

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA
FACULTAD DE CIENCIAS AGROALIMENTARIAS
ESCUELA DE AGRONOMÍA

Efecto del uso de poliaminas sobre el estrés oxidativo y la producción de fenoles en el establecimiento *in vitro* de aguacate (*Persea americana*) de raza mexicana

Víctor David Villavicencio Mora

TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE PROFESIONAL DE INGENIERO AGRÓNOMO
CON EL GRADO DE LICENCIADO EN AGRONOMÍA

2018

Efecto del uso de poliaminas sobre el estrés oxidativo y la producción de fenoles en el establecimiento *in vitro* de aguacate (*Persea americana*) de raza mexicana

Víctor David Villavicencio Mora

TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE PROFESIONAL DE INGENIERO AGRÓNOMO
CON EL GRADO DE LICENCIADO EN AGRONOMÍA

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA
FACULTAD DE CIENCIAS AGROALIMENTARIAS
ESCUELA DE AGRONOMÍA
2018

Agradecimientos

Primero agradecerle a Dios por brindarme la fortaleza y sabiduría para poder llevar a cabo este trabajo.

A mi madre y, en especial, a mi hermana por todo su apoyo brindado a lo largo de la carrera. Ellas son el combustible que me empuja a ir siempre para adelante y son mi ejemplo de fortaleza y dedicación a seguir.

Al Dr. Víctor Jiménez por su confianza y apoyo incondicional durante la tesis y mi paso por el Laboratorio de Biotecnología. Así como por sus enseñanzas, las cuales me ayudaron de gran manera tanto personal como profesionalmente.

Al Dr. Eric Guevara por el apoyo y orientación durante la tesis y mi paso por el Laboratorio de Biotecnología.

Al M.Sc. Eric Mora y al Dr. Francisco Saborío por el apoyo brindado durante este trabajo y sus valiosos aportes en la revisión de este trabajo.

Al M.Sc. Andrés Hernández y M.Sc. Paúl Solorzano por sus valiosos aportes a la revisión de este trabajo, así como en el desarrollo de la tesis.

A mi segunda familia: Diego, Simón, Dyan, Marcela, Ester, Catalina, Stefanny, María, Andrea, Paula., Andrés y Paúl por toda la ayuda, el trabajo, el apoyo y la amistad que me brindaron a lo largo de estos años.

Efecto del uso de poliaminas sobre el estrés oxidativo y la producción de fenoles en el establecimiento *in vitro* de aguacate (*Persea americana*) de raza mexicana

Víctor David Villavicencio Mora

TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE PROFESIONAL DE INGENIERO AGRÓNOMO
CON EL GRADO DE LICENCIADO EN AGRONOMÍA

Dr. Víctor Jiménez García

DIRECTOR DE TESIS

Dr. Francisco Saborío Pozuelo

MIEMBRO DEL TRIBUNAL

M.Sc. Eric Mora Newcomer

MIEMBRO DEL TRIBUNAL

M.Sc. Andrés Hernández Pridybailo

MIEMBRO DEL TRIBUNAL

Dr. Luis Enrique Gómez Alpízar

DIRECTOR DE ESCUELA

Bach. Víctor Villavicencio Mora

SUSTENTANTE

Índice

1. Resumen	8
2. Introducción	10
3. Antecedentes	12
4. Objetivo General	15
5. Objetivos Específicos	15
6. Metodología	16
7. Resultados	20
7.1 El efecto de las poliaminas sobre el crecimiento y desarrollo (brotación, longitud del brote y número de hojas).	20
Contaminación	20
Brotación	20
Longitud del brote	21
Número de hojas	22
Biomasa	24
7.2 Efecto de las poliaminas sobre la oxidación (porcentaje de oscurecimiento).	26
7.3 Efecto de las poliaminas sobre el contenido de fenoles y malondialdehído en brotes laterales.	28
8. Discusión	30
8.1 El efecto de las poliaminas sobre el crecimiento y desarrollo (brotación, longitud del brote y número de hojas).	30
8.2 Efecto de las poliaminas sobre la oxidación (porcentaje de oscurecimiento).	34
8.3 Efecto de las poliaminas sobre el contenido de fenoles y malondialdehído en brotes laterales.	35
9. Literatura citada	38

Índice de Figuras

Figura 1. Escala de oscurecimiento empleada para medir el porcentaje de oscurecimiento de los brotes laterales de aguacate bajo diferentes concentraciones de poliaminas (Put, Spm, y Espermidina). Escala elaborada por Vargas (2017).	18
Figura 2. Brotación de brotes laterales de aguacate, a los 92 días después de transferido (DDT), bajo diferentes concentraciones de PAs (Put, Spm, y Spd). Los valores señalados con letras desiguales son significativamente diferentes según el análisis de chi-cuadro de Pearson (valor de $p=0.8795$).	21
Figura 3. Distribución de los datos de longitud promedio de brotes laterales de aguacate, a los 92 días de introducido (3 meses), bajo diferentes concentraciones de poliaminas (Put, Spm, y Spd).	22
Figura 4. Número de hojas promedio en brotes laterales de aguacate, a los 68 DDT, bajo diferentes concentraciones de PAs (Put, Spm, y Spd). Los valores señalados con letras desiguales son significativamente diferentes según la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis (valor de $p=0.0467$).	23
Figura 5. Distribución de los datos de número de hojas promedio en brotes laterales de aguacate, a los 92 DDT, bajo diferentes concentraciones de poliaminas (Put, Spm, y espermidina).	23
Figura 6. Área de brotes laterales de aguacate, a los 92 DDT, bajo diferentes concentraciones de poliaminas (Put, Spm, y Spd). Los valores señalados con letras desiguales son significativamente diferentes según la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis (valor de $p= 0.0255$).	24
Figura 7. Dos explantes seleccionados al azar a los 92 DDT por tratamiento. A. Testigo. B. Put 0.5 mM. C. Spm 0.5 mM.	25
Figura 8. Análisis de componentes principales para las variables de longitud, número de hojas y oscurecimiento de brotes laterales de aguacate a los 92 días después de tratamiento.	26
Figura 9. Oscurecimiento de brotes lateral de aguacate, a lo largo de los 92 días de introducido, con diferentes concentraciones de PAs (Put, Spm, y Spd).	27
Figura 10. Distribución del porcentaje de oscurecimiento de brotes laterales de aguacate, a los 92 DDT, bajo diferentes concentraciones de PAs (Put, Spm, y Spd).	27
Figura 11. Contenido de fenoles (mg/g) de brotes laterales de aguacate, a los 92 DDT, bajo diferentes concentraciones de PAs (Put, Spm, y Spd).	28

Figura 12. Contenido de malondialdehído (mmol/mL) de brotes laterales de aguacate, a los 92 días después de tratamiento, bajo diferentes concentraciones de PAs (Put, Spm, y Spd). 29

1. Resumen

El aguacate (*Persea americana*, Lauraceae) es originario de las regiones tropicales y subtropicales de Centroamérica y México. Las principales limitantes para su cultivo se asocian con la carencia de asistencia técnica e investigación, así como un método eficiente de propagación de patrones para injerto. Es por esta razón que se ha optado por el desarrollo de protocolos que permitan la clonación del material para poder mantener las características deseables de un patrón para injerto. Sin embargo, este tipo de protocolos en plantas leñosas presentan limitaciones como altas tasas de contaminación, así como los efectos ocasionados por el estrés oxidativo durante el establecimiento *in vitro*; razón por la cual, el objetivo de este proyecto es conocer el efecto del uso de las poliaminas (PAs) en el establecimiento *in vitro* de brotes laterales de aguacate. Esto debido a que estos reguladores de crecimiento se han reportado que tiene un papel importante en la regulación de procesos de división y proliferación celular, rizogénesis, y senescencia.

El efecto de las PAs Put, Spm, y Spd, a concentraciones de 0.5 y 0.75 mM, se evaluó sobre las siguientes variables: crecimiento y desarrollo de brotes (brotación, longitud del brote, y número de hojas), porcentaje de oscurecimiento, y contenido de fenoles y malondialdehído. La adición de estas concentraciones de PAs, al medio de cultivo, no tuvo un efecto significativo en la brotación, longitud y número de hojas. Diferentes autores han reportado distintos resultados a la hora de evaluar el uso de las PAs en cultivo *in vitro* de otras especies. Mientras que unos autores reportan un efecto de mayor brotación y longitud de los explantes, inclusive utilizando concentraciones menores, otros autores reportan también no haber encontrado un efecto significativo de las PAs como tal.

Efecto similar se obtuvo en el porcentaje de oscurecimiento, ya que no hubo una mejora significativa en la condición de los explantes en comparación con el testigo. Empero, sí se pudo apreciar el efecto de varios subcultivos sobre los explantes, ya que, posterior a varios subcultivos, el porcentaje de oscurecimiento fue incrementando.

En cuanto al contenido de fenoles y malondialdehído (MDA), se esperaba que los tratamientos que visualmente presentaron menor oscurecimiento visual resultaran con

un mayor contenido de fenoles y menor contenido de malondialdehído. Sin embargo, estos tratamientos fueron los que presentaron un mayor contenido, mientras que los tratamientos que presentaron un menor desarrollo y mayor porcentaje de oscurecimiento, presentaron contenidos inclusive menores al testigo.

Durante el desarrollo de la presente investigación, la principal limitante que se presentó fue una gran variabilidad en los resultados dentro y entre cada tratamiento, así como la cantidad de material disponible para la realización del ensayo. Por estas razones, no se logró determinar si la respuesta obtenida por los explantes estaba relacionada a los distintos tratamientos evaluados. No se consiguió concluir sobre un efecto de las PAs sobre las diferentes variables evaluadas (brotación, longitud del brote, número de hojas, porcentaje de oscurecimiento, contenido de fenoles y MDA) en los explantes. Parte de la variabilidad presentada pudo haber estado determinada por la época de recolección de los brotes de los cuales se obtuvieron los explantes. Esto debido a que varios autores han demostrado que la época de recolección sí influye en la respuesta de los explantes. Sin embargo, se apreció de manera visual una respuesta diferente de los explantes a los tratamientos, por lo que se deben evaluar variantes al protocolo evaluado. Por ejemplo, se debe establecer una matriz de concentraciones más específica tomando en consideración el contenido endógeno de PAs; esto con el fin de poder establecer las concentraciones más adecuadas para el cultivo *in vitro* de aguacate. También se considera importante trabajar una PA a la vez, para poder tener más material por tratamiento y reducir la variabilidad de los datos.

