of adventitious root formation of difficult-to-root hardwood tree species. *Horticultural Reviews*, 38, 213-251. doi:10.1002/9780470872376.ch6
- Porfírio, S., da Silva, M. D. G., Cabrita, M. J., Azadi, P., & Peixe, A. (2016). Reviewing current knowledge on olive (*Olea europaea* L.) adventitious root formation. *Scientia Horticulturae*, 198, 207-226. doi:10.1016/j.scienta.2015.11.034
- Rapaka, V. K., Bessler, B., Schreiner, M., & Druege, U. (2005). Interplay between initial carbohydrate availability, current photosynthesis, and adventitious root formation in *Pelargonium* cuttings. *Plant Science*, 168(6), 1547-1560. doi:10.1016/j.plantsci.2005.02.006
- Ramírez-Carvajal, G. A., Morse, A. M., Dervinis, C., & Davis, J. M. (2009). The cytokinin type-B response regulator PtRR13 is a negative regulator of adventitious root development in *Populus*. *Plant Physiology*, 150(2), 759-771. doi:10.1104/pp.109.137505
- Raviv, M., Reuveni, O., & Goldschmidt, E. E. (1987). The physiological basis for loss of rootability with age in avocado seedlings. *Tree Physiology*, 3(2), 115-122.

- Read, P. E., & Bavougian, C. M. (2013). *In vitro* rejuvenation of woody species. *Protocols for Micropropagation of Selected Economically-Important Horticultural Plants*, 383-395. doi:10.1007/978-1-62703-074-8_30
- Robbins, J. A., Kays, S. J., & Dirr, M. A. (1983). Enhanced rooting of wounded mung bean cuttings by wounding and ethephon. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 108, 325-329.
- Rogel-Castellanos, I., Muñoz-Pérez, R. B., & Cruz-Castillo, J. G. (2000). Propagación de aguacatero por acodo utilizando etiolación, ácido indolbutírico, y obstrucción de savia. *Revista Chapingo Serie Horticultura*, 6(1), 101-104.
- Růžicka, K., Ljung, K., Vanneste, S., Podhorská, R., Beeckman, T., Friml, J., & Benková, E. (2007). Ethylene regulates root growth through effects on auxin biosynthesis and transport-dependent auxin distribution. *The Plant Cell*, 19(7), 2197-2212. doi:10.1105/tpc.107.052126
- Sen, S. P. (1985). The Molecular Basis of Hormone Action. In S. S. Purohit (Ed.), *Hormonal Regulation of Plant Growth and Development* (pp. 1-40). Lancaster, United Kingdom: Martinus Nijhoff Publishers.
- Shahriari, M., Rastine, E., Mir, F., & Mir, P. (2016). The role of auxin in cytokinesis in plants. *International Journal of Multidisciplinary Research and Development*, 3(1): 384-388.
- Sharp, R. E. (2002). Interaction with ethylene: changing views on the role of abscisic acid in root and shoot growth responses to water stress. *Plant, Cell & Environment*, 25(2), 211-222. doi:10.1046/j.1365-3040.2002.00798.x
- Sharp, R. E., & LeNoble, M. E. (2002). ABA, ethylene and the control of shoot and root growth under water stress. *Journal of Experimental Botany*, 53(366), 33-37. doi:10.1093/jexbot/53.366.33
- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). (2014). Cierre de la producción agrícola por estado. Consultado en <http://www.siap.gob.mx/cierre-de-la-produccion-agricola-por-estado/>
- San José, M. D. C., Romero, M. L., & Janeiro, L. V. (2012). Estudio anatómico del desarrollo de raíces adventicias en microestaquillas de *Alnus glutinosa* (L.) Gaertn. *Revista Real Academia Galega de Ciencias*, 31, 15-26.
- Schlicht, M., Ludwig-Müller, J., Burbach, C., Volkmann, D., & Baluska, F. (2013). Indole-3-butyric acid induces lateral root formation via peroxisome-derived indole-3-acetic acid and nitric oxide. *New Phytologist*, 200(2), 473-482. doi:10.1111/nph.12377

- Sevik, H., & Guney, K. (2013). Effects of IAA, IBA, NAA, and GA3 on rooting and morphological features of *Melissa officinalis* L. stem cuttings. *The Scientific World Journal*, 2013. doi:10.1155/2013/909507
- Srivastava, L. M. (2002). *Plant growth and development: hormones and environment*. London: Academic Press.
- Stepanova, A. N., Hoyt, J. M., Hamilton, A. A., & Alonso, J. M. (2005). A link between ethylene and auxin uncovered by the characterization of two root-specific ethylene-insensitive mutants in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 17(8), 2230-2242. doi:10.1105/tpc.105.033365
- Strader, L. C., & Bartel, B. (2011). Transport and metabolism of the endogenous auxin precursor indole-3-butyric acid. *Molecular Plant*, 4(3), 477-486. doi: 10.1093/mp/ssr006
- Štefančič, M., Štampar, F., Veberič, R., & Osterc, G. (2007). The levels of IAA, IAAsp and some phenolics in cherry rootstock 'GiSelA 5' leafy cuttings pretreated with IAA and IBA. *Scientia Horticulturae*, 112(4), 399-405. doi: 10.1016/j.scienta.2007.01.004
- Steffens, B., & Rasmussen, A. (2016). The physiology of adventitious roots. *Plant Physiology*, 170(2), 603-617. doi:10.1104/pp.15.0
- Suleiman, M. K., Bhat, N. R., Jacob, S., & Thomas, R. R. (2011). Effect of growth regulators on rooting of hardwood cuttings of *Lycium shawii*, *Nitraria retusa* and *Farsetia aegyptia*. *Journal of Agricultural Science and Technology B*, 1(3), 414-419.
- Taiz, L., & Zeiger, E. 2002. *Plant physiology*. Sunderland, MA, USA: Sinauer Associates, Inc.
- Tiberia, I. P., Pamfil, D., & Bellini, C. (2011). Auxin control in the formation of adventitious roots. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 39(1), 307. doi:10.15835/nbha3916101
- Trobec, M., Štampar, F., Veberič, R., & Osterc, G. (2005). Fluctuations of different endogenous phenolic compounds and cinnamic acid in the first days of the rooting process of cherry rootstock 'GiSelA 5' leafy cuttings. *Journal of Plant Physiology*, 162(5), 589-597. doi:10.1016/j.jplph.2004.10.009
- Veloccia, A., Fattorini, L., Della Rovere, F., Sofo, A., D'Angeli, S., Betti, C., ... & Altamura, M. M. (2016). Ethylene and auxin interaction in the control of adventitious rooting in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany*, 67(22), 6445-6458. doi:10.1093/jxb/erw415

- Van Sambeek, J. W., J. E. Preece, and M. V. Coggeshall. 2002. Forcing epicormic sprouts on branch segments of adult hardwoods for softwood cuttings. *Combined Proceedings International Plant Propagators' Society*. 52:417-424.
- Vidoz, M. L., Loreti, E., Mensuali, A., Alpi, A., & Perata, P. (2010). Hormonal interplay during adventitious root formation in flooded tomato plants. *The Plant Journal*, 63(4), 551-562. doi:10.1111/j.1365-3113X.2010.04262.x
- Visser, E. J., Cohen, J. D., Barendse, G. W., Blom, C. W., & Voesenek, L. A. (1996). An ethylene-mediated increase in sensitivity to auxin induces adventitious root formation in flooded *Rumex palustris* Sm. *Plant Physiology*, 112(4), 1687-1692.
- Wasternack, C., & Hause, B. (2013). Jasmonates: biosynthesis, perception, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. An update to the 2007 review in *Annals of Botany*. *Annals of Botany*, 111(6), 1021-1058. doi:10.1093/aob/mct067
- Wendling, I., Trueman, S. J., & Xavier, A. (2014). Maturation and related aspects in clonal forestry—part II: reinvigoration, rejuvenation and juvenility maintenance. *New Forests*, 45(4), 473-486. doi:10.1007/s11056-014-9415-y
- Yazaki, J., & Kikuchi, S. (2005). The genomic view of genes responsive to the antagonistic phytohormones, abscisic acid, and gibberellin. *Vitamins & Hormones*, 72, 1-30. doi:10.1016/S0083-6729(05)72001-X
- Zolman, B. K., Yoder, A., & Bartel, B. (2000). Genetic analysis of indole-3-butyric acid responses in *Arabidopsis thaliana* reveals four mutant classes. *Genetics*, 156(3), 1323-1337

2. LA CONFIGURACIÓN ANATÓMICA DEL TALLO ETIOLADO NO INTERFIERE EN EL ENRAIZAMIENTO ADVENTICIO DE PORTAINJERTOS DE AGUACATERO

2.1. Resumen

Se estudió el enraizamiento adventicio en brotes etiolados de cinco portainjertos de aguacatero, respecto a los aspectos histológicos. Se aplicaron concentraciones de 0, 5000 y 7000 mg·L⁻¹ de sal potásica de ácido indolbutírico (KIBA) sobre una lesión practicada en la base de los brotes, que posteriormente se acodaron empleando polvillo de fibra de coco y un contenedor de 55 mL de capacidad. Durante la iniciación se formaron meristemoides a partir de la división de células meristemáticas que se tiñeron intensamente. Los primordios de raíz mostraron la configuración de una raíz completa con una conexión vascular completamente desarrollada antes de emerger del tallo. La formación de primordios de raíz fue exitosa en 'Duke 7', '51 Phy', 'Day' y 'ComCarr'; ocurrió en el cambium vascular, donde aparecieron células parenquimáticas con citoplasmas densos, núcleos y nucléolos prominentes. Las primeras divisiones ocurrieron aproximadamente 25 días después de la aplicación de KIBA. El proceso de enraizamiento fue directo, con un ligero desarrollo de callo sobre la herida. En 'Velvick', únicamente se desarrollaron células parenquimatosas sobre las heridas. La configuración anatómica del tallo de los cinco portainjertos fue similar y la presencia de un anillo discontinuo de fibras de floema no impidió la emergencia de los primordios de raíz, que emergieron del tallo a través de las regiones de tejido parenquimático del anillo. La aplicación de 7000 mg·L⁻¹ de KIBA provocó una mayor formación de raíces adventicias.

Palabras clave: *Persea americana* Mill., propagación clonal, anatomía, primordio de raíz.

THE ANATOMICAL CONFIGURATION OF ETIOLATED STEMS DOES INTERFERE IN THE ADVENTITIOUS ROOTING OF AVOCADO ROOTSTOCKS

2.2. Abstract

Adventitious rooting in etiolated shoots of five avocado rootstocks was studied in relation to histological aspects. Concentrations of 0, 5000 and 7000 mg·L⁻¹ of indole-butyric acid potassium salt (KIBA) were applied to a wound at the base of the shoots, which were later layered using coconut fiber dust and a 55 mL capacity container. During initiation meristemoids were formed from the division of meristematic cells that were stained intensely. The root primordia showed the configuration of a complete root with a fully developed vascular connection before emerging from the stem. The root primordia formation was successful in 'Duke 7', '51 Phy', 'Day' and 'ComCarr'; it occurred in the vascular cambium, where parenchyma cells appeared with dense cytoplasm, prominent nuclei and nucleoli. The first divisions occurred approximately 25 days after the KIBA application. The rooting process was direct, with a slight development of callus on the wound. In 'Velvick' rootstock only parenchymal cells were developed on the wound tissue. The anatomical configuration of the stem of the five rootstocks studied was similar and the presence of a discontinuous phloem fiber ring did not prevent the emergence of root primordia, which emerged from the stem through the regions of parenchyma tissue. The application of 7000 mg·L⁻¹ of KIBA caused a greater formation of adventitious roots.

Keywords: *Persea americana* Mill., clonal propagation, anatomy, root primordia.

2.3. Introducción

El aguacatero (*Persea americana* Mill.) es una especie que antiguas culturas de México y Centroamérica han propagado durante miles de años (Barrientos-Priego & López-López, 2000). En la actualidad su producción se basa en el uso de portainjertos de semilla elegidos de acuerdo a su facilidad de propagación y en muchos casos su valor hortícola no se ha estudiado (Ben-Ya'acov & Michelson, 1995).

Alrededor de 1970, los viveros de California comenzaron la propagación vegetativa de los portainjertos de aguacatero en respuesta a la necesidad de mantener la pureza genética de varias líneas tolerantes a la podredumbre de la raíz causada por *Phytophthora cinnamomi* (Coffey & Guillemet, 1987). Sin embargo, la propagación vegetativa de los portainjertos de aguacatero es muy difícil (Ben-Ya'acov & Michelson, 1995).

La técnica más común para promover el enraizamiento en especies de plantas de difícil enraizamiento es la aplicación exógena de auxinas (Jordan *et al.*, 2010) permitiendo la propagación clonal de muchas especies vegetales (Hartmann *et al.*, 2011). Otra técnica que se ha demostrado incrementa la propagación de especies difíciles de enraizar es la etiolación (Hartmann *et al.*, 2011). Frolich (1951) reportó por primera vez el éxito en el enraizamiento de estacas maduras de aguacate de la raza guatemalteca, las cuales fueron preacondicionadas etiolando su base.

La dificultad del enraizamiento adventicio del aguacatero se ha relacionado con la estructura anatómica del tallo, al asociarse la presencia y configuración de un anillo de esclerénquima perivascular que actúa como una barrera para la emergencia de raíces en tallos jóvenes y provoca un enraizamiento pobre, principalmente en genotipos de la raza antillana (Gómez, 1971). Sin embargo, otros estudios señalan que la raíz se puede desarrollar a través de las células de esclerénquima disperso sin ninguna dificultad (Ernst & Holtzhausen, 1987). Además de la relación entre la presencia de esclerénquima y el enraizamiento, se ha estudiado la formación de callo y también se reportan resultados

contradictorios, al no encontrarse conexión alguna entre la formación del callo y el enraizamiento (Kadman & Ben-Ya'acov, 1965) y al asociarse la presencia de callo en la base de estacas de madera verde con la formación de raíces al ocurrir la diferenciación del tejido vascular dentro del callo (Ernst & Holtzhausen, 1987).