2. Introducción

El aguacate (*Persea americana*, Lauraceae) es originario de las regiones tropicales y subtropicales de Centroamérica y México, y sus variedades se agrupan en tres razas: antillana, guatemalteca y mexicana (León, 2000). Esta fruta fue introducida por los españoles, en un principio a las Antillas, luego se extendió a Florida, California y varios países sudamericanos, para luego ser dispersada a varias regiones del mundo (Garbanzo, 2011).

Los principales países productores son México, Perú, Chile, Brasil, República Dominicana y Estados Unidos. De los países mencionados anteriormente, el principal productor mundial es México por delante de Estados Unidos. En cuanto al consumo de esta fruta, los países que generan mayor demanda son Francia, Inglaterra, Bélgica, Suiza, Suecia, Alemania, Japón, Canadá, República Dominicana, México, Guatemala, Honduras, El Salvador, Costa Rica, Brasil, Chile, Colombia, y varios países caribeños (Umaña, 2007; Giacinti, 2002).

En Costa Rica, debido a las condiciones ambientales, las zonas de Los Santos y Frailes se han vuelto la zonas más importantes para el cultivo, ya que favorecen su buen desarrollo y producción. Las principales limitantes para su cultivo se asocian con la carencia de asistencia técnica e investigación (Umaña, 2007). Con el fin de obtener homogeneidad, el aguacate se propaga de forma vegetativa. El método más común para este tipo de propagación es el injerto (Baraona y Sancho, 1991; Bender *et al.* 2011). Sin embargo, el injerto se realiza sobre patrones seleccionados por características como tolerancia a plagas, que son propagados por lo general de forma sexual. Esto conlleva a la heterocigosis del material. El aguacate es una especie de polinización cruzada, lo cual provoca la pérdida de la uniformidad del material (Ben-Ya'acov y Michelson, 1995; Alves *et al.* 1999). Es por esta razón que se ha optado por el desarrollo de protocolos que permitan la clonación del material para poder mantener las características deseables de un patrón para injerto. Ejemplos de ello son, técnicas como el cultivo de tejidos y el doble injerto (etiología del tallo y su posterior acodado) (Salazar *et al.* 2004; Oyadenel, 1995; Dalsaso y Guevara, 1989; Pliego-Alfaro *et al.* 1999; Rodríguez *et al.* 1999).

Al ser una técnica rápida y con altas tasas de multiplicación, el cultivo *in vitro* es una alternativa de mucho interés. Pero, uno de los aspectos difíciles en el cultivo *in vitro* es obtener explantes libres de contaminación, y mitigar los efectos ocasionados por el estrés oxidativo durante el establecimiento *in vitro* (Razdan, 2003). Desde esta perspectiva, las poliaminas (PAs), consideradas como hormonas vegetales, son de gran interés, ya que, afectan el desarrollo, crecimiento, senescencia y respuesta al estrés. Además, se les ha asignado varias funciones: regulación de procesos de división, proliferación celular, desarrollo floral, rizogénesis, senescencia y maduración de frutos (Mendoza y Rocha, 2002).

Como se mencionó anteriormente, las PAs están relacionadas no sólo con desarrollo y crecimiento, sino que también con la respuesta a diferentes tipos de estrés. Es por esta razón que se pretende conocer el efecto del uso de las poliaminas en el establecimiento *in vitro* de brotes laterales de aguacate (*Persea americana*) de raza mexicana, debido a las limitaciones que se han encontrado en el establecimiento *in vitro* de aguacate, como por ejemplo, oscurecimiento del explante, hiperhidricidad, y problemas de desarrollo de los explantes (Dalsaso y Guevara, 1989; Vargas, 2017).

3. Antecedentes

Varios autores (Harty, 1985; Pliego-Alfaro et al. 1999; Rodríguez et al. 1999) concuerdan en que el uso de la biotecnología puede ser de gran utilidad en proyectos de mejora de aguacate. Tal es el caso de la micropropagación *in vitro*, la cual presenta ventajas, como la multiplicación a gran escala de plantas clonales o la vía para la obtención de plantas tolerantes a plagas específicas del cultivo. Dichos autores, con el fin de establecer un protocolo de establecimiento *in vitro*, realizaron distintos ensayos en los cuales experimentaron con diferentes medios de cultivo y tipos de explantes. Por ejemplo, Pliego-Alfaro et al. (1999) utilizaron un medio de cultivo compuesto por las sales descritas por Murashige y Skoog (1962) (medio MS), y como explante utilizaron ápices caulinares. Rodríguez et al. (1999), por su lado, utilizaron dos medios de cultivo, el MS mencionado anteriormente y el medio de cultivo compuesto por las sales descritas por Dixon y Fuller (1976) (medio DF). En este caso, estos autores emplearon embriones inmaduros y maduros como material vegetal. Harty (1985) utilizó el medio MS pero con las concentraciones reducidas a la mitad y ápices como explante. Estos autores tuvieron resultados variados y lograron el establecimiento *in vitro* de aguacate, pero a la hora de la aclimatación, solo un 50% sobrevivían y con un crecimiento muy lento. A su vez, dichos autores reportan la aparición de necrosis en los explantes y síntomas de hiperhidricidad, las cuales afectaban de manera negativa el desarrollo del explante, algo característico de especies leñosas en cultivo *in vitro*.

Las PAs son un grupo de compuestos alifáticos nitrogenados. Éstas pueden unirse y formar complejos con moléculas polianiónicas (proteínas, fosfolípidos, pectinas, ADN y ARN) debido a su carácter policatiónico. Dicha característica hace que las PAs afecten la actividad celular y, por ende, están involucradas en distintos procesos fisiológicos (i.e., crecimiento y desarrollo vegetal y la respuesta contra el estrés biótico y abiótico). Las principales poliaminas son: Put (Put), espermidina (Spd), y Spm (Spm); y se encuentran en todas las células vegetales (Mendoza y Rocha, 2002; Jordan y Caseretto, 2006; Alet *et al.*, 2008).

Anwar *et al.* (2014) analizaron la influencia de las principales PAs en la biosíntesis y señalización de los otros grupos de hormonas vegetales. Los autores

citados anteriormente, encontraron que las PAs están relacionadas con la mayoría de las hormonas que están involucradas en la formación y desarrollo de las plantas (auxinas, giberelinas, citoquininas, etileno), y también están relacionadas con la resistencia o tolerancia a diferentes tipos de estrés (por medio de jasmonatos, ácido salicílico y brasinoesteroides). Si bien no se ha podido establecer la forma en la cual las PAs afectan la biosíntesis de otras hormonas, se sabe que pueden participar de manera complementaria, como por ejemplo, en el desarrollo de la planta o bien en la respuesta ante diferentes tipos de estrés (Mendes *et al.* 2011; Tiburcio *et al.* 2014).

Aleyda *et al.* (2012) proponen que la dinámica metabólica de las PAs tiene un rol importante en la organogénesis de hojas y brotes en *Annona muricata* L. Estos autores encontraron una interacción positiva entre el número de hojas y la presencia de Spm, al igual que entre la longitud y número de brotes en relación con la presencia de Put. A su vez, estos autores concluyen que las PAs funcionan como marcadores morfológicos de desarrollo vegetal, ya que encontraron una mayor concentración de PAs en tejidos con crecimiento activo. Joshi *et al.* (2014) evaluaron el efecto de las PAs sobre la brotación, crecimiento y enraizamiento en el establecimiento *in vitro* de *Wrightia tomentosa*. Estos autores emplearon las tres PAs (Put, Spm, y Spd) por separado a concentraciones de 0.1, 0.5, 1.0 mM, obteniendo una mayor brotación en los explantes con Spd y Spm a 1.0 mM seguido de Spm a 0.5 mM; una mayor longitud del tallo con Spm al 0.5 mM; y una mayor tasa de multiplicación con Spm a 0.5 mM en comparación con el testigo (sin PAs). Por lo anterior, las PAs podrían estar involucradas en la elongación celular y crecimiento de la planta.

A su vez, Karimi y Yadollahi (2012) evaluaron el efecto de la Put (2 y 4 mM) y la compararon con ácido indolbutírico (AIB) (1500 y 3000 mg/L) y un enraizador comercial (Richgro Root Strike 3 g/kg AIB) sobre la formación de raíces, esto en un portainjertos denominado GF677 (melocotón x almendra). Estos autores concluyen que, en comparación con el enraizador comercial y el AIB, la Put tuvo un mayor efecto sobre la formación de raíces; además, acelera no solo el crecimiento, sino que también promueve una elongación en los brotes y tallos.

En cuanto al estrés oxidativo, varios autores han estudiado el rol de las PAs en la tolerancia a diferentes tipos de estrés. Bajos condiciones de estrés, en las plantas, se activan reacciones metabólicas que producen especies de oxígeno reactivo (ROS por sus siglas en inglés) (Dewir *et al.* 2006). La producción de ROS en las plantas puede ocasionar daños en carbohidratos, lípidos y proteínas que se traducen en muerte celular. Para combatir los efectos de las ROS, las plantas poseen diferentes mecanismos; uno de ellos es la producción de enzimas antioxidantes, como por ejemplo la peroxidasa, o la producción de metabolitos secundarios como los fenoles (Sen y Alikamanoglu, 2013). Grace (2005) documentó varios estudios realizados donde se demuestra una relación entre el contenido de fenoles y el estrés oxidativo. Otro indicador de estrés oxidativo es el malondialdehído (MDA). Este es un producto resultante de la peroxidación lipídica inducida por la presencia de las ROS (Davey *et al.* 2005). Minocha *et al.* (2014) establecen que por décadas se ha intentado estudiar este efecto de las PAs sobre el estrés en plantas, pero con el inconveniente de que estas moléculas se encuentran en casi todos los tejidos de la planta y, además, en grandes cantidades, a diferencia de las otras hormonas vegetales, lo que ha hecho más difícil su comprensión. Estos autores identifican varias funciones o roles de las PAs en la tolerancia a diferentes tipos de estrés. Por ejemplo, mencionan que las PAs son secuestradores de los ROS, y que promueven la producción de enzimas y metabolitos antioxidantes. Además, las PAs funcionan como moléculas de señalización en la respuesta a estrés por parte de otros reguladores de crecimiento. Tabart *et al.* (2015) evaluaron el efecto de las poliaminas a concentraciones de 0,0001 mM a 1 mM sobre la hiperhidricidad en explantes de manzana *in vitro*, y reportaron que los tratamientos entre 0.01 y 1 mM redujeron el porcentaje de hiperhidricidad en los explantes en un 50%; además, el contenido de fenoles se redujo. Por ende, las PAs podrían estar relacionadas con las respuestas de las plantas ante condiciones de estrés.