Estos resultados discordantes se han obtenido a partir del estudio de estacas verdes; no obstante, este método nunca llegó a aplicarse para la propagación comercial de portainjertos (Ben-Ya'acov & Michelson, 1995). En la actualidad, la propagación comercial de diferentes portainjertos de aguacatero se realiza acodando brotes tratados con auxinas, el material vegetal de interés se injerta sobre una planta nodriza y al brotar se promueve su etiolación (Ernst *et al.*, 2013).

Este estudio se realizó a nivel macro y microscópico para examinar el desarrollo de raíces adventicias en brotes etiolados de cinco portainjertos de aguacatero en respuesta a la aplicación de sal potásica de ácido indolbutírico (KIBA). Los eventos anatómicos asociados con la inducción y expresión radicales fueron observados para obtener información que permita mejorar los procedimientos o técnicas de propagación clonal. Los objetivos de este estudio fueron: determinar el efecto de la aplicación de KIBA en los sucesos histológicos que condujeron a la formación de raíces en cinco portainjertos de aguacatero; identificar el sitio o sitios de iniciación primordial de las raíces; registrar el progreso de la formación de raíces; y establecer si el anillo de esclerénquima puede interpretarse como una barrera para la iniciación y aparición de raíces adventicias; bajo las hipótesis que el estímulo de la KIBA es necesario para la formación de raíces, la iniciación de los primordios de raíz se origina en el cambium vascular, el patrón de formación de las raíces es directo y el anillo de esclerénquima influye en el enraizamiento.

2.4. Materiales y métodos

2.4.1. Condiciones de propagación y material vegetal

El cultivar Fuerte se empleó como planta nodriza, las semillas se establecieron en el mes de julio de 2015 en contenedores de polietileno negro (30 × 6.5 cm y 1000 mL de capacidad) empleando como sustrato una mezcla de suelo, perlita y composta en una relación 3:1:1 (v/v/v). La evaluación del enraizamiento de brotes etiolados de los portainjertos 'Duke 7', '51 Phy', 'ComCarr', 'Day' y 'Velvick' se efectuó bajo condiciones de invernadero en Chapingo, Estado de México (19°29'25.38" latitud, -98°52'24.74" longitud y 2267 m de altitud) de diciembre de 2015 a abril de 2016, el material vegetal empleado fue provisto por la Fundación Salvador Sánchez Colín CICTAMEX S.C. ubicada en Coatepec Harinas, Estado de México (19° 55' 37.58" latitud, -99° 46' 55.22" longitud y 2140 m de altitud).

2.4.2. Técnica de propagación

Las plantas nodrizas se dejaron crecer hasta que obtuvieron un diámetro promedio de 5.7 mm, después se injertaron lo más cerca posible a la base del tallo mediante injerto de hendidura con varetas de los portainjertos a clonar. Al ocurrir la brotación de las yemas (1.5 a 2 cm de longitud) las plantas se colocaron en una cámara oscura (26 °C con una humedad relativa de 75 a 80 %) para promover la etiolación de los brotes hasta alcanzar una longitud de 20 a 30 cm. En la base de los brotes etiolados se realizó una lesión de aproximadamente 2 cm de longitud empleando una segueta de diente fino para corte manual. Sobre la herida se aplicó una disolución de KIBA con un pincel; las concentraciones aplicadas fueron 0 mg·L⁻¹ (testigo), 5000 mg·L⁻¹ y 7000 mg·L⁻¹, posteriormente se colocó y un microcontenedor de 55 mL de capacidad (Ernst, 1999) y se llenó con polvillo de fibra de coco ligeramente húmedo. Los brotes acodados se colocaron bajo sombra dentro de un invernadero para promover su reverdecimiento.

2.4.3. Estudio anatómico

Se obtuvieron muestras de tejido fresco de tallo (0.5 a 1 cm) de seis brotes de cada portainjerto de aguacatero a los 0, 30 y 60 días después de la aplicación del KIBA y se fijaron en una solución de etanol-ácido acético (J.T. Baker) en una relación 2:1 (v:v). Se deshidrataron usando etanol (J.T. Baker) al 70, 90, 96 y 100 % (2 x 30 min) después de remover la solución fijadora con agua destilada (2 x 15 min). El etanol se sustituyó por medio de una serie de disoluciones de etanol-tolueno (J.T. Baker) 3:1, 1:1, 1:3 (v:v) (1 x 10 min.) y tolueno al 100 % (2 x 10 min.), seguido de la inmersión en parafina-tolueno 7:3, 1:1, 3:7 (v:v) (1 x 30 min.) a 56 °C y parafina *Paraplast*® (McCormick Scientific, USA) (2 x 2 h.). Las secciones de tallo de un espesor de 25 µm, se obtuvieron con un micrótopo de rotación Microm HM 325 (Thermo Scientific, Basingstoke, Reino Unido). Posteriormente se montaron en portaobjetos, se tiñeron con la doble coloración safranina-verde rápido y se fotografiaron utilizando una cámara digital Moticam® 2000 (Motic China Group, Ltd., Causeway Bay, Hong Kong) adaptada a uno de los oculares de un microscopio de fluorescencia Olympus BX53 (Olympus Corporation, Tokio, Japón).

2.5. Resultados y discusión

La siguiente descripción de la anatomía del tallo de aguacatero se basa en secciones transversales de la parte basal de brotes etiolados, antes del tratamiento con KIBA.

El tallo mostró una forma cilíndrica (Figura 1a) con la configuración típica de los tallos dicotiledóneos (Beck, 2010) que consiste, del exterior hacia el interior, de la epidermis, la corteza formada por células isodiamétricas de parénquima, el floema rodeado por grupos de fibras de paredes gruesas separadas por regiones de tejido parenquimático que forman un anillo discontinuo, el cambium vascular, xilema secundario, xilema primario y médula (Figura 1b). El tejido del floema consistió de capas celulares dispuestas en filas irregulares y la región cambial estuvo conformada de una a tres capas de células aplanadas y vacuoladas entre el xilema y el floema (Figura 1c).

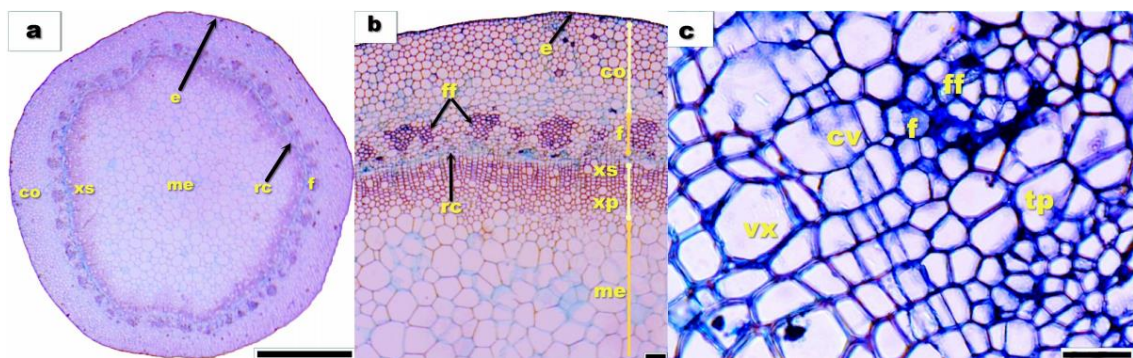


Figura 2. Diferentes posiciones de la misma sección transversal de un tallo etiolado de *Persea americana* Mill. antes del tratamiento con sal potásica de ácido indolbutírico (KIBA). a: sección transversal que muestra la forma cilíndrica del tallo; b: aumento de la sección transversal que muestra la disposición de los tejidos que forman el tallo; c: parte de la sección transversal próxima al cambium vascular. Co: corteza; e: epidermis; f: floema; ff: fibras del floema; cv: cambium vascular; me: médula; rc: región cambial; tp: tejido parenquimático; vx: elemento de vaso de xilema; xp: xilema primario; xs: xilema secundario. Barras de escala: a = 1 mm; b = 100 μm ; c = 25 μm .

La formación de raíces adventicias es una fase obligatoria para la propagación vegetativa de muchas especies hortícolas, este complejo proceso es inducido y regulado por múltiples factores incluyendo fitohormonas, carbohidratos, estado nutricional, reguladores del crecimiento, nivel de compuestos fenólicos, actividad enzimática, sales minerales, luz, temperatura, respuestas asociadas al estrés tales como heridas y características genéticas (Geiss *et al.*, 2009; Pop, Pamfil & Bellini, 2011). Entre estos factores, las auxinas tienen un papel central en la estimulación de la formación de raíces adventicias (Pacurar, Perrone, & Bellini, 2014).

La aplicación de KIBA fue necesaria para promover la formación de raíces adventicias; los tallos etiolados tratados con 5000 y 7000 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de KIBA mostraron un patrón de enraizamiento directo. En la fase de iniciación, los primeros signos de actividad meristemática fueron visibles en células de la región cambial, donde aparecieron células parenquimáticas con citoplasmas densos, núcleos y nucléolos prominentes, que se tiñeron intensamente (Figura 3).

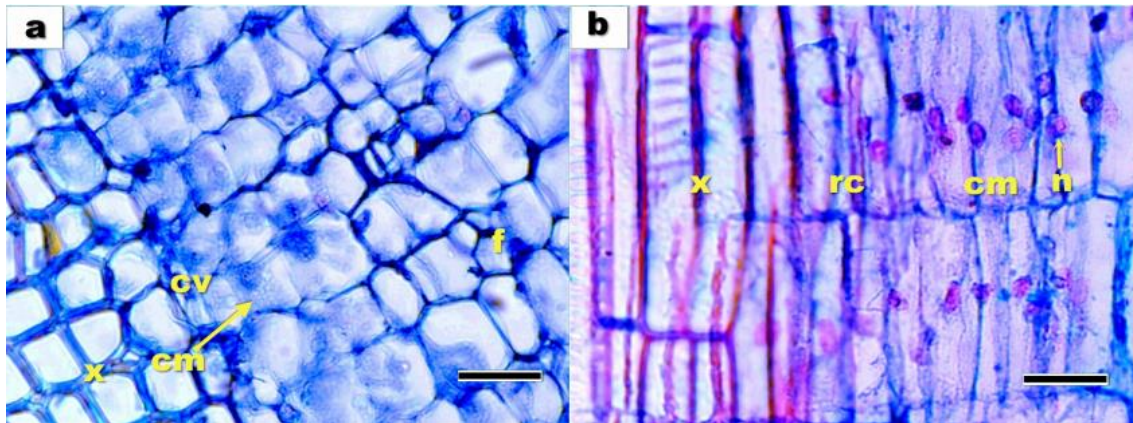


Figura 3. Primeras divisiones celulares durante la formación de raíces adventicias en tallos etiolados de portainjertos de aguacatero tratados con sal potásica de ácido indolbutírico (KIBA). a: Sección transversal que muestra el inicio de las divisiones celulares en la región cambial; b: sección longitudinal del tallo durante la etapa de iniciación. cm: células meristemáticas; cv: cambium vascular; f: floema; n: núcleo celular; rc: región cambial; x: xilema. Barras de escala de 25 µm.

La continuación de la división y crecimiento celular provocaron el agrandamiento de las células de la región cambial (Figura 4a), las células meristemáticas se agruparon dando origen a un meristemoide de raíz (Figura 4b), marcando la transición de la etapa de inducción a la etapa de la formación del primordio de raíz que, en sucesivas divisiones celulares adquirió una organización con forma de domo (Figura 4c) para continuar su crecimiento hacia el floema (Figura 4d); al llegar al tejido parenquimático localizado en el anillo discontinuo de fibras del floema, el primordio creció hacia fuera del tallo al romper las células adyacentes a la cofia forzando su camino entre los paquetes de fibras, desplazándolos lateralmente (Figura 4f).

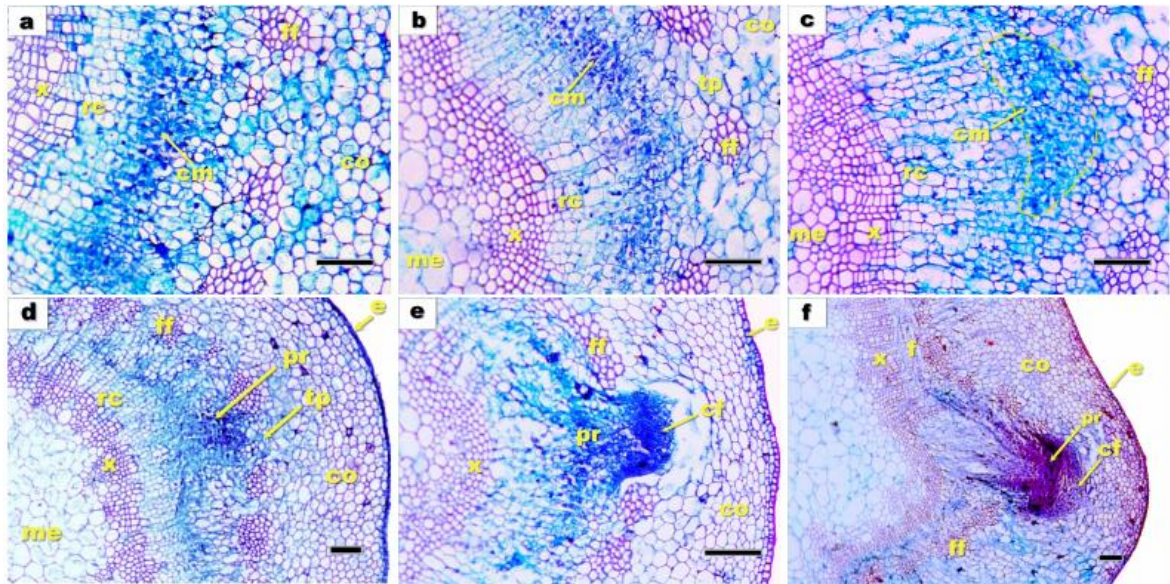


Figura 4. Formación y alargamiento del primordio de raíz adventicia en tallos etiolados de aguacatero. a: etapa temprana de las divisiones celulares en la formación del primordio de raíz; b: agrandamiento de las células adyacentes a la región cambial y formación del meristemoide de raíz; c: primordio con estructura en forma de domo; d: desarrollo del primordio hasta que ha alcanzado las fibras del floema; e: crecimiento del primordio entre dos grupos de fibras del floema, la cofia de la raíz se ha diferenciado en el primordio, marcando la transición hacia la formación de la raíz; f: alargamiento del meristemo de raíz en el tejido parenquimático de la corteza. cf: cofia; cm: células meristemáticas; co: corteza; e: epidermis; f: floema; ff: fibras del floema; me: médula; pr: primordio de raíz; rc: región cambial; tejido parenquimático; x: xilema. Barras de escala de 100 μm .

Al atravesar la corteza, el primordio de raíz ya ha adquirido la configuración de una raíz completa y las conexiones vasculares se han establecido al diferenciarse múltiples elementos de vaso de xilema que se conectan con el xilema del tallo (Figura 5). Al momento que la raíz crece fuera del tallo y rompe la epidermis las conexiones vasculares están completamente formadas, en el momento en que la raíz emerge debe ser funcional (Lovell & White, 1986).

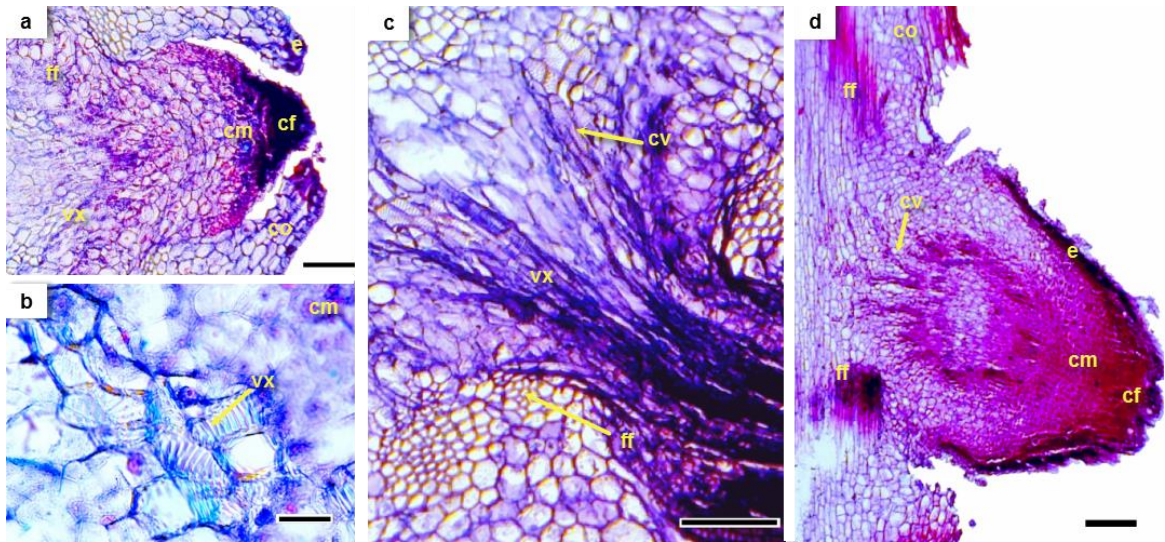


Figura 5. Desarrollo de la conexión vascular en primordios y raíces adventicias de portainjertos clonales de aguacatero. a: sección transversal que muestra un primordio de raíz con cofia diferenciada que atraviesa la corteza del tallo; b: agrandamiento de la región meristemática del primordio donde se aprecia la diferenciación de elementos de vaso de xilema; c: primordio con vasos de xilema alargados que forman la conexión vascular entre la raíz y el tallo; d: sección longitudinal de tallo que muestra una raíz adventicia que ha emergido completamente del tallo. cf: cofia; cm: células meristemáticas; co: corteza; cv: conexión vascular; e: epidermis; ff: fibras del floema; vx: vaso de xilema. Barras de escala: a, c = 100 µm; b = 25 µm; d = 200 µm.

El patrón de enraizamiento directo, evidenció la existencia de células competentes formadoras de raíz que, tras un estímulo inductor comenzaron a dividirse (de Assis *et al.*, 2004). Estudios genéticos recientes indican que la competencia para formar raíces adventicias es un rasgo genético cuantitativo (Geiss *et al.*, 2009).

El desencadenamiento de la división celular que condujo a la formación de raíces adventicias se originó en el cambium vascular, el mismo sitio de inducción se observó durante el enraizamiento de estacas de madera verde tomadas de árboles adultos de 'Fuerte', 'Duke 6' y 'Duke 7' (Ernst & Holtzhausen, 1987) y durante el enraizamiento de microestacas de plántulas del portainjerto 'Topa-Topa' (García-Gómez *et al.*, 1995).

Los cambios anatómicos producidos durante el enraizamiento fueron similares a los encontrados para especies herbáceas como petunia (Ahkami *et al.*, 2009) y leñosas como castaño y roble (Ballester *et al.*, 1999), manzano (Naija, *et al.*, 2008) y cedro (Millán-Orozco *et al.*, 2011).

La formación de los primordios de raíz se observó 30 días después de la aplicación del tratamiento con KIBA; múltiples factores pueden afectar el tiempo requerido para la formación de primordios. En estacas de madera verde de 'Fuerte' los primeros signos de enraizamiento fueron observados entre 60 y 120 días después de su establecimiento (Ernst & Holtzhausen, 1987) y cuando se emplearon microestacas de plántulas del portainjerto 'Topa-Topa' enraizadas *in vitro*, la formación de primordios se observó de 6 a 9 días (García-Gómez *et al.*, 1994) y de 9 a 15 días (García-Gómez *et al.*, 1995) después de su colocación en el medio de enraizamiento, en brotes juveniles del portainjerto 'GvarAm-13' los primordios se observaron 14 días después de su cultivo en el medio de enraizamiento (Vidal, Azcón-Aguilar, Barea, & Pliego-Alfaro, 1992). Es posible que estas diferencias además del genotipo y la técnica de propagación se deban a la edad de las plantas empleadas, puesto que en especies leñosas los brotes juveniles poseen una mayor capacidad de enraizamiento y vigor radicular (Wendling, Trueman & Xavier, 2014) por lo que es común que existan respuestas diferenciales al tratamiento con auxinas dependiendo de la maduración de los tejidos (Pijut *et al.*, 2011; Pacurar *et al.*, 2014).

Los cinco portainjertos estudiados mostraron una anatomía del tallo similar, con un anillo de fibras perivascular discontinuo, sin embargo, la capacidad de formar raíces varió con el genotipo (Figura 6), y la aplicación de KIBA a una concentración de 7000 mg·L⁻¹ estimuló la formación de un mayor número de primordios y raíces, particularmente en 'Duke 7'.

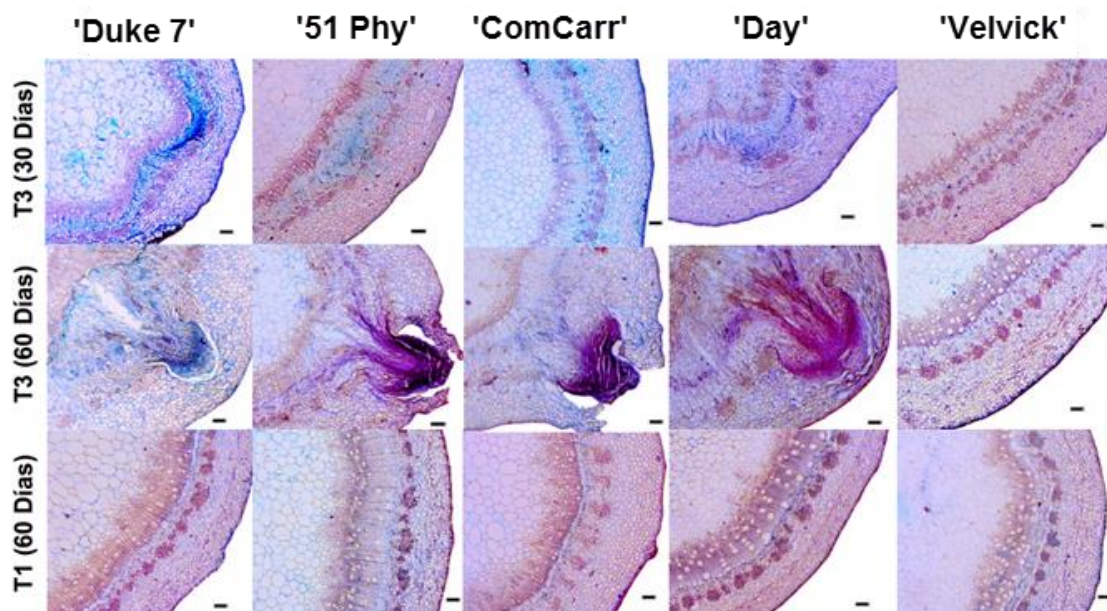


Figura 6. Secciones transversales de brotes etiolados de cinco portainjertos de aguacatero que muestran el inicio de la formación de primordios de raíz 30 días después de la aplicación de $7000 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ de sal potásica de ácido indolbutírico (KIBA), la formación de raíces adventicias y la anatomía de los brotes tratados con $7000 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ y $0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ de KIBA a los 60 días después de la aplicación del tratamiento. T1: aplicación de $0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ de KIBA; T3: aplicación de $7000 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ de KIBA. Barras de escala de $100 \mu\text{m}$.

La presencia del anillo perivascular de fibras discontinuo no constituyó una barrera anatómica para el desarrollo y emergencia de los primordios observados, ya que se desarrollaron a través del tejido parenquimático localizado entre los paquetes de fibras del floema y cuando el primordio de raíz en desarrollo alcanzó algún grupo de fibras cambió su trayectoria de crecimiento para evadir la presencia de las fibras, en ningún caso se observó que la presencia de las fibras del floema detuviera el desarrollo del primordio, solo modificó la dirección de emergencia del mismo (Figura 7).

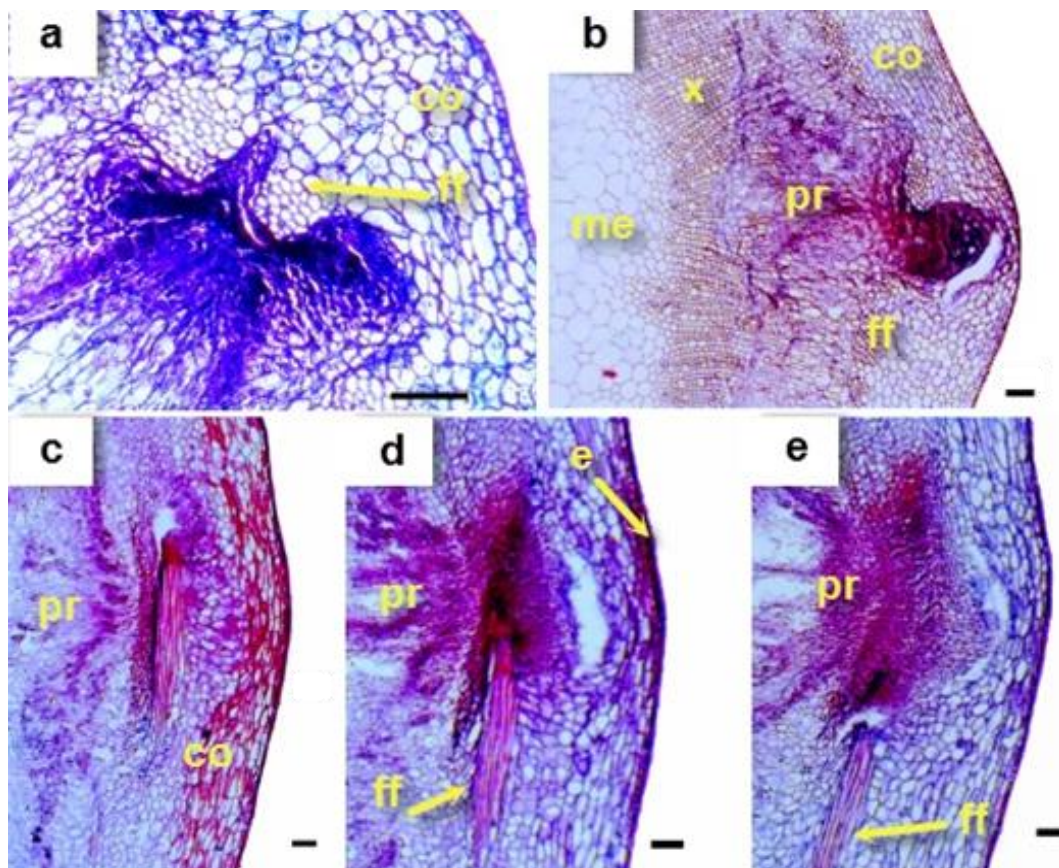


Figura 7. Desarrollo de primordios de raíz de aguacatero ante la presencia de fibras del floema. a: sección transversal de tallo etiolado que muestra el crecimiento de un primordio de raíz que se desarrolla en dirección de dos paquetes de fibras de floema; b: Primordio de raíz desviado por la presencia de fibras del floema; c, d y e: secuencia de secciones longitudinales de tallo que muestra el crecimiento del primordio de raíz por encima de un grupo de fibras de floema. co: corteza; e: epidermis; ff: fibras del floema; me: médula; pr: primordio de raíz; x: xilema. Barras de escala de 100 μ m.

La profundidad de la herida realizada al brote etiolado para aplicar los tratamientos con KIBA fue en promedio de 360 μ m alcanzando células de la corteza y del floema, sin llegar a dañar en la mayoría de los brotes las células del cambium vascular (Figura 8). Como estímulo inductor de la formación de raíces adventicias, la herida no generó respuesta, sin embargo, es posible que la herida y los productos de descomposición las estructuras después del daño celular hayan mejorado el enraizamiento ante la aplicación exógena de auxinas (De Klerk *et al.*, 1999).