4. Objetivo General

Determinar el efecto del uso de las poliaminas en el establecimiento *in vitro* de brotes laterales de aguacate (*Persea americana*) de raza mexicana.

5. Objetivos Específicos

1. Evaluar el efecto de las poliaminas sobre el crecimiento y desarrollo (número de hojas y longitud del brote) de brotes laterales de aguacate (*Persea americana*) de raza mexicana establecidos bajo condiciones *in vitro*.
2. Evaluar el efecto de las poliaminas sobre la oxidación (porcentaje de oscurecimiento) de brotes laterales de aguacate (*Persea americana*) de raza mexicana establecidos bajo condiciones *in vitro*.
3. Evaluar el efecto de las poliaminas sobre el contenido de fenoles y malondialdehído en brotes laterales de aguacate (*Persea americana*) de raza mexicana establecidos en condiciones *in vitro*.

6. Metodología

Los experimentos se llevaron a cabo en las instalaciones del Centro para Investigaciones en Granos y Semillas (CIGRAS), específicamente en el Laboratorio de Biotecnología, ubicado en la Universidad de Costa Rica. En las pruebas se evaluó el efecto de tres PAs (Put, Spd, Spm) a tres concentraciones (0; 0,5; 0,75 mM) sobre el establecimiento in vitro de microestacas de aguacate de los cultivares Barr Duke y Duke 7. Las microestacas utilizadas provenían de ramas jóvenes de árboles adultos mantenidos en condiciones de invernadero en el CIGRAS en San Pedro de Montes de Oca. En el invernadero se les aplicó fungicida Cafesa Benomil 50 WP® (2 g/L), y bactericida Pfizer Agri-mycin 16,5 WP® (2 g/L) de forma semanal. Además, se utilizó el fertilizante granular Abonos Superior Rosafert® (12-12-17) y foliar Atlántica Fitomare-Bio (5 ml/L) para mantener una buena nutrición y desarrollo de los árboles. Los árboles fueron proveídos por la Cooperativa de Productores Agrícolas y Servicios Múltiples de la Zona de Los Santos R.L. (APACOOOP R.L.), provenientes de un vivero que se encuentra en Santa Cruz de León Cortes.

Para la introducción in vitro, se cortaron las microestacas de dos centímetros de largo, provenientes de ramas jóvenes de árboles adultos ubicados en el invernadero, y fueron sometidas a un proceso de desinfección. Dicho proceso constó de un lavado inicial de las microestacas con jabón antibacterial, con la ayuda de un cepillo. Posterior al enjuague, las microestacas se sometieron a una inmersión en una solución de Agri-mycin 16,5 WP® (2 mg/L Pfizer) y de Benomil 50 WP® (2 mg/L Cafesa) por 45 minutos en un agitador orbital (120 rpm). Seguidamente, se transfirieron a una solución de hipoclorito de sodio al 1%, a la cual se le adicionó detergente Croda International PLC Tween® 20 (2 gotas/100 ml de solución), y se mantuvieron durante 15 minutos en un agitador orbital (120 rpm). Posteriormente, fueron llevadas a la cámara de flujo laminar donde se les realizó tres lavados con agua destilada autoclavada. Por último, se cortaron las microestacas y se sumergieron en una solución estéril del antioxidante polivinilpirrolidona (PVP-40, 111.14 g/mol PhytoTechnology Laboratories) al 0,7% y sacarosa al 2% p/v (Coopevictoria, Costa Rica) por 45 minutos para posteriormente ser colocadas en el medio de cultivo respectivo.

Para el establecimiento *in vitro*, se utilizó medio de cultivo doble fase compuesto por las sales minerales descritas por Lloyd y Mc Cown (1980), suplementado con las siguientes vitaminas: ácido nicotínico (0,5 mg/L), myo-inositol (100 mg/L), piridoxina (0,5 mg/L), tiamina (0,1 mg/L); y glicina (2 mg/L). Además, se le adicionó al medio de cultivo el regulador de crecimiento 6-bencilaminopurina (BAP) (13,3 μ M) y sacarosa al 3% p/v (Coopevictoria, Costa Rica). Las PAs empleadas fueron las manufacturadas por PhytoTechnology Laboratories, USA. Estas fueron agregadas filtradas al medio final, luego de que este fuera autoclavado. Se evaluaron tres concentraciones (0; 0,5; 0,75 mM) de PAs (Put, Spd, Spm), obteniendo así dos tratamientos por poliamina para un total de siete tratamientos con 20 repeticiones cada uno. Cada repetición consistió de un frasco de 55 X 90 mm, con 25 ml de medio de cultivo en fase sólida y 2 ml de medio de cultivo en fase líquida, y una microestaca. El experimento se desarrolló en un cuarto de crecimiento a $21^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ y un fotoperiodo de 12 horas mediante luces LED, a una intensidad lumínica de $50 \pm 2 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y una humedad relativa del 72 %. Cada tratamiento fue transferido a un medio de cultivo fresco, idéntico al mencionado anteriormente, cada mes durante los tres meses de evaluación.

Se evaluó la longitud del brote axilar, porcentaje de brotación, porcentaje de contaminación, porcentaje de oscurecimiento de forma semanal durante los tres meses de evaluación. La longitud del brote axilar desarrollado se midió en cm con una regla. El porcentaje de oscurecimiento de los explantes se determinó con base en la escala descrita en la Figura 1. Los porcentajes de contaminación, brotación y formación de callo se determinaron con el número de explantes contaminados, brotados o con presencia de callo en relación al total de explantes.

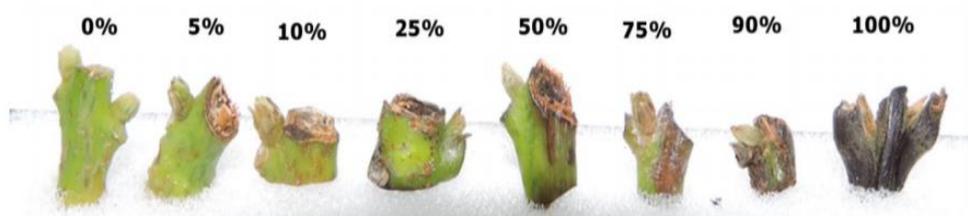


Figura 1. Escala de oscurecimiento empleada para medir el porcentaje de oscurecimiento de los brotes laterales de aguacate bajo diferentes concentraciones de poliaminas (Put, Spm, y Espermidina). Escala elaborada por Vargas (2017).

El contenido de fenoles se determinó mediante pruebas espectrofotométricas (MDA y Folin-Ciocalteu (F-C)). El contenido de MDA se midió mediante el procedimiento empleado por Gharibi et al. (2015). Para ello se tomó una muestra de tejido fresco (1 g), la cual fue macerada, con 5 ml de ácido 2-tiobarbitúrico (TBA) en 10% de ácido tricloroacético (TCA), utilizando un mortero y pistilo. Dicha muestra fue incubada por 15 minutos a 100°C. Posteriormente, fue centrifugada a 5000 rpm/min (Centrífuga Eppendorf 5415 R, con un rotor de 24 posiciones) por 10 minutos. La absorbancia se midió a 450, 532, y 600 nm en el espectrofotómetro Thermo Scientific Multiskan GO. De manera complementaria, se empleó el protocolo de Folin-Ciocalteu (F-C) elaborado por Ainsworth y Gillespie (2007), que consiste en tomar una muestra de tejido vegetal (20 mg aproximadamente), congelarla con nitrógeno líquido y luego liofilizarla. Posteriormente, la muestra se homogenizó con metanol al 95% v/v utilizando un mortero y un pistilo. Después, fue incubada a temperatura ambiente por un periodo de 48 horas en oscuridad, luego fue centrifugada a 13000 rpm/min (Centrífuga Eppendorf 5415 R, con un rotor de 24 posiciones) por 5 minutos. El sobrenadante se transfirió a un tubo Eppendorf de 2 ml donde se le adicionó 200 µL del reactivo F-C al 10% v/v. Luego se adicionó 800 µL de Na₂CO₃ (700 mM) y se incubó a temperatura ambiente por un periodo de 2 horas. Finalmente, se midió la absorbancia a 765 nm en el espectrofotómetro Thermo Scientific Multiskan GO. El contenido de fenoles y MDA se determinó a los tres meses de evaluación, así como las muestras seleccionadas al inicio de la introducción, las cuales se liofilizaron con el fin de analizar el estado de las plantas madre de las cuales se obtuvieron los explantes.

El diseño experimental utilizado fue un irrestricto al azar, compuesto por 20 repeticiones de la unidad experimental (frasco con un solo explante) por tratamiento. Las variables a evaluar fueron: número de hojas, longitud de los brotes, porcentaje de brotación, porcentaje de oscurecimiento, contenido de fenoles y malondialdehído.

En cuanto al análisis estadístico, las variables continuas (longitud de brotes, número de hojas, porcentaje de oscurecimiento, contenido de fenoles y malondialdehído) se analizaron mediante un análisis de varianza (ANDEVA) y la prueba de Tukey con un nivel de significancia de 0,05. Por su parte las variables discretas (brotación) se analizaron mediante una prueba de chi cuadrado. Para dicho análisis estadístico se emplearon los softwares Infostat y RStudio.

7. Resultados

7.1 El efecto de las poliaminas sobre el crecimiento y desarrollo (brotación, longitud del brote y número de hojas).

Con el fin de evaluar el efecto de las poliaminas sobre el crecimiento y desarrollo de brotes laterales de aguacate, los explantes fueron evaluados cada ocho días por el transcurso de tres meses. Las variables que se establecieron para ello fueron brotación, longitud del brote, y número de hojas.

Contaminación

A lo largo de los experimentos hubo una afectación por diferentes agentes de contaminación; como por ejemplo, hongos y bacteria. Al mes de iniciado los experimentos se obtuvo 36% de contaminación, que alcanzó 51% luego de dos meses de evaluación. Sin embargo, durante el último mes de evaluación la incidencia de contaminación sólo aumentó 1%, concluyendo el experimento con 48% de explantes libres de contaminación.