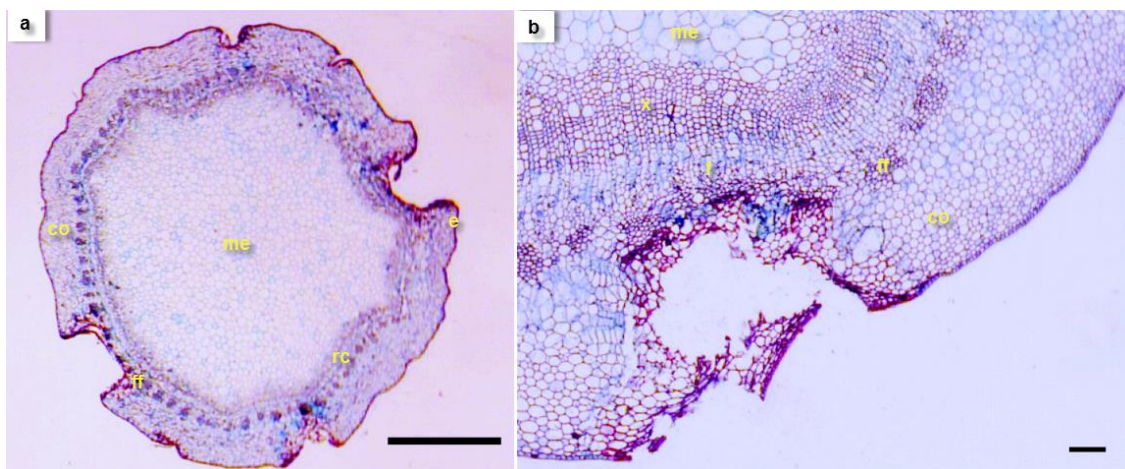


Figura 8. Sección transversal de tallo etiolado de aguacatero que muestra el daño provocado por el lesionado realizado para aplicar el tratamiento con sal potásica de ácido indolbutírico (KIBA). Barras de escala: a = 1 cm; b = 100 μ m.

La mayoría de las auxinas aplicadas actúan en el sitio de la herida, induciendo la dediferenciación celular que conduce a la formación de un nuevo primordio de raíz (Da Costa, De Almeida, Ruedell, Schwambach, Maraschin & Fett-Neto, 2013). La aplicación de KIBA actuó en el sitio de la herida, pero la mayoría de las raíces se formaron en sitios diferentes (Figura 9), indicando que la auxina suministrada fue redistribuida acrobasalmente en el brote etiolado. El transporte de las auxinas es complejo e implica muchas proteínas identificadas (Woodward & Bartel, 2005). En sentido acrobasal, el transporte de la KIBA podría relacionarse con el transporte de carbohidratos que se lleva a cabo a través del floema (Beck, 2010), donde los cotiledones de las plantas nodrizas proveen carbohidratos a los brotes etiolados que al ser expuestos a la luz requieren energía para el crecimiento y desarrollo de las hojas.



Figura 9. Sitios de formación de las raíces adventicias en portainjertos de aguacatero respecto a la localización de la herida realizada para la aplicación de sal potásica de ácido indolbutírico (KIBA). a: primordio de raíz formado próximo al tejido dañado por la herida; b: raíces adventicias formadas en la región de la herida; c: sistema radical acrobasal producido por la aplicación de KIBA. co: corteza; e: epidermis; f: floema; ff: fibras del floema; me: médula; pr: primordio de raíz; x: xilema. Barra de escala de 100 μm .

Al igual que en otras especies leñosas como manzano, castaño (Ballester *et al.*, 1999) y aliso (San José *et al.*, 2012) las raíces adventicias se formaron asincrónicamente; las primeras raíces emergieron aproximadamente 45 días después del tratamiento con KIBA, la aplicación de $7000 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ de KIBA generó un mayor número de raíces en los portainjertos 'Duke 7', '51 Phy' y 'ComCarr' (Figura 10). En 'Day' las primeras raíces comenzaron a emerger del tallo etiolado después de 60 días de la aplicación de KIBA, en este caso, aunque el estímulo inductor de la KIBA condujo a la formación de primordios de raíz es posible que este genotipo requiera una concentración de KIBA superior a $7000 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ para que la determinación de las células que originan los primordios ocurra en menor tiempo, además de esto, el tiempo requerido para que ocurra la determinación puede depender de otros factores como el tipo de auxina utilizada, de la composición celular del tejido, su edad y del genotipo (Altamura, 1996). 'Velvick' fue el único portainjerto en el cual el tratamiento con KIBA no indujo la formación de raíces, y en la mayoría de los brotes de este genotipo se produjo el crecimiento

de callo en el sitio de la herida (Figura 11), este portainjerto principalmente de la raza antillana es muy difícil de enraizar (Whiley & Whiley, 2005).

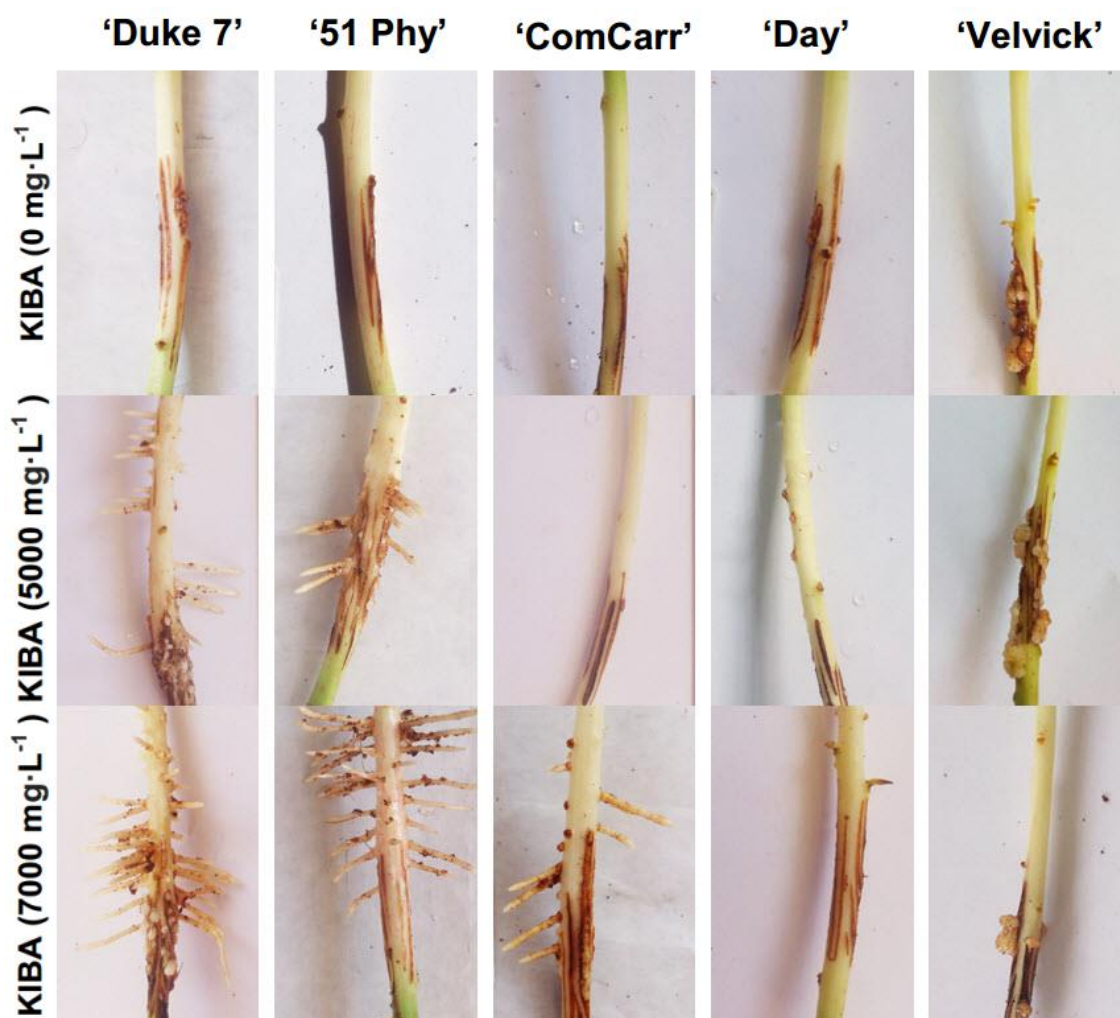


Figura 10. Apariencia macroscópica de la base de los brotes etiolados de cinco portainjertos de aguacatero tratados con 0, 5000 y 7000 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de sal potásica de ácido indolbutírico (KIBA) a los 60 días después de la aplicación del tratamiento.

En respuesta al estrés provocado por las heridas, las plantas pueden generar el crecimiento de masas celulares no organizadas, y la aplicación exógena de auxinas y citoquininas también puede inducir la formación de callos en varias especies vegetales (Ikeuchi, Sugimoto & Iwase, 2013). En 'Velvick', la formación de callo se produjo en el tejido dañado por la herida independientemente del

tratamiento con KIBA, generalmente, una proporción alta auxina/citoquinina promueve la inducción de raíces, una proporción baja induce la generación de brotes y una proporción intermedia favorece la proliferación de callo (Franklin & Dias, 2011), lo cual pudo presentarse para el caso de 'Velvick'.

La formación de callo en 'Velvick' podría estar relacionada con un balance desfavorable de auxina y carbohidratos en las células meristemáticas de la zona de enraizamiento ya que la propagación clonal de 'Velvick' se ha conseguido anillando la base del brote etiolado, sin embargo, no todas las plantas tratadas de esta manera produjeron buenos sistemas radicales (Whiley & Whiley, 2005), lo que indica que otros factores afectan la capacidad de enraizamiento de este portainjerto. La formación de callo en estacas de aguacatero se ha relacionado con la edad de las plantas; en el tejido tomado de plántulas la formación de callo fue reducida mientras que en el tejido obtenido de árboles maduros fue abundante (Young, 1961).

El callo formado en 'Velvick' se originó a partir de la división celular del tejido adyacente a las células dañadas por la herida, que dependiendo de la profundidad de la lesión se inició a partir de la corteza e incluso de xilema (Figura 11). En varias especies de plantas difíciles de enraizar, la iniciación de los primordios de raíz se ha relacionado con la proliferación del callo (Strzelecka, 2007), sin embargo, en el caso de 'Velvick' esta no precedió ni favoreció la formación de raíces.

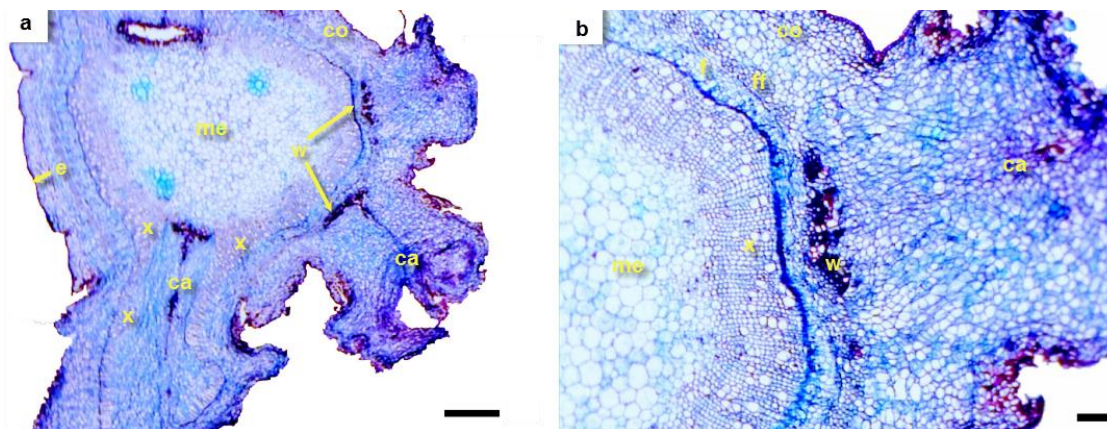


Figura 11. Formación de callo en tallos etiolados y lesionados del portainjerto 'Velvick'. a: Sección transversal de tallo que muestra el desarrollo de callo en los tejidos dañados por la herida realizada para aplicar el tratamiento con sal potásica de ácido indolbutírico; b: aumento de la sección transversal que muestra el desarrollo de tejido parenquimático en la proximidad de las células de la corteza dañadas por la herida. Barras de escala: a 1 mm; b = 100 μ m.

2.6. Conclusiones

La formación de raíces adventicias durante la propagación clonal de cinco portainjertos de aguacatero requirió del estímulo inductor de la KIBA, los meristemoides de raíz se desarrollaron a partir de la división continua de células meristemáticas del cambium vascular. El proceso de formación de las raíces adventicias no se asoció con la formación de callo en el tejido dañado por la herida, la iniciación e inducción de los primeros primordios de raíz ocurrieron alrededor de 25 a 30 días después de la aplicación de KIBA. Los tallos de los cinco portainjertos presentaron un anillo discontinuo de fibras del floema con una configuración similar, sin embargo, este no fue interpretado como una barrera anatómica para la emergencia de la de los primordios de raíz, por lo que se asume que las respuestas diferenciales a la formación de raíces fueron provocadas por variaciones de carácter fisiológico.

2.7. Literatura citada

- Altamura, M. M. (1996). Root histogenesis in herbaceous and woody explants cultured in vitro. A critical review. *Agronomie-Sciences des Productions Vegetales et de l'Environnement*, 16(10), 589-602.
- Barrientos-Priego, A. F., & López-López, L. (2000). Historia y genética del aguacate. Téliz, D. y Mora, A.(Comps.). *El aguacate y su manejo integrado*. 2ª (Ed.) Ediciones Mundi-Prensa. DF México, 22-62.
- Ballester, A., San-José, M. C., Vidal, N., Fernández-Lorenzo, J. L., & Vieitez, A. M. (1999). Anatomical and biochemical events during *in vitro* rooting of microcuttings from juvenile and mature phases of chestnut. *Annals of Botany*, 83(6), 619-629.
- Beck, C. B. (2010). *An introduction to plant structure and development: plant anatomy for the twenty-first century*. Cambridge University Press.
- Ben-Ya'acov, A., & Michelson, E. (1995) Avocado Rootstocks. *Horticultural Reviews*, 17, 381-429.
- Coffey, M. D., & Guillemet, F. B. (1987). Avocado rootstocks. *California Avocado Society Yearbook*, 71, 173-179.
- Da Costa, C. T., De Almeida, M. R., Ruedell, C. M., Schwambach, J., Maraschin, F. D. S., & Fett-Neto, A. G. (2013). When stress and development go hand in hand: main hormonal controls of adventitious rooting in cuttings. *Frontiers in Plant Science*, 4, 133. doi: 10.3389/fpls.2013.00133
- de Assis, T. F., Fett-Neto, A. G., & Alfenas, A. C. (2004). Current techniques and prospects for the clonal propagation of hardwoods with emphasis on *Eucalyptus*. *Plantation Forest Biotechnology for the 21st Century*, 303-333.
- De Klerk, G. J., Van der Krieken, W., & De Jong, J. C. (1999). Review the formation of adventitious roots: new concepts, new possibilities. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 35(3), 189-199. doi: 10.1007/s11627-999-0076-z
- Ernst, A. A., & Holtzhausen, L. C. (1987). Callus development-a possible aid in rooting avocado cuttings. *South African Avocado Growers' Association Yearbook*, 10, 39-41.
- Franklin, G., & Dias, A. C. P. (2011). Chlorogenic acid participates in the regulation of shoot, root and root hair development in *Hypericum perforatum*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 49(8), 835-842.
- Friml, J., & Palme, K. (2002). Polar auxin transport—old questions and new concepts?. In *Auxin Molecular Biology* (pp. 273-284). Springer Netherlands. doi: 10.1023/A

- García-Gómez, M. L., Sánchez-Romero, C., Barceló-Muñoz, A., Heredia, A., & Pliego-Alfaro, F. (1994). Levels of endogenous indole-3-acetic acid and indole-3-acetyl-aspartic acid during adventitious rooting in avocado microcuttings. *Journal of Experimental Botany*, 45(6), 865-870. doi: 10.1093/jxb/45.6.865
- García-Gómez, M. L., Sánchez-Romero, C., Heredia, A., Pliego-Alfaro, F., & Barceló-Muñoz, A. (1995). Peroxidase activity during adventitious root formation in avocado microcuttings. *Canadian Journal of Botany*, 73(10), 1522-1526. doi: 10.1139/b95-164
- Geiss, G., Gutierrez, L., & Bellini, C. (2009). Adventitious root formation: new insights and perspectives. *Annual Plant Reviews: Root Development*, 37, 127-156. doi: 10.1002/9781444310023.ch5
- Gomez, R. E. (1971). Anatomical aspects of avocado stems and their relation to rooting. (Doctoral dissertation, University of Florida, USA)
- Hartmann, H. T., Kester, D. E., Davies, F. T. & Geneve, R. L. (2011). *Plant propagation: principles and practices*. (8^a ed). Ine, New Jersey, USA: Prentice-Hall.
- Ikeuchi, M., Sugimoto, K., & Iwase, A. (2013). Plant callus: mechanisms of induction and repression. *The Plant Cell*, 25(9), 3159-3173.
- Jordan, M., Prehn, D., Gebauer, M., Neumann, J., Parada, G. M., Velozo, J., & San Martín, R. (2010). Adventitious root initiation in adult and juvenile cuttings of *Guindilia trinervis*, an endemic plant of Chile suitable for biodiesel production. *Bosque*, 31(3), 195-201.
- Kadman, A. and Ben-Ya'acov, A. (1965) A review of experiments on some factors influencing the rooting of avocado cuttings. *California Avocado Society Yearbook* 49, 67–72.
- Millán-Orozco, L., Corredoira, E., & San José, M. D. C. (2011). In vitro rhizogenesis: histoanatomy of *Cedrela odorata* (Meliaceae) microcuttings. *Revista de Biología Tropical*, 59(1), 447-453.
- Naija, S., Elloumi, N., Jbir, N., Ammar, S., & Kevers, C. (2008). Anatomical and biochemical changes during adventitious rooting of apple rootstocks MM 106 cultured in vitro. *Comptes Rendus Biologies*, 331(7), 518-525.
- Pacurar, D. I., Perrone, I., & Bellini, C. (2014). Auxin is a central player in the hormone cross-talks that control adventitious rooting. *Physiologia Plantarum*, 151(1), 83-96. doi: 10.1111/ppl.12171
- Pijut, P. M., Woeste, K. E., & Michler, C. H. (2011). Promotion of adventitious root formation of difficult-to-root hardwood tree species. *Horticultural Reviews*, 38, 213—251.
- Pop, T. I., Pamfil, D., & Bellini, C. (2011). Auxin control in the formation of adventitious roots. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 39(1), 307-316. doi: 10.15835/nbha3916101

- Strzelecka, K. (2007). Anatomical structure and adventitious root formation in *Rhododendron ponticum* L. cuttings. *Acta Sci Pol Hortorum Culture*, 6, 15-22.
- Vidal, M. T., Azcón-Aguilar, C., Barea, J. M., & Pliego-Alfaro, F. (1992). Mycorrhizal inoculation enhances growth and development of micropropagated plants of avocado. *HortScience*, 27(7), 785-787. doi: 10.1023/A:1006305716426
- Wendling, I., Trueman, S. J., & Xavier, A. (2014). Maturation and related aspects in clonal forestry—Part I: concepts, regulation and consequences of phase change. *New Forests*, 45(4), 449-471. doi: 10.1007/s11056-014-9421-0
- Woodward, A. W., & Bartel, B. (2005). Auxin: regulation, action, and interaction. *Annals of Botany*, 95(5), 707-735. doi: 10.1093/aob/mci083
- Whiley, A.W. & Whiley, D.G. (2005) Rootstock improvement for the Australian avocado industry – a preliminary report. *New Zealand and Australia Avocado Growers' Conference '05*, Tauranga, New Zealand, 10 p.
- Young, L. B. (1961). Vegetative propagation in avocados by means of marcottage and the rooting of cuttings. *California Avocado Society Yearbook*, 45, 63-66.

3. EL ENRAIZAMIENTO DE BROTES ETIOLADOS DE PORTAINJERTOS DE AGUACATERO NO SE RELACIONA CON LA PRESENCIA DE FIBRAS PERIVASCULARES

3.1. Resumen

Se estudió el enraizamiento adventicio en brotes etiolados de cinco portainjertos de aguacatero, respecto a la proporción de los tejidos que conforman el tallo y su relación con el tamaño de la semilla nodriza sobre la cual se injertaron. Se aplicaron concentraciones de 0, 5000 y 7000 mg·L⁻¹ de sal potásica de ácido indolbutírico (KIBA) sobre una lesión practicada en la base de los brotes de los portainjertos '51 Phy', 'Duke 7', 'Day', 'Velvick' y 'ComCarr' que posteriormente se acodaron empleando polvillo de fibra de coco y un contenedor de 55 mL de capacidad. Los brotes etiolados presentaron una mayor proporción de fibras que los brotes sin etiolar. Las semillas de tamaño pequeño (15.69 a 22.87 g) y mediano (22.91 a 31.11 g) redujeron en 80 y 27.41 %, respectivamente, la supervivencia de los brotes durante el proceso de etiolación. Las semillas grandes (31.11 a 69.87 g) generaron el desarrollo de una mayor proporción de fibras del floema. La aplicación de 7000 mg·L⁻¹ promovió la expansión del floema. El portainjerto 'Duke 7' produjo el mayor número de raíces por brote (8.408) y 'Velvick' fue el único que no enraizó. Se descartó la presencia de fibras del floema como factor relacionado con el enraizamiento de los cinco portainjertos estudiados.

Palabras clave: *Persea americana* Mill., propagación clonal, configuración anatómica, sal potásica de ácido indolbutírico.

THE ROOTING OF ETHIOLATED SHOOTS OF AVOCADO ROOTSTOCKS IS NOT RELATED TO THE PERIVASCULAR FIBER PRESENCE

3.2. Abstract

Adventitious rooting in etiolated shoots of five avocado rootstocks was studied in relation to the proportion of the tissues that form the stem and their relation to the size of the nursery seed on which they were grafted. Concentrations of 0, 5000 and 7000 mg·L⁻¹ of potassium salt of indole-butyric acid (KIBA) were applied to a wound practiced at the base of shoots of '51 Phy', 'Duke 7', 'Day', 'Velvick' and 'ComCarr' avocado rootstocks, which were later layered using coconut fiber dust and a 55 mL container. The etiolated shoots had a higher proportion of fibers than the non-etiolated shoots. Seeds of small (15.69 to 22.87 g) and medium size (31.11 to 69.87 g) reduced the survival of shoots during the etiolation process by 80 and 27.41 %, respectively. Large seeds (31.11 to 69.87 g) generated the development of a greater proportion of phloem fibers. The application of 7000 mg·L⁻¹ promoted phloem expansion. The 'Duke 7' avocado rootstock produced the highest number of roots per shoot (8.408) and the 'Velvick' rootstock was the only one that did not root. The presence of phloem fibers was discarded as a factor related to the rooting of the five avocado rootstocks studied.

Keywords: *Persea americana* Mill., clonal propagation, anatomical configuration, potassium salt of indole-butyric acid.

3.3. Introducción

La propagación asexual de plantas leñosas es un método comercial importante para regenerar grandes cantidades de materiales vegetales genéticamente uniformes (Davies, Lazarte & Joiner, 1982; Koyuncu & Balta, 2004). La propagación vegetativa del aguacatero se inició alrededor de 1970, con la finalidad de lograr uniformidad genética de algunos portainjertos para superar varios problemas del suelo (Ernst, Whiley & Bender, 2013). Sin embargo, es muy difícil propagar los portainjertos de aguacatero de forma vegetativa, especialmente a partir de tallos verdes (Ben-Ya'acov & Michelson, 1995).

Varios autores han indicado la existencia de una correlación entre las características anatómicas de los brotes empleados para propagar las plantas y el enraizamiento adventicio, especialmente la presencia de anillos de esclerénquima situados exteriormente al punto de origen de las raíces adventicias, que constituirían una barrera física para el surgimiento de los primordios radicales (González & Díaz, 1986; Lovell & White, 1986; Mayer, Biasi & Bona, 2006), por tanto, las especies con anillos de fibras discontinuos o ausentes producirían raíces adventicias con facilidad (Hartmann *et al.*, 2011). En plantas de difícil enraizamiento como el aguacatero se ha empleado la etiolación; esta técnica implica la manipulación de una planta a través de la exposición a la oscuridad para detener o revertir el envejecimiento ontogenético (Hartmann *et al.*, 2011), aumentar la concentración y sensibilidad a las auxinas, incrementar la acumulación de almidón (Bassuk *et al.*, 1985) y azúcares solubles totales (Husen, 2008), disminuir la lignificación de los tejidos e inducir cambios anatómicos que podrían incrementar la iniciación de primordios de raíces, principalmente a partir las células parenquimáticas indiferenciadas (Bassuk *et al.*, 1985).

Diferentes investigaciones han mostrado que la etiolación de los brotes injertados sobre un portainjerto temporal proveniente de semilla llamado planta nodriza, es necesaria para conseguir la propagación vegetativa del aguacatero (Frolich & Platt, 1972; Rogel-Castellanos *et al.*, 2000; Ernst *et al.*, 2013). Por tanto, el estudio de las características anatómicas de los brotes etiolados de diferentes

portainjertos es útil para conocer los aspectos anatómicos del tallo relacionados con la formación y desarrollo de raíces adventicias, así como la influencia de la semilla nodriza y la aplicación de auxinas durante el proceso de propagación clonal. Por ello, los objetivos de este estudio fueron: conocer los cambios anatómicos inducidos por la etiolación en diferentes genotipos de aguacatero; determinar el efecto del tamaño de la semilla nodriza en la supervivencia de los brotes durante los procesos de etiolación y formación de raíces adventicias; establecer los aspectos anatómicos modificados por la aplicación de sal potásica de ácido indolbutírico (KIBA) y el tamaño de semilla nodriza en los brotes etiolados de diferentes portainjertos de aguacatero; bajo las hipótesis de que la etiolación reduce la proporción de fibras del floema, floema y xilema en los brotes; las semillas nodrizas de mayor tamaño incrementan la supervivencia de los brotes durante su exposición a la oscuridad y mejoran el enraizamiento de los mismos; y la aplicación de KIBA induce cambios anatómicos que favorecen el enraizamiento de los brotes etiolados.

3.4. Materiales y métodos

3.4.1. Condiciones de propagación y material vegetal

Para la obtención de las plantas nodrizas, se colectaron las semillas de un árbol del cultivar Fuerte y se establecieron en el mes de julio de 2015 en contenedores de polietileno negro (30 × 6.5 cm y 1000 mL de capacidad) empleando como sustrato una mezcla de suelo, perlita y composta en una relación 3:1:1 (v:v:v). La evaluación del enraizamiento de brotes etiolados se efectuó bajo condiciones de invernadero en Chapingo, Estado de México (19° 29' 25.38" latitud, -98° 52' 24.74" longitud y 2267 m de altitud) de diciembre de 2015 a abril de 2016. El material vegetal empleado fue provisto por la Fundación Salvador Sánchez Colín CICTAMEX S.C. ubicada en Coatepec Harinas, Estado de México (19°55'37.58" latitud, -99° 46' 55.22" longitud y 2140 m de altitud).