El agente contaminante que tuvo mayor incidencia en el porcentaje de contaminación fueron bacterias. Estas colonizaban el medio de cultivo, pero no parecía que afectara el estado del explante. Su presencia se evidenciaba como un exudado del explante, por lo que se formuló la hipótesis de que estas bacterias podían ser endófitas y residían en los explantes.

Brotación

Se estudió el efecto de las diferentes concentraciones de poliaminas sobre la brotación de las yemas axilares de aguacate para así determinar cuál tratamiento presentaba una mayor brotación en comparación con el testigo. La mayor respuesta por parte de los brotes se empezó a dar a los 23 días de establecido el experimento, con un porcentaje de brotación general de 22%, posteriormente un 67% a los 45 días y finalmente a los 92 días de evaluación un 71% de brotación.

Si bien se observó diferentes porcentajes de brotación entre los tratamientos, esta respuesta no se puede atribuir a un efecto del tratamiento como tal, ya que a la hora de realizar el análisis estadístico no se presentaron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los tratamientos evaluados (valor de $p = 0.8795$) (Figura 2).

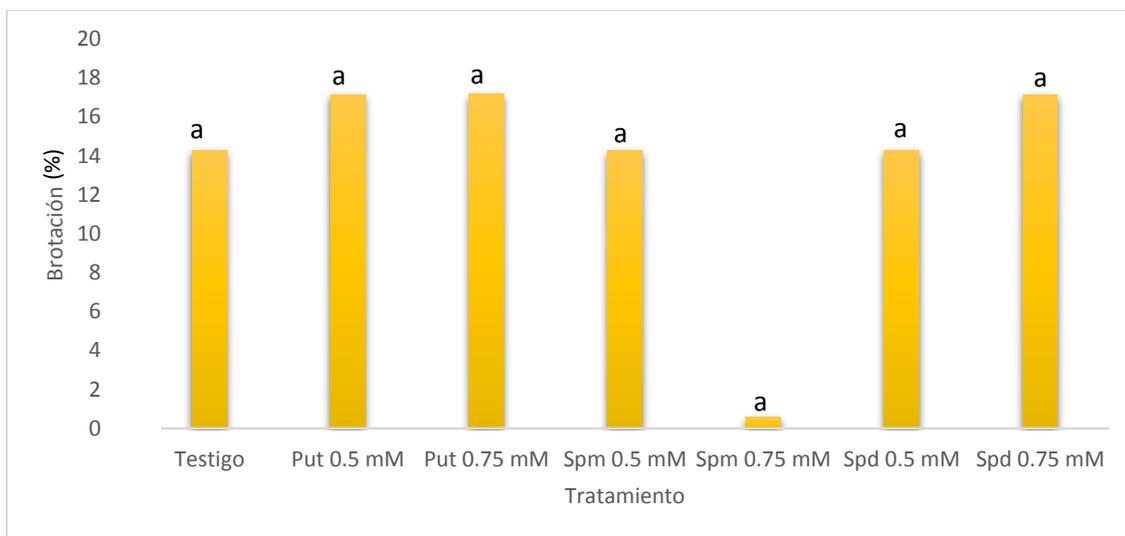


Figura 2. Brotación de brotes laterales de aguacate, a los 92 días después de transferido (DDT), bajo diferentes concentraciones de PAs (Put, Spm, y Spd). Los valores señalados con letras desiguales son significativamente diferentes según el análisis de chi-cuadro de Pearson (valor de $p=0.8795$).

Longitud del brote

En la figura 3 se puede apreciar un comportamiento variable de los datos. Mientras que el testigo presentó una distribución normal de los datos, en tratamientos como Put 0.75 mM y Spm 0.5 mM los datos se distribuyeron solamente en el cuartil superior, y en el tratamiento Spd 0.75 mM se presentó la mayor concentración de datos en el cuartil inferior. Este resultado está ligado a la gran variabilidad que se presentó a lo largo del ensayo. Por ejemplo, testigo y tratamientos con Spm 0.5 mM y Spd 0.75 mM presentaron los mayores coeficientes de variación: 49.31%, 51.3%, y 63.14%, respectivamente (Cuadro 1).

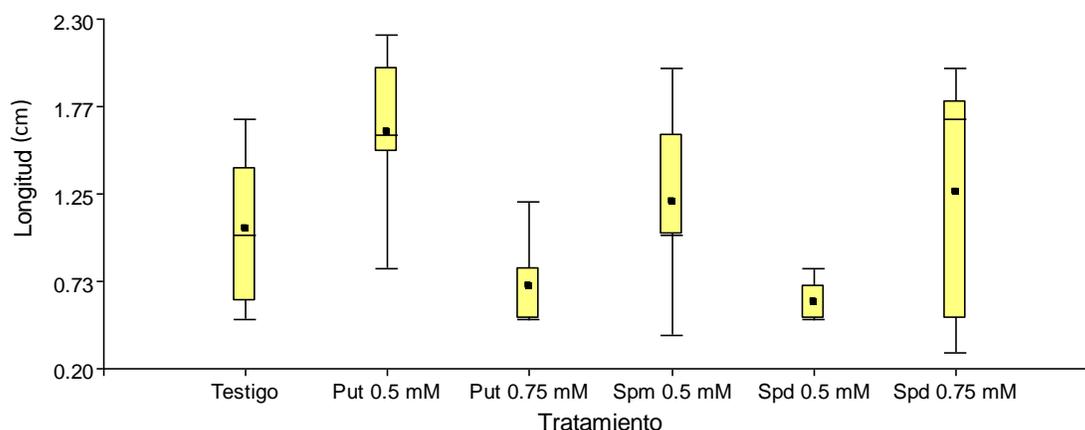


Figura 3. Distribución de los datos de longitud promedio de brotes laterales de aguacate, a los 92 días de introducido (3 meses), bajo diferentes concentraciones de poliaminas (Put, Spm, y Spd).

Cuadro 1. Coeficiente de variación (%) por tratamiento a los 92 días de evaluación

Tratamiento	Coeficiente de variación (%)
Testigo	49.31
Put 0.5 mM	33.36
Put 0.75 mM	44.03
Spm 0.5 mM	51.37
Spd 0.5 mM	23.57
Spd 0.75 mM	63.14

En la evaluación final (92 días después de tratamiento), no se vio un efecto significativo ($P < 0.05$) en los tratamientos con PAs sobre la longitud promedio de los explantes, lo que implica que las diferencias observadas no se puede atribuir a un efecto de los tratamientos como tal ($p = 0.1275$).

Número de hojas

El desarrollo y formación de hojas se comenzó a observar hasta la evaluación a los 30 días. Cotejando el comportamiento del tratamiento testigo versus los demás tratamientos a los 68 días de evaluación, se observó un mayor número de hojas en los tratamientos Put 0.5 mM, Spd 0.75 mM, Spm 0.5 mM. Entretanto, en los tratamientos Put 0.75 mM y Spd 0.5 mM no se apreció formación de hojas, sino que el desarrollo y formación de hojas fue observado sólo después de 68 días de cultivo (Figura 4).

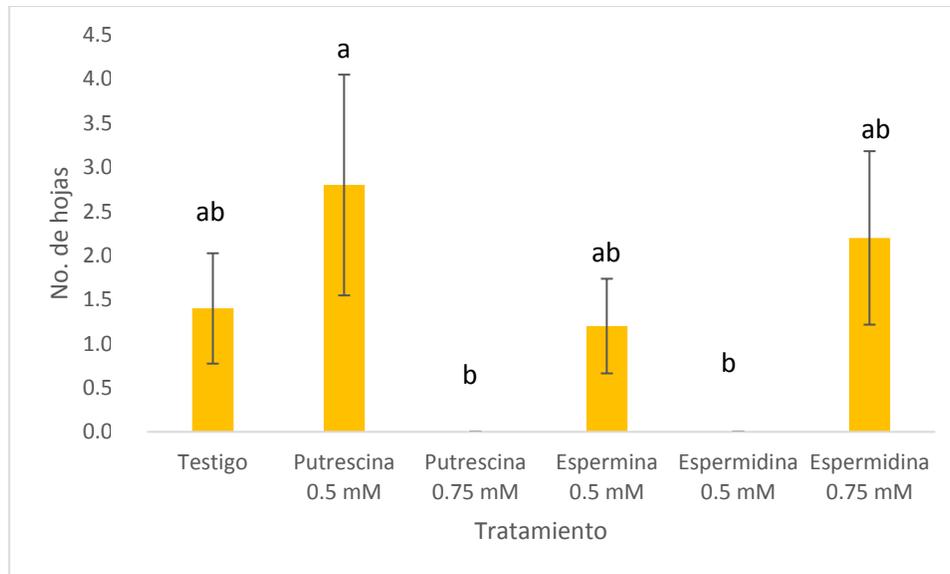


Figura 4. Número de hojas promedio en brotes laterales de aguacate, a los 68 DDT, bajo diferentes concentraciones de PAs (Put, Spm, y Spd). Los valores señalados con letras desiguales son significativamente diferentes según la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis (valor de $p=0.0467$).

No obstante, a los 92 días después de tratamiento no hubo diferencias significativas entre los tratamientos, ya que se obtuvo un valor de p de 0.0540. Al igual que en los resultados obtenidos para la longitud del brote, los datos presentaron una distribución no normal (Figura 5).

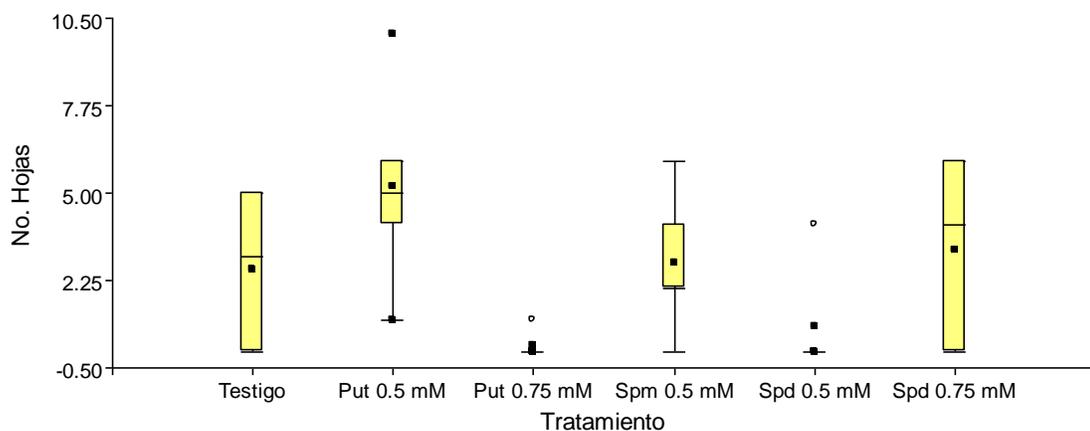


Figura 5. Distribución de los datos de número de hojas promedio en brotes laterales de aguacate, a los 92 DDT, bajo diferentes concentraciones de poliaminas (Put, Spm, y espermidina).