3.4.2. Diseño experimental

La disposición del experimento fue un diseño factorial de bloques completos al azar generalizado con 45 combinaciones de tratamiento y tres repeticiones. El diseño consistió en tres tamaños de semilla nodriza × cinco genotipos de aguacatero × tres niveles de concentración de sal potásica de ácido indolbutírico (KIBA). Las semillas nodrizas se clasificaron en tres grupos de acuerdo a su peso fresco: el peso fresco promedio de los grupos denominados como chico (15.69 a 22.87 g), mediano (22.91 a 31.11 g) y grande (31.12 a 69.87 g) fue de 16.8, 26.82 y 38.66 g, respectivamente. Los genotipos estudiados fueron '51 Phy', 'Duke 7', 'Day', 'Velvick' y 'ComCarr'. Las concentraciones de KIBA aplicadas fueron 0, 5000 y 7000 mg·L⁻¹ ppm de KIBA. La unidad experimental consistió de un vástago etiolado.

3.4.3. Técnica de propagación

Las plantas nodrizas se dejaron crecer hasta que obtuvieron un diámetro promedio de 5.7 mm, se injertaron lo más cerca posible a la base del tallo mediante injerto de hendidura con varetas de los portainjertos a clonar. Al ocurrir la brotación de las yemas (1.5 a 2 cm de longitud) las plantas se colocaron en una cámara oscura (26 °C con una humedad relativa de 75 a 80 %) para promover la etiolación de los brotes hasta alcanzar una longitud de 20 a 30 cm. En la base de los brotes etiolados se realizó una lesión de aproximadamente 2 cm de longitud empleando una segueta de diente fino para corte manual. Sobre la herida se aplicó una disolución de KIBA con un pincel, posteriormente se colocó un microcontenedor de 55 mL de capacidad (Ernst, 1999) y se llenó con polvillo de fibra de coco ligeramente húmedo. Los brotes acodados se colocaron bajo sombra dentro de un invernadero para promover su reverdecimiento.

3.4.4. Estudio anatómico

Se obtuvieron muestras de tejido fresco de tallo (0.5 a 1 cm) de seis brotes de cada portainjerto de aguacatero a los 0, 30 y 60 días después de la aplicación de la KIBA y se fijaron en una solución de etanol-ácido acético (J.T. Baker) en una

relación 2:1 (v:v). Se deshidrataron usando etanol (J.T. Baker) al 70, 90, 96 y 100 % (2 x 30 min) después de remover la solución fijadora con agua destilada (2 x 15 min). El etanol se sustituyó por medio de una serie de disoluciones de etanol-tolueno (J.T. Baker) 3:1, 1:1, 1:3 (v:v) (1 x 10 min) y tolueno al 100 % (2 x 10 min) seguido de la inmersión en parafina-tolueno 7:3, 1:1, 3:7 (v:v) (1 x 30 min) a 56 °C y parafina Paraplast® (McCormick Scientific, USA) (2 x 2 h). Las secciones de tallo de un espesor de 25 µm, se obtuvieron con un micrótomos de rotación Microm HM 325 (Thermo Scientific, Basingstoke, Reino Unido). Posteriormente, se montaron en portaobjetos, se tiñeron con la doble coloración safranina-verde rápido y se fotografiaron utilizando una cámara digital Moticam® 2000 (Motic China Group, Ltd., Causeway Bay, Hong Kong) adaptada a uno de los oculares de un microscopio de fluorescencia Olympus BX53 (Olympus Corporation, Tokio, Japón).

3.4.5. Toma de datos y análisis estadístico

Un mes después de la injertación de los cinco genotipos de aguacatero sobre las plantas nodrizas se registró el porcentaje de prendimiento por tamaño de semilla y cuando las plantas fueron retiradas de la cámara de etiolación se determinó el porcentaje de supervivencia de las plantas sometidas a etiolación por tamaño de semilla.

De las fotografías digitales de secciones transversales de tallo, se obtuvieron mediciones del diámetro (Dm), grosores de corteza, fibras del floema, floema, xilema y médula empleando el programa Bio7 (Austenfild & Beyschlag, 2012). Para cada valor de las variables mencionadas se promediaron las medidas de cinco fotografías tomando tres mediciones por cada una. A partir de estas medidas se calcularon los valores de las variables proporción de corteza (Pcor), proporción de fibras del floema (Pfib), proporción de floema (Pflo), proporción de fibras de floema y floema (Pfloc), proporción de xilema (Pxil), proporción de médula (Pmed), relación de la proporción xilema/floema (Pxil/Pflo), relación de la proporción xilema/ proporción de fibras de floema y floema (Pxil/Pfloc), relación

de la proporción xilema/fibras del floema (Pxil/Pfib) y relación de la proporción floema/fibras del floema (Pflo/Pfib),

En los brotes cosechados a los 60 días después de la aplicación de KIBA, se evaluaron las variables número de raíces, longitud total de raíces e índice de calidad de enraizamiento. Este último resultó de la multiplicación del número y la longitud total de las raíces (Rogel-Castellanos *et al.*, 2000).

Los datos registrados se sometieron a un análisis de varianza (ANOVA) usando el procedimiento de Modelos Lineales Generales (GML) del software SAS (Statistical Analysis System version 9.1; SAS Institute., 2004). Las medias de los tratamientos se compararon con la prueba de comparaciones múltiples de Tukey ($p \leq 0.05$). Previo al análisis estadístico se empleó el programa JMP (JMP Software, versión 13; SAS Institute Inc.; Sall *et al.*, 2012) para verificar que las variables cumplieran con la hipótesis de normalidad para el análisis de varianza (Lindman, 1992) y en los casos que fue necesario se realizaron las transformaciones pertinentes de las variables con el mismo programa. Además, se realizó un análisis de correlación entre las variables evaluadas con el programa JMP.

El ANOVA, se sometió al siguiente modelo:

$$Y_{ijk} = \mu + S_i + P_j + D_k + SP_{ij} + SD_{ik} + PD_{jk} + SPD_{ijk} + E_{ijk}$$

donde: Y_{ijk} es la variable respuesta del i -ésimo tamaño de semilla nodriza, con el j -ésimo portainjerto de aguacatero, tratado con la k -ésima concentración de KIBA; μ es el promedio general; S_i es el efecto fijo del i -ésimo tamaño de semilla nodriza (Chica, Mediana, Grande); P_j es el efecto fijo del j -ésimo portainjerto de aguacatero ('Duke 7', '51 Phy', 'ComCarr', 'Day' y 'Velvick'); D_k es el efecto fijo de la k -ésima concentración de KIBA (0, 5000 y 7000 mg·L⁻¹); SP_{ij} es la interacción entre el i -ésimo tamaño de semilla nodriza y el j -ésimo portainjerto de aguacatero; SD_{ik} es la interacción entre el i -ésimo tamaño de semilla nodriza y la k -ésima concentración de KIBA; PD_{jk} es la interacción entre el j -ésimo portainjerto de aguacatero y la k -ésima dosis de KIBA; SPD_{ijk} es la interacción

entre el i -ésimo tamaño de semilla nodriza, el j -ésimo portainjerto de aguacatero y la k -ésima concentración de KIBA; E_{ijk} es el error aleatorio correspondiente a la observación Y_{ijk} .

3.5. Resultados y discusión

La supervivencia de las plantas injertadas con varetas de cinco portainjertos de aguacatero durante su exposición a la oscuridad, fue en promedio del 63.45 %, no encontrándose diferencias significativas entre genotipos, sin embargo, las plantas nodrizas provenientes de semillas de tamaño chico y mediano provocaron pérdidas del 80 y 27.41 %, respectivamente; mientras que en las de tamaño grande la mortalidad fue menor al 3 % (Figura 12). La exclusión de la luz en brotes se caracteriza por la generación de tallos estrechos y alargados, sin clorofila. Durante este proceso, los brotes etiolados pasan por una etapa de dependencia de las reservas energéticas almacenadas en la semilla, ya que carecen de competencia fisiológica y fotosintética (Tignor, 2008), por tanto, la cantidad de reservas almacenadas en las semillas chicas y medianas no sería suficiente para aportar la energía que los brotes requieren durante su crecimiento y su empleo como semillas nodrizas debe ser descartado.

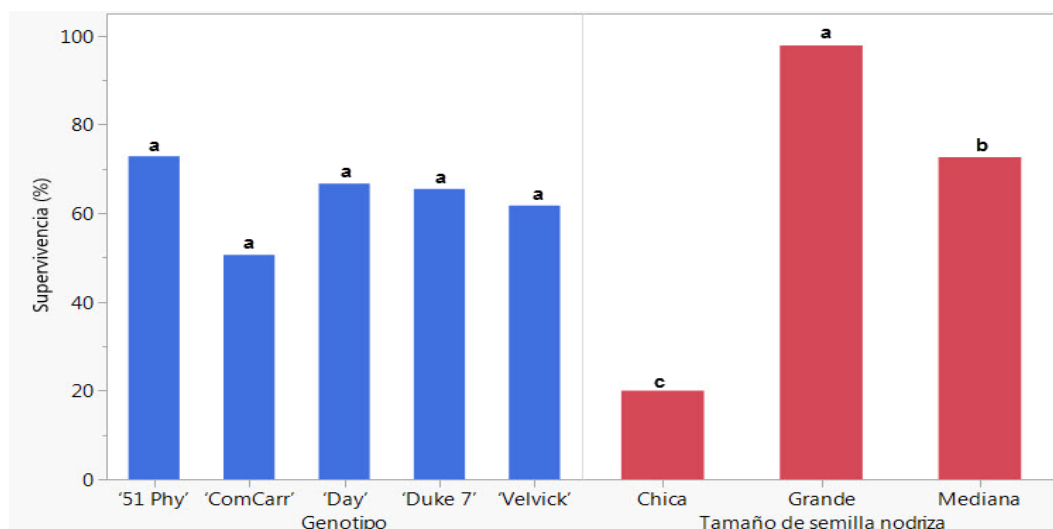


Figura 12. Porcentaje de supervivencia de cinco genotipos de aguacatero injertados en plantas nodrizas de diferente tamaño durante el proceso de etiolación. Letras iguales en las barras, indican la no existencia de diferencias de acuerdo a la prueba de Tukey a una $p \leq 0.05$.

La etiolación indujo cambios significativos en la proporción de los tejidos que conforman el tallo (Cuadro 4). Sólo la proporción de corteza fue similar en tallos etiolados y no etiolados.

Cuadro 4. Medidas anatómicas de los tallos de cinco portainjertos de *Persea americana* Mill. en respuesta a la presencia y ausencia de luz.

Tratamiento	Variable ^z						
	Dm (mm)	PCor (%)	Pfib (%)	PFlo (%)	Pfloc (%)	PXil (%)	PMed (%)
Etiolado	3.11 a	33.24 a	7.47 a	6.07 b	13.59 b	10.18 b	42.49 a
Sin etiolar	4.06 a	33.83 a	6.41 b	11.81 a	18.43 a	24.37a	19.69 b
Sig. ^y	**	ns	*	**	**	**	**

^zDm: diámetro del brote etiolado; Pcor: proporción de corteza; Pfib: proporción de fibras del floema; PFlo: proporción de floema, proporción de fibras de floema y floema (Pfloc); proporción de xilema (PXil), Pmed: proporción de medula ^ySig.: nivel de significancia; *: diferencia significativa a $p \leq 0.05$; **: diferencia significativa a $p \leq 0.01$; ns: diferencia no significativa.

Varios estudios señalan que la presencia de fibras o tejido esclerenquimatoso se correlaciona con la dificultad de formar raíces adventicias y que la etiolación puede reducir la formación de ese tejido, retardar la lignificación y prevenir el cierre del anillo de esclerénquima perivascular (Vieitez,1974; Maynard & Bassuk, 1992; Maynard & Bassuk,1996); sin embargo, la proporción de fibras de floema fue mayor en los brotes etiolados y la discontinuidad del anillo de fibras del floema se mantuvo en brotes verdes y etiolados (Figura 13).

El diámetro del tallo y las proporciones de corteza, floema y médula no presentaron diferencias estadísticas significativas en los brotes etiolados antes de la aplicación de KIBA. Las semillas grandes indujeron un mayor crecimiento de fibras del floema y de xilema (Figura 5) que podría relacionarse con un mayor suministro de carbohidratos por la semilla nodriza.

Cuadro 5. Medidas anatómicas de los tallos etiolados de cinco portainjertos de aguacatero injertados sobre plantas nodrizas provenientes de dos tamaños de semilla antes de la aplicación de sal potásica de ácido indolbutírico (KIBA).

Tratamiento	Variable ^z						
	Dm (cm)	Pcor (%)	Pfib (%)	Pflo (%)	Pfloc (%)	Pxil (%)	Pmed (%)
Semilla (S)							
Mediana	2.9 a ^y	35.1 a	6.3 b	5.6 a	11.9 b	8.9 b	43.6 a
Grande	3.0 a	34.5 a	7.4 a	5.8 a	13.3 a	10.0 a	41.8 a
Portainjerto (P)							
'Duke 7'	3.1 a	33.8 a	7.5 ab	6.0 a	13.6 ab	10.9 ab	41.6 a
'51 Phy'	3.2 a	34.2 a	6.3 b	5.2 a	11.5 b	8.9 ab	44.9 a
'ComCarr'	2.8 a	34.3 a	8.6 a	5.8 a	14.5 a	11.0 a	40.1 a
'Day'	2.7 a	35.4 a	7.0 b	5.2 a	12.3 ab	8.8 b	43.2 a
'Velvick'	2.9 a	35.3 a	6.8 b	6.9 a	13.7 ab	9.9 ab	40.5 a
Sig. ^x							
S	ns	ns	*	ns	*	*	ns
P	ns	ns	**	ns	*	*	ns
S × P	ns	ns	ns	ns	ns	*	ns

^zDm: diámetro del brote etiolado; Pcor: proporción de corteza; Pfib: proporción de fibras del floema; Pflo: proporción de floema, proporción de fibras de floema y floema (Pfloc); proporción de xilema (Pxil), Pmed: proporción de médula. ^yMedias seguidas con la misma letra en cada columna no son diferentes de acuerdo a la prueba de Tukey a una $p \leq 0.05$. ^xSig.: nivel de significancia; *: diferencias significativas a $p \leq 0.05$; **: diferencias significativas a $p \leq 0.01$; ns: diferencias no significativas.

Después de 30 días de la aplicación de KIBA, los brotes desarrollados en plantas nodrizas de semilla grande desarrollaron un tallo más grueso y mantuvieron una mayor proporción de fibras y xilema respecto a las plantas nodrizas de semilla mediana (Cuadro 6).

La aplicación de auxinas o la sobreproducción de las mismas por la planta incrementa la cantidad de los tejidos vasculares (Berleth, Mattsson & Hardtke, 2000); después de 30 días, la aplicación de KIBA favoreció el crecimiento de una mayor proporción de floema y fibras, pero no afectó la proporción de xilema del tallo. Esta respuesta indica que el transporte de KIBA podría relacionarse con el

transporte de carbohidratos (Beck, 2010). Una de las funciones cruciales del floema es transportar carbohidratos a sitios de demanda en la planta (Heo *et al.*, 2014), por tanto, si las reservas de las semillas nodrizas se transportan hacia las hojas de los brotes para promover su desarrollo, durante su transporte a través de la vasculatura del floema la KIBA solo favorecería el desarrollo de una mayor proporción de floema y no de xilema.

Después de 60 días de la aplicación de KIBA, las semillas grandes mantuvieron su efecto en el diámetro del brote y la proporción de fibras del floema; el resto de las variables evaluadas no presentaron diferencias estadísticas entre semillas grandes y medianas (Cuadro 7). ‘Duke 7’ presentó las mayores proporciones de floema y xilema, su extendida proliferación en el floema coincidió con su respuesta al enraizamiento y con la ubicación de los primordios de raíz, de manera similar, durante el enraizamiento adventicio de estacas de *Quercus macrocarpa* y *Q. bicolor* la proliferación del floema coincidió con los sitios de diferenciación de los primordios de raíz (Amissah, Paolillo & Bassuk, 2008).

La iniciación del crecimiento secundario en el tallo se caracteriza por la activación de divisiones celulares en el cambium vascular que producen el xilema secundario hacia adentro y el floema secundario hacia el exterior (Růžicka *et al.*, 2015). Las diferencias en las proporciones de los tejidos vasculares de los portainjertos sugieren que existen diferencias en la actividad cambial de los tallos, sin embargo, múltiples factores como reguladores del crecimiento, azúcares y mecanismos reguladores de la percepción y la defensa contra el estrés oxidativo podrían influenciar la actividad del cambium (Sorce *et al.*, 2013).

Cuadro 6. Medidas anatómicas de los tallos etiolados de cinco portainjertos de aguacatero injertados sobre plantas nodrizas provenientes de dos tamaños de semilla 30 días después de la aplicación de sal potásica de ácido indolbutírico (KIBA).

Tratamiento	Variable ^z						
	Dm (cm)	Pcor (%)	Pfib (%)	Pflo (%)	Pfloc (%)	Pxil (%)	Pmed (%)
Semilla (S)							
Mediana	3.3 b ^y	32.4 a	6.7 b	6.6 a	13.4 a	10.8 b	43.0 a
Grande	3.7 a	31.3 a	7.3 a	6.8 a	14.2 a	11.9 a	42.3 a
Portainjerto (P)							
'Duke 7'	3.6 a	31.1 ab	7.0 ab	8.0 a	15.1 a	13.1 a	40.2 b
'51 Phy'	3.6 a	31.5 ab	6.6 b	6.4 b	13.0 ab	10.3 b	44.8 a
'ComCarr'	3.5 a	33.9 a	7.4 ab	6.5 ab	14.1 b	11.9 ab	40.0 b
'Day'	3.4 a	31.9 ab	7.5 a	6.0 b	13.6 ab	10.9 ab	43.3 ab
'Velvick'	3.4 a	30.3 b	6.7 ab	6.6 ab	13.3 ab	10.9 ab	45.1 a
Dosis de KIBA (D)							
0 mg·L ⁻¹	3.1 b	32.0 a	6.8 b	6.0 b	12.9 b	12.0 a	42.8 a
5000 mg·L ⁻¹	3.8 a	31.4 a	6.8 b	6.5 ab	13.5 b	11.6 a	43.2 a
7000 mg·L ⁻¹	3.6 a	32.1 a	7.5 a	7.5 a	15.2 a	10.5 a	41.8 a
Sig. ^y							
S	**	ns	**	ns	ns	*	ns
P	ns	*	**	*	*	*	**
D	***	ns	*	**	**	ns	ns
S × P	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
S × D	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
P × D	**	**	ns	ns	ns	ns	ns
S × P × D	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns

^zDm: diámetro del brote etiolado; Pcor: proporción de corteza; Pfib: proporción de fibras del floema; Pflo: proporción de floema, proporción de fibras de floema y floema (Pfloc); proporción de xilema (Pxil), Pmed: proporción de médula. ^yMedias seguidas con la misma letra en cada columna no son diferentes de acuerdo a la prueba de Tukey a una $p \leq 0.05$. *Sig.: nivel de significancia; *: diferencias significativas a $p \leq 0.05$; **: diferencias significativas a $p \leq 0.01$; ns: diferencias no significativas.

Cuadro 7. Medidas anatómicas de los tallos etiolados de cinco portainjertos de aguacatero injertados sobre plantas nodrizas provenientes de dos tamaños de semilla 60 días después de la aplicación de sal potásica de ácido indolbutírico (KIBA).

Tratamiento	Variable ^z						
	Dm (cm)	Pcor (%)	Pfib (%)	Pflo (%)	Pfloc (%)	Pxil (%)	Pmed (%)
Semilla (S)							
Mediana	3.5 b	29.2 a	7.0 a	8.2 a	15.4 a	12.4 b	42.2 a
Grande	3.9 a	27.5 b	7.3 a	7.8 a	15.2 a	16.1 a	40.7 a
Portainjerto (P)							
'Duke 7'	3.9 ab	25.9 b	6.9 ab	9.1 a	16.1 ab	14.8 a	42.6 ab
'51 Phy'	4.0 a	27.2 bc	6.7 b	7.2 b	14.2 b	13.6 a	44.4 a
'ComCarr'	3.8 abc	28.9 ab	8.0 a	8.6 ab	16.8 a	15.2 a	38.6 b
'Day'	3.5 bc	29.9 a	7.3 ab	7.8 ab	15.3 ab	14.1 a	40.0 b
'Velvick'	3.3 c	29.4 ab	7.0 ab	7.5 ab	14.6 b	13.6 a	41.6 ab
Dosis de KIBA (D)							
0 mg·L ⁻¹	3.6 a	28.6 a	7.2 a	6.4 b	13.6 b	13.9 a	43.0 a
5000 mg·L ⁻¹	3.8 a	27.7 a	7.1 a	8.6 a	15.9 a	14.6 a	41.0 a
7000 mg·L ⁻¹	3.7 a	28.7 a	7.2 a	8.9 a	16.2 a	14.0 a	40.6 a
Sig. ^y							
S	**	**	ns	ns	ns	***	ns
P	**	**	*	*	*	ns	**
D	ns	ns	ns	***	**	ns	ns
S × P	ns	*	ns	ns	ns	ns	ns
S × D	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
P × D	ns	*	ns	**	*	ns	ns
S × P × D	ns	**	ns	ns	ns	ns	ns

^z Dm: diámetro del brote etiolado; Pcor: proporción de corteza; Pfib: proporción de fibras del floema; Pflo: proporción de floema, proporción de fibras de floema y floema (Pfloc); proporción de xilema (Pxil), Pmed: proporción de médula. ^y Medias seguidas con la misma letra en cada columna no son diferentes de acuerdo a la prueba de Tukey a una $p \leq 0.05$. * Sig.: nivel de significancia; *: diferencias significativas a $p \leq 0.05$; **: diferencias significativas a $p \leq 0.01$; ns: diferencias no significativas.

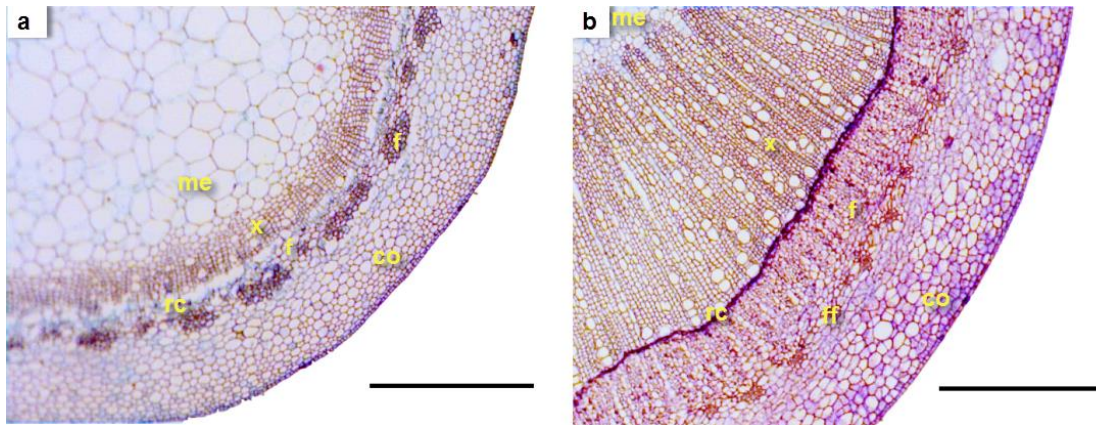


Figura 13. Desarrollo de los tejidos del tallo en brotes de aguacatero. a: sección transversal que muestra la configuración y desarrollo del brote en ausencia de luz; b: sección transversal que muestra la configuración y desarrollo del brote en presencia de luz. co: corteza; f: floema; ff: fibras del floema; me: médula; rc: región cambial; x: xilema. Barras de escala de 0.5 mm.

La relación de las proporciones de xilema/floema, xilema/fibras del floema + floema y xilema/fibras del floema decrecieron con la aplicación de $7000 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ de KIBA durante el proceso de enraizamiento, mientras que la relación de la proporción de floema/fibras no mostró diferencias significativas durante los primeros 30 días, sin embargo, se fue incrementando debido a una proliferación del tejido del floema, esta proliferación del floema se favoreció por la aplicación de KIBA (Figura 14).

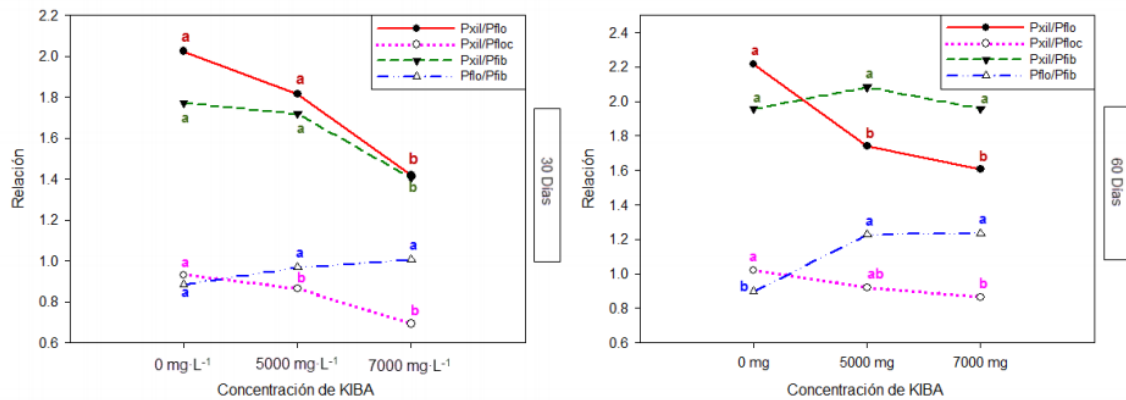


Figura 14. Efecto de la aplicación de sal potásica de ácido indolbutírico (KIBA) en la relación de las proporciones xilema/floema, xilema/fibras del floema + floema, xilema/fibras y floema fibras durante el enraizamiento adventicio de cinco portainjertos de aguacatero. Letras iguales entre puntos, indican la no existencia de diferencias de acuerdo a la prueba de Tukey a una $p \leq 0.05$.

El tamaño de la semilla nodriza no afectó el número de raíces ni la longitud de raíces por brote, tampoco afectó el índice de calidad del enraizamiento de los portainjertos estudiados. La aplicación de KIBA fue necesaria para promover el enraizamiento adventicio, 'Duke 7' mostró mayor facilidad de enraizamiento, mientras que 'Velvick' no enraizó (Figura 15). La respuesta al enraizamiento del '51 Phy', 'Day' y 'ComCar' podría considerarse como intermedia ya que formaron raíces adventicias pero su número y longitud fueron muy reducidos. Es posible que el incremento de la concentración de KIBA pueda conducir a la formación de un número y longitud de raíces mayor que permita mejora la respuesta al enraizamiento de estos portainjertos, sin embargo, se requiere la evaluación de concentraciones mayores para corroborar este planteamiento. Además de la aplicación de auxinas y la etiolación, existen otras técnicas que podrían mejorar el potencial de enraizamiento de estos portainjertos si la respuesta observada se debiera al envejecimiento o madurez de los tejidos vegetales (Hartman *et al.*, 2011; Wendling, Trueman & Xavier, 2014).