Biomasa

Para complementar las variables de crecimiento y desarrollo se llevó a cabo la medición de área por medio de la herramienta Image J. En dicha aplicación se determinó el área de los brotes laterales de aguacate expresado en pixeles. Como se puede apreciar en la figura 6, a los 92 días de evaluación no se presentaron diferencias significativas entre el testigo y los tratamientos de PAs Put (ambas concentraciones), Spm 0.5 mM, y Spd (ambas concentraciones). Solamente el tratamiento Spm 0.75 mM presentó un área menor en comparación con el testigo (Figura 6).

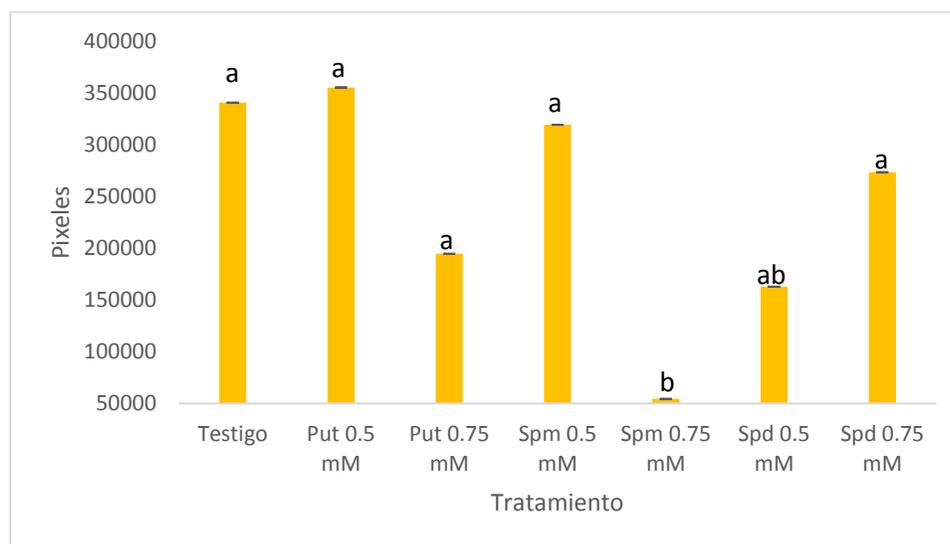


Figura 6. Área de brotes laterales de aguacate, a los 92 DDT, bajo diferentes concentraciones de poliaminas (Put, Spm, y Spd). Los valores señalados con letras desiguales son significativamente diferentes según la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis (valor de $p=0.0255$).

A lo largo de todo el ensayo hubo gran variabilidad entre los tratamientos e inclusive dentro de los mismos tratamientos, como se muestra en la figura 7. Los explantes presentaron diferentes formas de hojas e inclusive coloraciones diferentes así como síntomas de necrosis apical e hiperhidricidad. A su vez, muchas yemas en los diferentes tratamientos no presentaron brotación a lo largo del ensayo.

Para complementar la gran variabilidad que se ha venido mencionando en los resultados anteriormente descritos, se realizó un análisis de componentes principales para poder describir de una mejor manera el comportamiento de los datos obtenidos. Como se puede apreciar en la figura 8, no hay correlación entre las variables de

longitud y número de hojas. Además, se aprecia la gran variabilidad de los datos analizados, donde por tratamiento no se generan “clusters” que puedan indicar una tendencia o comportamiento entre los tratamientos. Los diferentes resultados se encuentran distribuidos a lo largo del plano cartesiano sin indicar alguna tendencia.

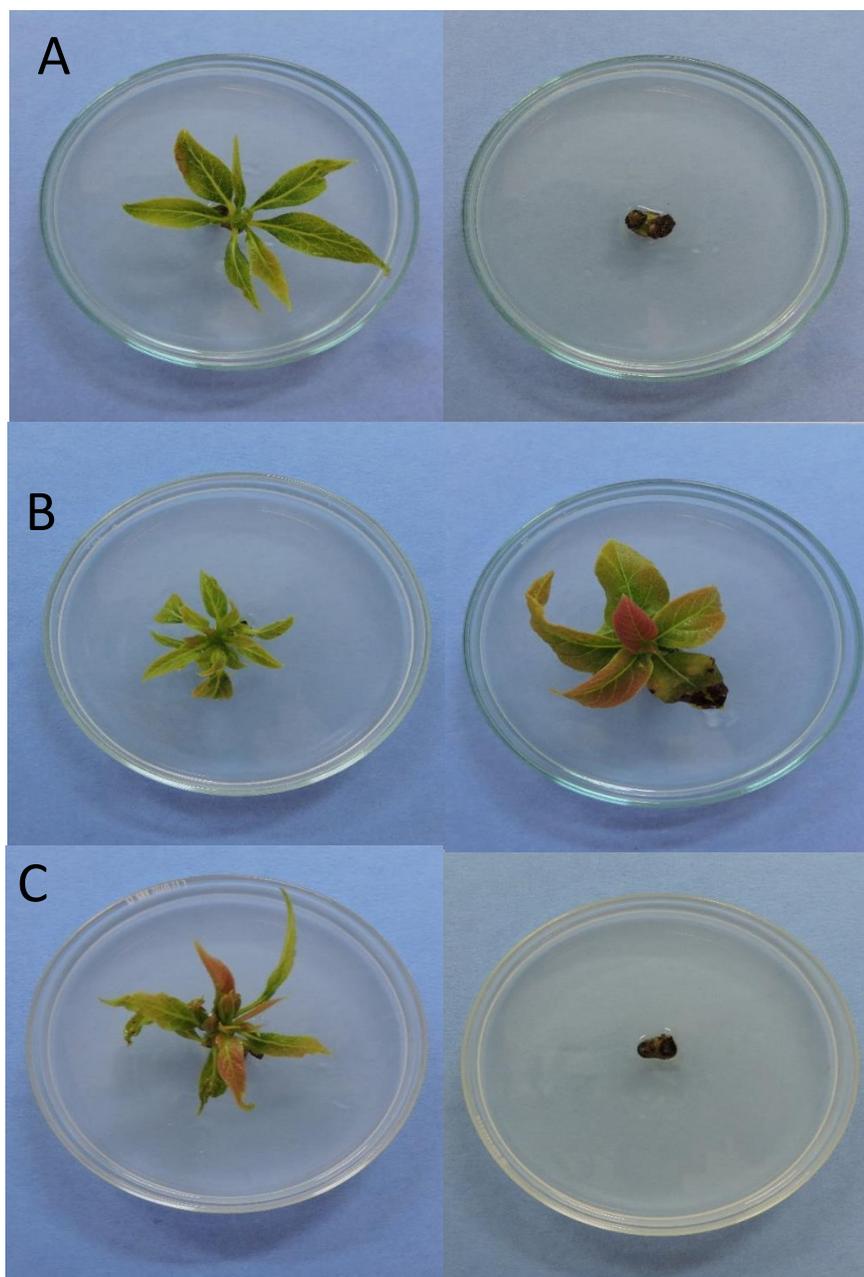


Figura 7. Dos explantes seleccionados al azar a los 92 DDT por tratamiento. A. Testigo. B. Put 0.5 mM. C. Spm 0.5 mM.

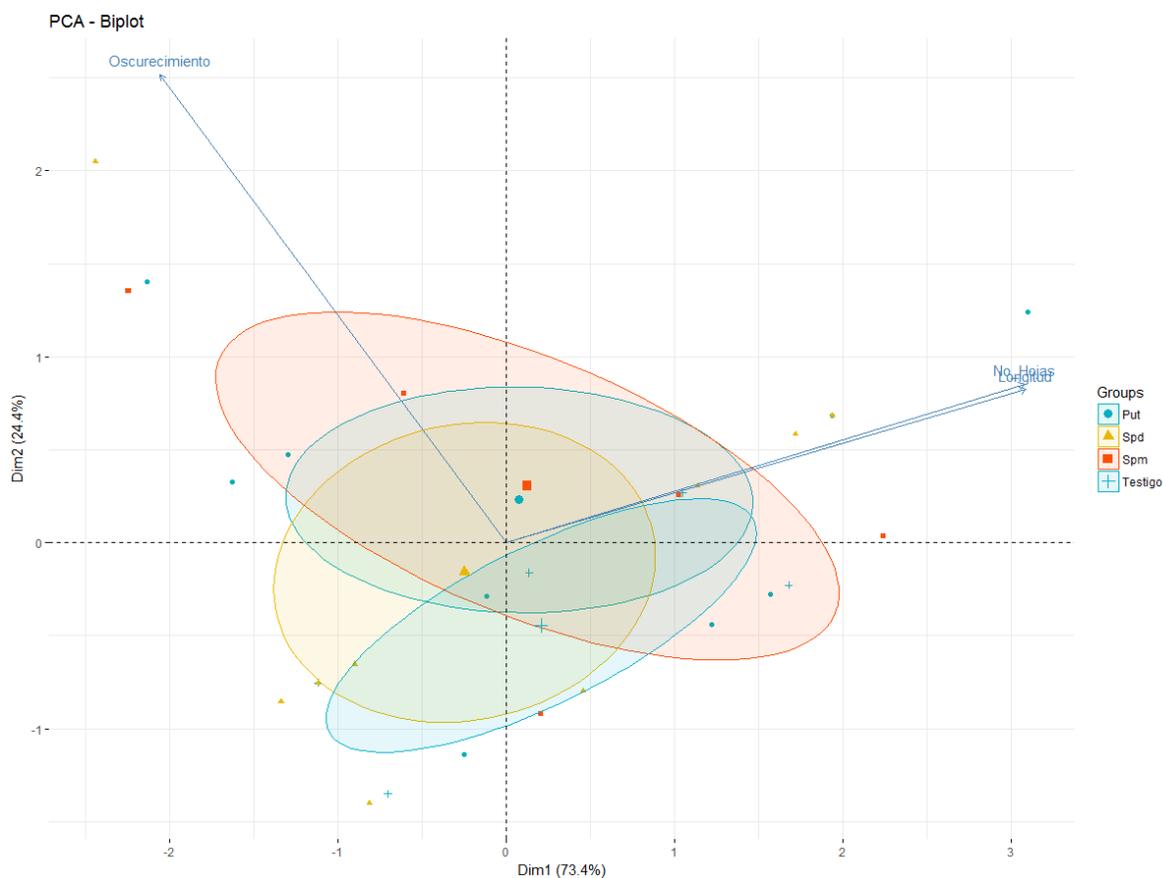


Figura 8. Análisis de componentes principales para las variables de longitud, número de hojas y oscurecimiento de brotes laterales de aguacate a los 92 días después de tratamiento.