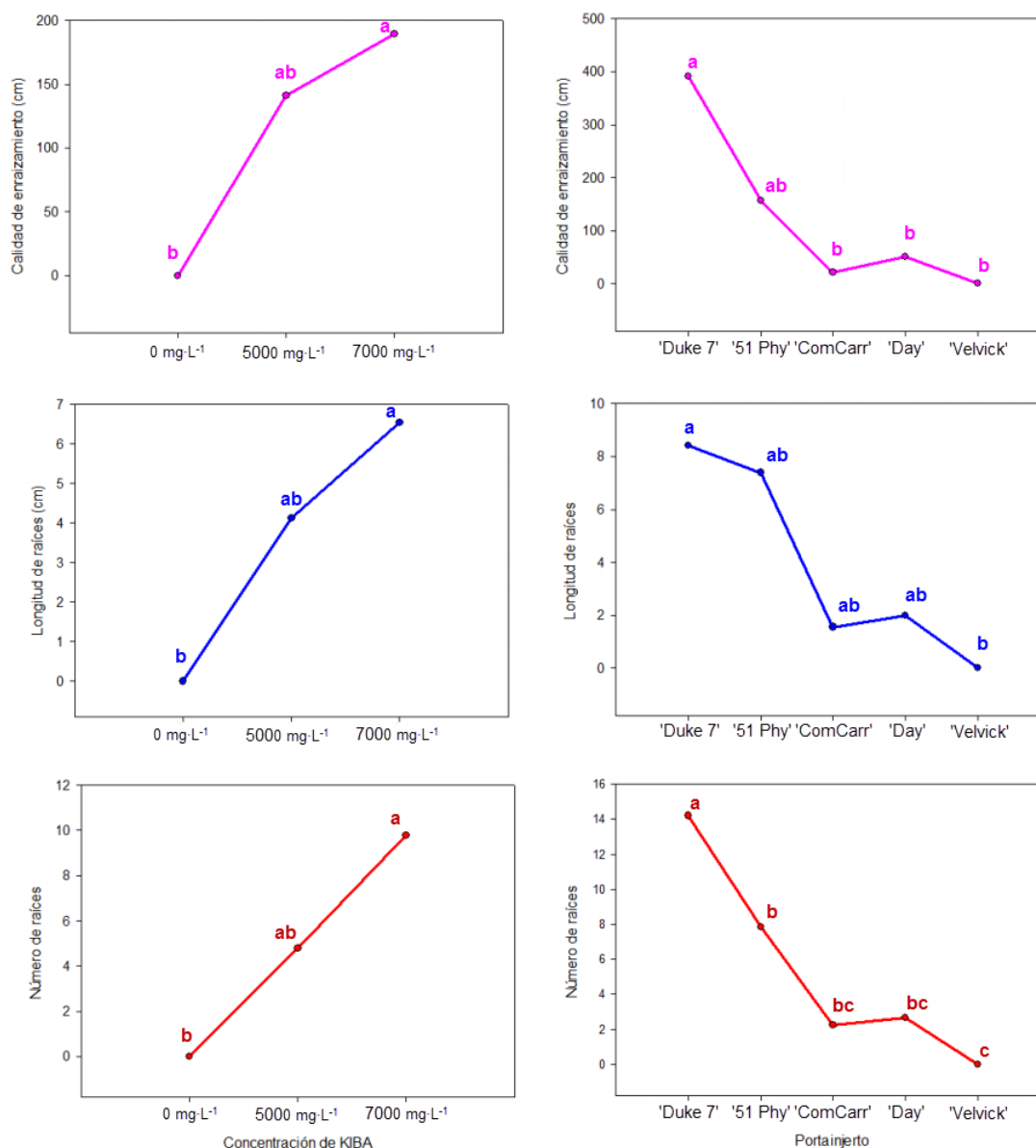


Figura 15. Efecto de la aplicación de sal potásica de ácido indolbutírico (KIBA) en la propagación vegetativa de cinco portainjertos de aguacatero. Letras iguales entre puntos, indican la no existencia de diferencias de acuerdo a la prueba de Tukey a una $p \leq 0.05$.

Las correlaciones entre las proporciones de los tejidos que componen el tallo y las variables número de raíces, longitud de raíces y calidad del enraizamiento fueron significativas estadísticamente para los pares de variables que se presentan a continuación (Cuadro 8). La correlación entre la longitud de raíces y el índice de calidad de enraizamiento ($r = 0.9226$) se atribuye a que la calidad del enraizamiento estuvo integrada por el número de raíces y la longitud de las

mismas, por lo que un aumento en la longitud de las raíces se reflejó en el incremento del índice de calidad del enraizamiento. La correlación entre la proporción de floema y el número de raíces ($r= 0.3567$) se atribuye a la proliferación de las células del floema como resultado del estímulo de la aplicación de KIBA, sin embargo, aunque fue un coeficiente de correlación altamente significativo, su valor es muy bajo, por lo que no se puede considerar como válida (Calzada-Benza, 1970).

Cuadro 8. Coeficientes de correlación de las variables evaluadas en el enraizamiento de brotes etiolados de aguacatero.

Variable ^w	Por variable ^x	Corr. ^y	Sig. ^z	Coeficiente de correlación
				-0.8 -0.6 -0.4 0 0.2 0.4 0.6 0.8
Lr	Cr	0.9226	***	
Pflo	Pfloc	0.8985	***	
Nr	Cr	0.8643	***	
Nr	Lr	0.8582	***	
Pfib	Pfloc	0.3937	**	
Pflo	Nr	0.3567	**	
Pfloc	Nr	0.3053	**	
Pflo	Lr	0.2673	*	
Pfloc	Pxil	0.2513	*	
Pflo	Cr	0.2504	*	
Dm	Pxil	0.2444	*	
Pfloc	Cr	0.2267	*	
Pfloc	Lr	0.2257	*	
Pcor	Nr	-0.2187	*	
Pcor	Lr	-0.2689	*	
Pcor	Cr	-0.2771	*	
Dm	Pcor	-0.2918	**	
Pfib	Pmed	-0.3171	**	
Pcor	Pmed	-0.3852	**	
Pcor	Pxil	-0.4314	***	
Pxil	Pmed	-0.5252	***	
Pflo	Pmed	-0.5417	***	
Pfloc	Pmed	-0.6342	***	

^zSig.: probabilidad de significación; significación a $p \leq 0.05$; **: significación a $p \leq 0.01$; ***: significación a $p \leq 0.001$; ^yCorr: Coeficiente de correlación entre los pares de variables; ^xCr: índice de calidad de enraizamiento, Lr: longitud de raíces promedio por brote, Pfoc: Proporción de fibras del floema y floema, Nr: Número de raíces promedio por brote, Pxil: proporción de xilema; Pcor: proporción de corteza, Pmed: proporción de médula; ^wPfib: proporción de fibras; Dm: diámetro del brote.

Al no encontrarse relación entre la presencia de fibras del floema y el número de raíces se asume que la formación de raíces adventicias en portainjertos de aguacatero es el resultado de la capacidad de los genotipos para formar primordios, por tanto, estaría relacionada con la competencia de los tejidos para responder al estímulo inductor de KIBA más que como resultado de la configuración anatómica del tallo, tal y como lo señalaron Amissah *et al.* (2008) en el caso *Quercus bicolor* y *Q. macrocarpa*.

3.6. Conclusiones

Las semillas nodrizas afectaron directamente la supervivencia de los brotes durante el proceso de etiolación. Semillas con un peso fresco menor a 31 g deben ser descartadas para su uso como nodrizas para evitar la pérdida provocada por la muerte de los brotes en la cámara de etiolación. La etiolación no redujo la proporción de fibras del floema respecto a la proporción de fibras presentes en brotes desarrollados en presencia de luz. La aplicación de KIBA incrementó las proporciones de floema y xilema a los 30 y 60 días, respectivamente, el crecimiento del floema se relacionó con el número y longitud de raíces, así como el índice de calidad del enraizamiento. Se descartó la presencia de fibras del floema que forman un anillo discontinuo como un factor que afecta negativamente el enraizamiento y se atribuyen las respuestas diferenciales en el enraizamiento de los portainjertos a la capacidad del genotipo para responder al estímulo inductor de las auxinas.

3.7. Literatura citada

- Amissah, J. N., Paolillo, D. J., & Bassuk, N. (2008). Adventitious root formation in stem cuttings of *Quercus bicolor* and *Quercus macrocarpa* and its relationship to stem anatomy. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 133(4), 479-486.
- Austenfeld, M., & Beyschlag, W. (2012). A graphical user interface for R in a rich client platform for ecological modeling. *Journal of Statistical Software*, 49(4), 1–19.
- Bassuk, N., Miske, D., & Maynard, B. (1985). Stock plant etiolation for improved rooting of cuttings. *Proceedings of the International Plant Propagator's Society*, 35, 543-550.

- Beck, C. B. (2010). *An introduction to plant structure and development: plant anatomy for the twenty-first century*. Cambridge: Cambridge University Press.
- Ben-Ya'acov, A. and Michelson, E. (1995) Avocado rootstocks. *Horticultural Reviews* 17, 381–429.
- Berleth, T., Mattsson, J., & Hardtke, C. S. (2000). Vascular continuity and auxin signals. *Trends in Plant Science*, 5(9), 387-393. doi:10.1023/A:1010753630573
- Calzada Benza, J. (1970). *Métodos estadísticos para la investigación*. Lima, Perú: Editorial Jurídica.
- Davies, F. T., Lazarte, J. E., & Joiner, J. N. (1982). Initiation and development of roots in juvenile and mature leaf bud cuttings of *Ficus pumila* L. *American Journal of Botany*, 804-811.
- Ernst, A. A. (1999). Micro cloning: a multiple cloning technique for avocados using micro containers. *Revista Chapingo Serie Horticultura*, 5, 217-220.
- Ernst, A. A. Whiley, A. W. & Bender, G. S. (2013). In B. A. Schaffer, B. N. Wolstenholme, & A. W. Whiley (eds.), *The avocado: botany, production and uses* (pp. 234-267). London, United Kingdom: CAB International.
- Frolich, E. F., & Platt, R. G. (1972). Use of the etiolation technique in rooting avocado cuttings. *California Avocado Society Yearbook*, 55, 97-109.
- Gálvez-Cendegui, L., Peñaloza, P., Oyanedel, E., & Castro, M. (2016). Caracterización del tamaño de semilla nodriza de aguacate Esther y el desarrollo de sus plántulas. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 39(1), 79-85.
- González, E., & Díaz, T. (1986). Estaquillas leñosas de fácil enraizamiento: Estudio del Esclerenquima. *Caldasia*, 393-398.
- Hartmann, H. T., Kester, D. E., Davies, F. T. & Geneve. R. L. (2011). *Plant propagation: principles and practices*. (8th ed). Ine, New Jersey, USA: Prentice-Hall.
- Heo, J. O., Roszak, P., Furuta, K. M., & Helariutta, Y. (2014). Phloem development: current knowledge and future perspectives. *American journal of botany*, 101(9), 1393-1402. doi:10.3732/ajb.1400197
- Husen, A. (2008a). Stock-plant etiolation causes drifts in total soluble sugars and anthraquinones, and promotes adventitious root formation in teak (*Tectona grandis* L. f.) coppice shoots. *Plant Growth Regulation*, 54(1), 13-21. doi:10.1007/s10725-007-9222-y
- Koyuncu, F. A. T. M. A., & Balta, F. Í. K. R. Í. (2004). Adventitious root formation in leaf-bud cuttings of tea (*Camellia sinensis* L.). *Pakistan Journal of Botany*, 36(4), 763-768.

- Lindman, H. R. (1992). *Analysis of variance in experimental design*. New York: Springer-Verlag.
- Lovell, P. H., & White, J. (1986). Anatomical changes during adventitious root formation. In *New root formation in plants and cuttings* (pp. 111-140). Dordrecht, The Netherlands: Martinus Nijhoff Publishers.
- Mayer, J. L. S., Biasi, L. A., & Bona, C. (2006). Capacidade de enraizamento de estacas de quatro cultivares de *Vitis* L.(Vitaceae) relacionada com os aspectos anatômicos. *Acta Botânica Brasilica*, 20(3), 563-568. doi:10.1590/S0102-33062006000300006
- Maynard, B. K., & Bassuk, N. L. (1992). Stock plant etiolation, shading, and banding effects on cutting propagation of *Carpinus betulus*. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 117(5), 740-744.
- Maynard, B. K., & Bassuk, N. L. (1996). Effects of stock plant etiolation, shading, banding, and shoot development on histology and cutting propagation of *Carpinus betulus* L. fastigiata. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 121(5), 853-860.
- Rogel-Castellanos, I., Muñoz-Pérez, R. B., & Cruz-Castillo, J. G. (2000). Propagación de aguacatero por acodo utilizando etiolación, ácido indolbutírico, y obstrucción de savia. *Revista Chapingo Serie Horticultura*, 6(1), 101-104.
- Růžicka, K., Ursache, R., Hejátko, J., & Helariutta, Y. (2015). Xylem development—from the cradle to the grave. *New Phytologist*, 207(3), 519-535. doi:10.1111/nph.13383
- SAS Institute Inc. (2004). *SAS/STAT® 9.1 User's Guide*. Cary, NC: SAS Institute Inc.
- Sall, J., Lehman, A., Stephens, M. L., & Creighton, L. (2012). *JMP start statistics: a guide to statistics and data analysis using JMP*. Cary, NC: SAS Institute Inc.
- Sorce, C., Giovannelli, A., Sebastiani, L., & Anfodillo, T. (2013). Hormonal signals involved in the regulation of cambial activity, xylogenesis and vessel patterning in trees. *Plant Cell Reports*, 32(6), 885-898.
- Tesfay, S. Z., Bertling, I., & Bower, J. P. (2010). Anti-oxidant levels in various tissues during the maturation of 'Hass' avocado (*Persea americana* Mill.). *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 85(2), 106-112. doi:10.1080/14620316.2010.11512639
- Tignor, M. E. (2008). Holistic thought process for the design of propagation facilities. In C. A. Beyl, & R. N. Trigiano (eds.), *Plant propagation concepts and laboratory exercises*. Boca Raton, Florida: CRC Press.
- Vieitez, E. (1974). Vegetative propagation of chestnut. *New Zealand Journal of Forestry Science*, 4(2), 242-252.

Whiley, A.W., & Whiley, D.G. (2005) Rootstock improvement for the Australian avocado industry – a preliminary report. *New Zealand and Australia Avocado Growers' Conference '05*, Tauranga, New Zealand, 10 p.