7.2 Efecto de las poliaminas sobre la oxidación (porcentaje de oscurecimiento).

Todos los tratamientos presentaron entre 10 y 20 % de oscurecimiento a los ocho días de iniciado el ensayo. Este patrón se mantuvo hasta los 30 días de evaluación. Posteriormente algunos tratamientos empezaron a presentar mayor porcentaje de oscurecimiento. Además, se destaca el fuerte incremento en el porcentaje de oscurecimiento en el tratamiento Spm 0,75 mM a partir de los 68 días. (Figura 9).

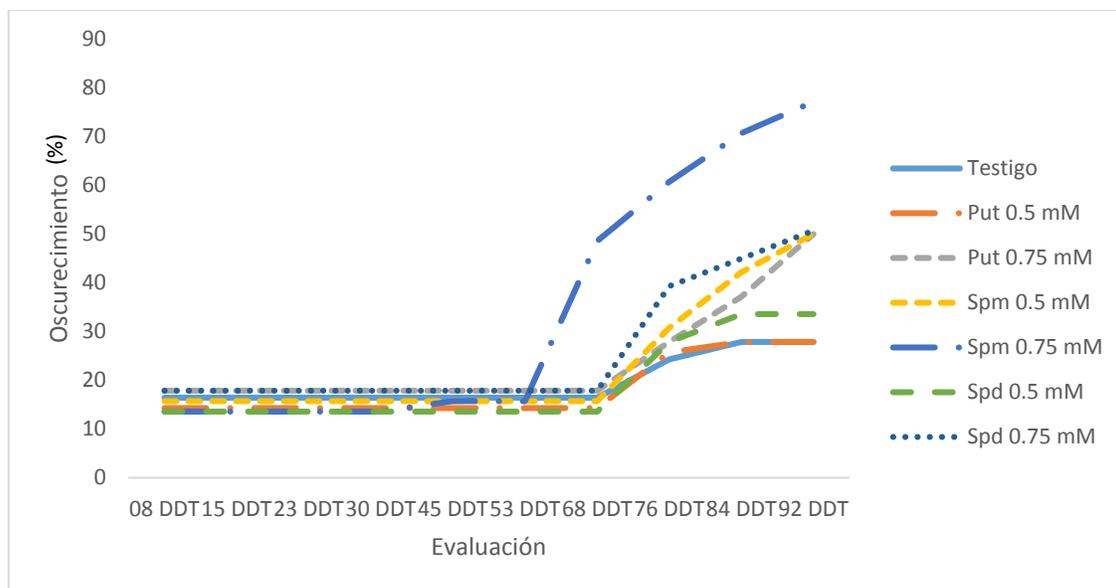


Figura 9. Oscurecimiento de brotes lateral de aguacate, a lo largo de los 92 días de introducido, con diferentes concentraciones de PAs (Put, Spm, y Spd).

Al cabo de los tres meses de evaluación, no se encontró efecto ni de los tratamientos con PAs ni de las concentraciones empleadas sobre el porcentaje de oscurecimiento de los brotes laterales de aguacate (valor de $p=0.0589$). Esto probablemente es consecuencia de la gran variabilidad en los resultados obtenidos dentro de los tratamientos, lo cual se refleja en la distribución de estos en cada tratamiento (Figura 10).

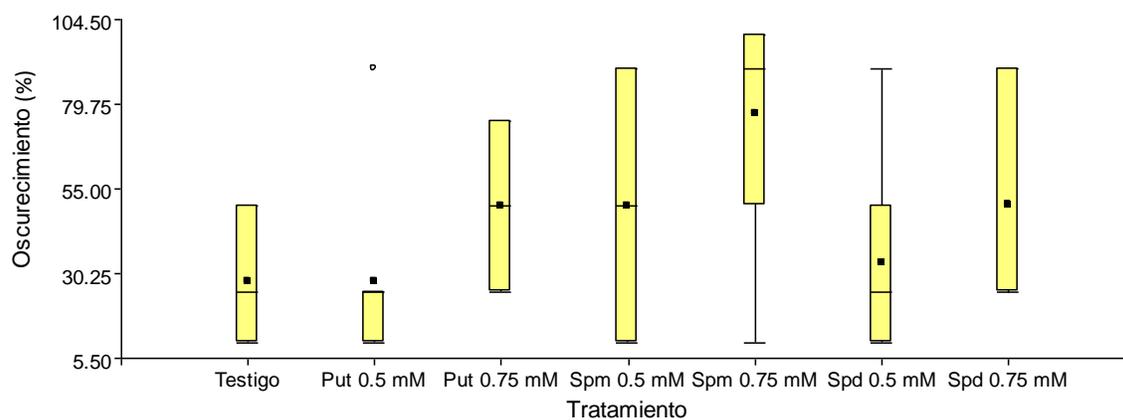


Figura 10. Distribución del porcentaje de oscurecimiento de brotes laterales de aguacate, a los 92 DDT, bajo diferentes concentraciones de PAs (Put, Spm, y Spd).

7.3 Efecto de las poliaminas sobre el contenido de fenoles y malondialdehído en brotes laterales.

El contenido promedio de fenoles de la muestra inicial fue de 2.44 mg/g. Al cotejar este valor inicial con los valores obtenidos para cada tratamiento al cabo de los 92 días de evaluación, se puede apreciar que hubo variación en los contenidos de fenoles entre los tratamientos que, sin embargo, no fue significativa, y por lo tanto este efecto no se puede atribuir a los tratamientos (Figura 11).

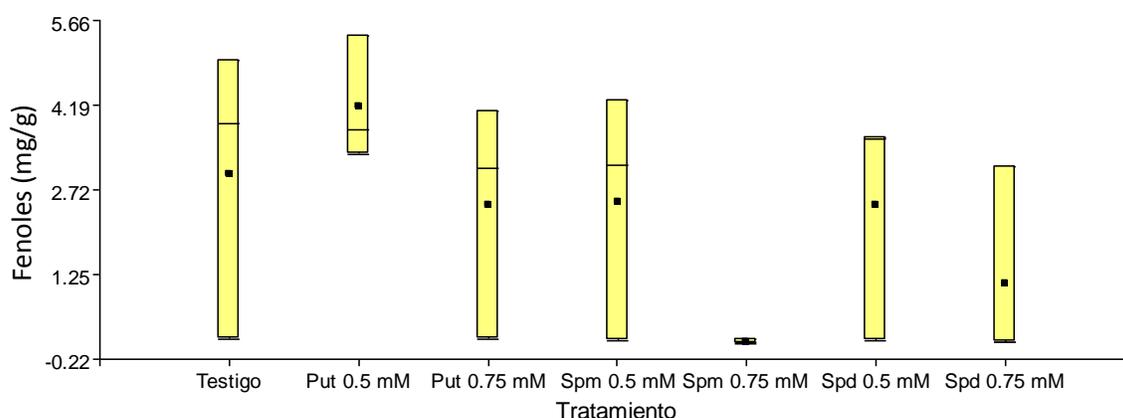


Figura 11. Contenido de fenoles (mg/g) de brotes laterales de aguacate, a los 92 DDT, bajo diferentes concentraciones de PAs (Put, Spm, y Spd).

El contenido promedio de malondialdehído de la muestra inicial fue de 3.45 mmol/ml. A los 92 días de evaluación, los tratamientos presentaron contenidos similares de malondialdehído, en comparación con la muestra inicial. Al igual que en el contenido de fenoles, se presentó variación en los contenidos de MDA por tratamiento, empero sin diferencia estadística (Figura 12). Por último, al comparar los resultados del contenido de fenoles vs el contenido de malondialdehído, se apreció un comportamiento en el que los tratamientos con menor contenido de fenoles presentaron un mayor contenido de malondialdehído (Figuras 11 y 12).

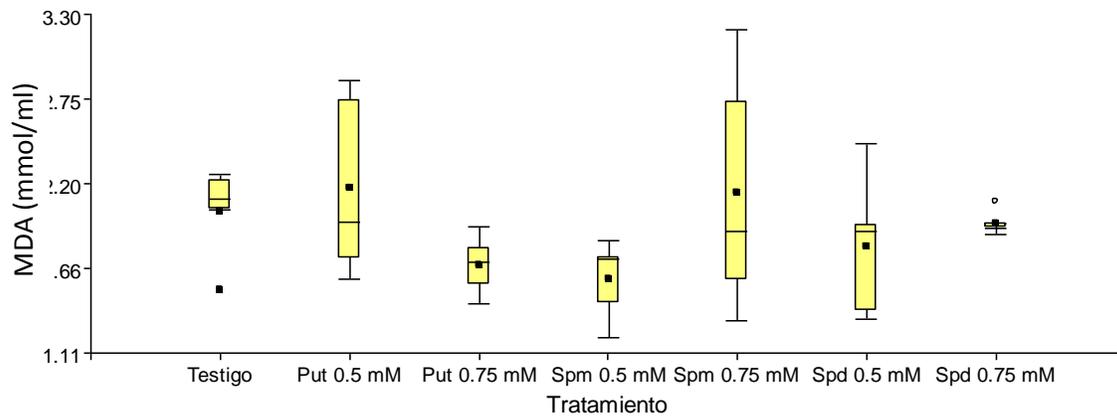


Figura 12. Contenido de malondialdehído (mmol/mL) de brotes laterales de aguacate, a los 92 después de tratamiento, bajo diferentes concentraciones de concentraciones de PAs (Put, Spm, y Spd).

8. Discusión

8.1 El efecto de las poliaminas sobre el crecimiento y desarrollo (brotación, longitud del brote y número de hojas).

La adición de diferentes concentraciones de las PAs Put, Spm, y Spd, al medio de cultivo no tuvo un efecto significativo en la brotación de los brotes laterales de aguacate. Al final del ensayo, hubo tratamientos en los cuales el porcentaje de brotación estuvo por debajo de 2%, como es el caso de Spm al 0,75 mM; mientras que otros tratamientos como Put (0,5 y 0,75 mM), y Spd 0,75 mM presentaron un porcentaje de brotación de 17%. Esto en comparación con el tratamiento testigo, Spm 0,5 mM y Spd 0,75 mM que presentaron un porcentaje de brotación de 14% (Figura 2). Esta variabilidad mencionada anteriormente pudo ocasionar que no haya habido un determinado efecto como tal de la implementación de las poliaminas en el medio de cultivo. Un efecto similar fue reportado por Dias *et al.* (2009); ya que estos autores no obtuvieron diferencias significativas al utilizar Put, Spm, y Spd a la concentración de 1 mM, en la brotación de dos especies de *Passiflora* cultivadas *in vitro*.

Sin embargo, diferentes autores han reportado el uso de las poliaminas para la promoción del desarrollo y crecimiento de brotes *in vitro* de diferentes cultivos (Naija *et al.* 2009). La mayoría de los casos reportados coinciden en que la suplementación de poliaminas al medio de cultivo resulta no sólo en una mayor formación de brotes, sino que también en una mayor longitud de dichos brotes. Cheruvathur *et al.* (2010) reportaron que el uso de Put, Spm y Spd a concentraciones entre 0.2 mM-1.0 mM aumentaron el número de promedio de brotes por explante a más del doble que el tratamiento sin poliaminas, esto en explantes intermodales de *Malaxis acuminata*. Arora *et al* (2011) presentaron resultados similares en explantes de *Azadirachta indica*, pero en este caso sólo utilizando Put a concentraciones entre 0.005 mM y 0.02 mM. Sivanandhan *et al.* (2011) emplearon concentraciones de 0.05 mM a 0.28 mM de las PAs Put, Spm y Spd, en combinación con auxinas, y encontraron una mayor brotación en comparación con el testigo, en explantes de *Withania somnifera* (L.) *in vitro*. Asimismo, Bais *et al* (2001) obtuvieron un mayor brotación, pero en este caso emplearon concentraciones de Put más altas que las empleadas en este ensayo. Dichos

autores emplearon concentraciones entre 10 mM-50 mM sobre brotes axilares de *Cichorium intybus*, siendo la concentración de 40 mM la que presentó los mejores resultados.

En este ensayo, los tratamientos en que se observó brotes con mayor longitud promedio en comparación con el testigo fueron Put 0.5 mM, Spd 0.75 mM, y Spm 0.5 mM; mientras que, en los tratamientos Put 0.75 mM y Spd 0.5 mM se observó una menor longitud promedio. Sin embargo, no se vio un efecto significativo ($P < 0.05$) a la hora de realizar el análisis estadístico a los tres meses de evaluación, lo que implica que estas diferencias no se puede atribuir a un efecto de los tratamientos como tales (Figura 3). Resultado similar fue obtenido por Mesquita *et al.* (2017), quienes llegaron a la conclusión de que no hubo un mayor efecto de poliaminas sobre la longitud de los brotes de *Cariniana legalis*, empleando la siguiente matriz de concentraciones: 0; 0,5; 1; 2,5; y 5 mM.

El efecto de las poliaminas en la longitud de brotes *in vitro* se ha reportado por varios autores. Cheruvathur *et al.* (2010) reportaron que sólo Put a 4 mM indujo una mayor longitud promedio por brote en *Malaxis acuminata*, mientras el uso de Spm y Spd no presentaron diferencias significativas. A diferencia de lo reportado por Cheruvathur *et al.* (2010), Joshi *et al.* (2014) sí encontraron una mayor longitud promedio por brote de *Wrightia tomentosa* con las tres poliaminas utilizadas, a concentración de 0.1-0.5-1.0 mM. Por lo que se esperaba que la suplementación de poliaminas al medio resultara en un aumento en la longitud de los brotes de aguacate en comparación con el testigo. Empero, no se pudo constatar tal efecto al no haber diferencias significativas.

Las poliaminas, al formar parte de los reguladores de crecimiento, han sido estudiadas por su efecto sobre la organogénesis de diferentes especies vegetales *ex vitro* e *in vitro* (Mendes *et al.* 2011; Silvestri *et al.* 2018). Por esa razón se esperaba que la adición de PAs iba a promover el desarrollo de hojas en los brotes de aguacate. Dicho efecto se obtuvo a los 68 días de evaluación, donde los tratamientos con Put 0.5 mM y Spd 0.75 mM presentaron un mayor número de hojas en comparación con el testigo. Empero al realizar la evaluación final (92 días), si bien estos tratamientos presentaron un mayor número de hojas que el testigo, al no haber diferencias significativas, no se puede atribuir esta diferencia como efecto de la adición de las poliaminas al medio de cultivo. Se contemplaba que el

efecto que se apreció a los 68 días de evaluación persistiera hasta el final del ensayo; ya que, las PAs, han sido reportadas como parte importante de diferentes procesos biológicos en las plantas (división celular, muerte celular programada, senescencia, entre otros) influenciando así el crecimiento y desarrollo, así como la respuesta ante diferentes tipos de estrés en la planta (Carone *et al.* 2010; Cai *et al.* 2015; Kusano *et al.* 2008; Paschalidis y Roubelakis-Angelakis. 2005).

Si bien se ha reportado el rol de las poliaminas en los diferentes procesos de desarrollo de las plantas, aún no se tiene claro su modo de acción. Inclusive, Mesquita *et al.* (2017) concluyeron que los efectos de la suplementación exógena de poliaminas se ven afectados por las concentraciones de poliaminas endógenas presentes. La concentración de poliaminas endógenas es mayor en tejidos u órganos jóvenes y ésta va decreciendo conforme el envejecimiento (Paschalidis y Roubelakis-Angelakis. 2005). Por lo que el contenido de poliaminas endógenas en los explantes pudo haber jugado un rol importante en los resultados obtenidos en este ensayo.

Además de los resultados mencionados anteriormente, a lo largo del ensayo se observó la presencia de síntomas como necrosis apical e hiperhidricidad, síntomas similares reportados por diversos autores en cultivo de tejidos de diferentes especies (Azofeifa 2009; Naz *et al.* 2015).

El cultivo de tejidos se ha estudiado para poder lograr la obtención de patrones clonales tolerantes a patógenos que afectan las plantaciones de *Persea americana* (Pliego-Alfaro *et al.* 1999). Esto debido a la gran heterogeneidad de los patrones obtenidos por medio de propagación sexual (semilla) (Rogel *et al.* 2000). Barceló-Muñoz *et al.* (1999) reportaron un procedimiento para la micropropagación *in vitro* de *Persea americana*, en el cual lograron establecer y aclimatar plantas obtenidas de yemas basales de plantas 10 años de edad. En el cual, reportaron presencia de necrosis apical y síntomas de hiperhidricidad a lo largo del ensayo, lo que afectó la brotación, elongación y formación de hojas por parte de los explantes. Problemas similares fueron reportados por Dalsaso y Guevara (1989), y Vargas (2017). Razón por la que se decidió evaluar el efecto de las poliaminas en la mejora del explante en su establecimiento *in vitro*; empero, la presencia de estos síntomas pudo haber

contribuido a la gran variabilidad que se presentó entre los tratamientos, así como la disminución de las repeticiones por tratamiento (Figura 8 y 9).

La variabilidad entre los tratamientos, mencionada anteriormente, puede estar relacionada a otros efectos. Ésta puede ser asociada al efecto de estacionalidad que presenta *Persea americana*. Dalsaso y Guevara (1989) y Singh *et al.* (2012) concluyeron que hay un efecto en la respuesta del material vegetal con respecto a la época de recolección del material madre, del cual se obtiene los explantes. Estos autores indicaron que puede haber un comportamiento fluctuante en el crecimiento vegetativo de los explantes. Un efecto similar fue descrito por Shukla *et al.* (2012) en brotes de *Ulmus americana*. Esto explicaría parte del por qué no hubo efecto significativo de las diferentes concentraciones de poliaminas sobre el crecimiento y desarrollo de los brotes de *Persea americana*.

Otro factor limitante durante este ensayo es el efecto del subcultivo de los explantes a lo largo de los ensayos. Este es un efecto muy marcado en la micropropagación y establecimiento *in vitro* de especies leñosas. Diferentes autores reportaron una disminución en la respuesta de los explantes, así como un aumento en la aparición de necrosis en los tratamientos (Singh *et al.* 2012; Shukla *et al.* 2012; Encina *et al.* 2014). Dicha sintomatología empezó a presenciarse en trabajos previos en aguactae después de dos o tres subcultivos del material (Dalsaso y Guevara, 1989; Vargas, 2017). El efecto de las poliaminas se evaluó durante un periodo de tres meses, lo que conllevó dos subcultivos a lo largo de la evaluación. Lo que se puede asociar la respuesta fluctuante entre tratamientos.

Aunado a los factores mencionados anteriormente, otra limitante es el estado de la yema de cada explante. En el caso del material vegetal empleado en este experimento, se emplearon árboles adultos, los cuales se habían mantenido durante aproximadamente cuatro años en condiciones de invernadero. Durante este periodo han sido podados varias veces para distintos ensayos. Las yemas de *Persea americana* pueden presentar diferentes grados de reposo a lo largo de la temporada (Venning y Lincoln 1958). Las yemas ubicadas en las axilas de las hojas pueden encontrarse en reposo dependiendo del estado de crecimiento en el que se encuentre la planta. Los árboles de *Persea americana* presentan un crecimiento rítmico con una ramificación siléptica, lo que implica que las ramas laterales pueden estar

en diferentes estados, afectando así la condición de las yemas (Arpaia *et al.* 1995; Barthélémy y Caraglio, 2007). Lo anterior implica un posible reposo en las yemas ubicadas en las axilas de las hojas. Dicho reposo se puede romper mediante la poda del material madre previo a la introducción de los explantes, empero en *Persea americana*, la poda no afecta a todas las yemas de la rama podada, sino que sólo tiene efecto en yemas más próximas a donde se realizó el corte (Venning y Lincoln 1958; Menzel y Lagadec. 2014). Por ello, las condiciones en las cuales se encontraban los explantes a la hora de realizar el ensayo pudo ocasionar la gran variabilidad que se presentó en el experimento.

8.2 Efecto de las poliaminas sobre la oxidación (porcentaje de oscurecimiento).

Al cabo de los tres meses de evaluación, los tratamientos en los que se observó mayor oscurecimiento fueron los tratamientos Spm 0.75 mM, Spd 0.75mM, Spm 0.5 mM, y Put 0.75 mM. Como se puede apreciar en la figura 7, a los 53 días de transferido el experimento, empieza a haber un incremento en el porcentaje de oscurecimiento en los tratamientos, pero se destaca el fuerte incremento en el porcentaje de oscurecimiento en el tratamiento Spm 0,75 mM a partir de los 68 días. Esto es contrario al resultado obtenido por Tang *et al.* (2004), quienes lograron revertir el porcentaje de oscurecimiento en callos de *Pinus virginiana* mediante la suplementación al medio de Put, Spd, y Spm a concentraciones de 1.5 mM, siendo Put y Spd los tratamientos más eficientes.

Una de las mayores limitaciones del cultivo *in vitro* de especies leñosas es el oscurecimiento de los explantes (Leng *et al.* 2009). El oscurecimiento está directamente relacionado a la oxidación de compuestos fenólicos. Dicho oscurecimiento se da por la producción de un pigmento negro-marrón denominado melanina durante la oxidación (Dutta, 2010). La acumulación de compuestos fenólicos se ve afectada por diferentes estímulos, por lo general situaciones de estrés. En el cultivo *in vitro* se dan varios factores que pueden llegar a someter a los explantes a diferentes condiciones de estrés. Por ejemplo, el estrés osmótico debido a la combinación de sales presentes en el medio de cultivo, desbalances hormonales, o bien, estrés mecánico por el proceso de disección a la hora del establecimiento y

posteriores subcultivos (Dalsaso y Guevara, 1989; Vargas, 2017). Este ensayo se evaluó por tres meses, durante los cuales se realizaron dos subcultivos (cada 30 días) para transferir los explantes a un medio fresco. Como se puede apreciar en la figura 9, después del segundo y último subcultivo, se da un incremento bastante notorio en el porcentaje de oscurecimientos en todos los tratamientos. Efecto similar fue reportado por diferentes autores (Tang *et al.* 2004), donde posterior a varios subcultivos el porcentaje de oscurecimiento fue incrementándose de forma gradual, probablemente por las causas indicadas anteriormente.

Las poliaminas se han caracterizado por sus cualidades antioxidantes. Diferentes autores atribuyen dicha cualidad a la capacidad que poseen las poliaminas de interactuar con otras moléculas gracias a su carácter policatiónico (Mendoza y Rocha, 2002; Jordan y Caseretto, 2006; Alet *et al.*, 2008). Sin embargo, la adición de diferentes concentraciones de las PAs Put, Spm, y Spd, al medio de cultivo, no tuvo un efecto significativo en el porcentaje de oscurecimiento de brotes laterales de *Persea americana*. En parte esto se puede relacionar al efecto del contenido endógeno de PAs en los explantes. Varios autores han reportado que los efectos de la aplicación exógena de PAs están directamente relacionados al contenido endógeno del material vegetal a la hora de realizar el ensayo (Mesquita *et al.*, 2017).

8.3 Efecto de las poliaminas sobre el contenido de fenoles y malondialdehído en brotes laterales.

Al cotejar el resultado final del contenido de fenoles se observó que hubo variación en los contenidos de fenoles entre los tratamientos, empero al no haber una diferencia significativa, este efecto no se puede atribuir directamente a los tratamientos (Figura 11). El oscurecimiento de los tejidos vegetales está relacionado con el contenido de fenoles y malondialdehído (Leng *et al.* 2009). Estos son metabolitos secundarios, ampliamente reportados en la literatura, que tienen un rol fundamental en el metabolismo de la planta. Aunado a esto, están directamente relacionados al sistema de defensa que se activa en las plantas en diferentes condiciones de estrés. Sin embargo, su oxidación, por parte de la polifenol oxidasa, puede ocasionar el oscurecimiento de los explantes. Por ello, un alto

contenido de fenoles puede ser una respuesta del explante ante una situación de estrés, empero no implica una mala condición del explante (Sen y Alikamanoglu, 2013).

Es por esta razón que se evaluó el contenido de MDA, ya que este sí está relacionado directamente con el estrés oxidativo. Autores como Sen y Alikamanoglu (2013) y Tian *et al.* (2017) reportaron una correlación positiva entre situaciones de estrés y contenido de MDA en tejidos vegetales. Por ello, se esperaba que los tratamientos en los cuales se observaron explantes menos desarrollados y más afectados por el oscurecimiento fueran los que iban a presentar un mayor contenido de MDA. Sin embargo, al cabo de los 92 días de evaluación, el contenido de MDA fue muy similar entre los tratamientos, y no se presentaron diferencias significativas. A su vez, se esperaba encontrar una tendencia de que a mayor contenido de fenoles iba a ser menor el contenido de MDA, empero no fue así. Este resultado puede estar relacionado a que el material inicial ya se encontraba bajo cierto grado de estrés. El contenido promedio de MDA de la muestra inicial fue de 3.45 mmol/ml. Lo cual, comparado con el contenido obtenido a los 92 días de evaluación, fue mucho menor. Lo anterior lleva a la conclusión de que el material madre del cual se obtuvieron los explantes se encontraban estresados. Esto pudo influir en los resultados obtenidos, ya que a lo largo del ensayo hubo mucha variabilidad entre los tratamientos (Figuras 7 y 8).

Durante el desarrollo de la presente investigación, la principal limitante que se presentó fue una gran variabilidad en los resultados dentro y entre cada tratamiento, así como la cantidad de material disponible para la realización del ensayo. Por estas razones, no se logró determinar si la respuesta obtenida por los explantes estaba relacionada a los distintos tratamientos evaluados. No se consiguió concluir sobre un efecto de las PAs sobre las diferentes variables evaluadas (brotación, longitud del brote, número de hojas, porcentaje de oscurecimiento, contenido de fenoles y MDA) en los explantes. Parte de la variabilidad presentada pudo haber estado determinada por la época de recolección de los brotes de los cuales se obtuvieron los explantes. Esto debido a que varios autores han demostrado que la época de recolección sí influye en la respuesta de los explantes. Sin embargo, se apreció de manera visual una

respuesta diferente de los explantes a los tratamientos, por lo que se deben evaluar variantes al protocolo evaluado. Por ejemplo, se debe establecer una matriz de concentraciones más específica tomando en consideración el contenido endógeno de PAs; esto con el fin de poder establecer las concentraciones más adecuadas para el cultivo *in vitro* de aguacate. También se considera importante trabajar una PA a la vez, para poder tener más material por tratamiento y reducir la variabilidad de los datos.

9. Literatura citada

- AINSWORTH E.; GILLESPIE K. 2007. Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin-Ciocalteu reagent. *Nature Protocols* 2(4): 875-877
- ALET A.; CHAVES A.; FRACAROLI V.; SANCHEZ D.; RUIZ O.; MAIALE S. 2008. Transformación vegetal con genes de la biosíntesis de poliaminas regulados por un promotor inducible por estrés. Su potencial aplicación biotecnológica a variedades nacionales de arroz. *Revista Colombiana de Biotecnología* 10(1): 143-148.
- ALEYDA M.; ACOSTA R.; ENRIQUE J.; PEÑA S.; PAEZ M.; BENITEZ R. 2012. Correlación de la concentración de poliaminas con el desarrollo “in vitro” de *Annona muricata* L. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial* 10(2): 71-78
- ALVES A.; KOLLER O.; VILLEGAS A. 1999. Propagación vegetativa de aguacate selección 153 (*Persea* sp.) por acodo en contenedor. *Revista Chapingo Serie Horticultura* 5:221-225
- ANWAR R.; MATTOO A.; HANDA A. 2014. “Polyamine Interactions with Plant Hormones: Crosstalk at Several Levels”. *Polyamines*, editado por Kusano, T.; Suzuki H. Springer. 267-302.
- ARAGAO V. P. M.; NAVARRO B. V.; DA SILVA A. T.; SILVEIRA V.; SANTA-CATARINA C. 2017. Micropropagation of *Cariniana legalis* (Martius) O. Kuntze, an endangered hardwood tree from the Brazilian Atlantic Forest. *Plant Cell Culture & Micropropagation* 13(2): 41-50.
- ARORA K.; SHARMA M.; SRIVASTAVA J.; RANADE S.; SHARMA A. 2011. *In vitro* cloning of *Azadirachta indica* from root explants. *Biologia Plantarum* 55 (1): 164-168
- ARPAIA M.; ROBINSON P.; MICKELBART M.; WITNEY G. 1995. Development of a phenological model for California “Hass” avocado. Simposio: Proceedings

of 1996 Avocado Research Symposium. California Avocado Society and University. 11 pp.

- AZOFEIFA A. 2009. Problemas de oxidación y oscurecimiento de explantes cultivados *in vitro*. *Agronomía Mesoamericana* 20: 153-175
- BAIS H.; SUDHA G.; RAVISHANKAR G. 2001. Influence of putrescine, silver nitrate and polyamine inhibitors on the morphogenetic response in untransformed and transformed tissues of *Cichorium intybus* and their regenerants. *Plant Cell Reports* 20: 547-555
- BARAONA M.; SANCHO E. 1991. Aguacate y mango, Fruticultura especial. Fruticultura II. EUNED, Costa Rica. 85 p.
- BARCELO-MUÑOZ A.; ENCINA C.; SIMÓN-PÉREZ E.; PLIEGO-ALFARO F. 1999. Micropropagation of adult avocado. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 58: 11-17
- BARTHÉLÉMY D.; CARAGLIO Y.; 2007. Plant architecture: a dynamic, multilevel and comprehensive approach to plant form, structure and ontogeny. *Annals of Botany* 99: 375-407
- BENDER G.; MENGE J.; ARAPAIA M. 2011. (En línea). Avocado Rootstocks. Book 1. Chapter 4. Consultado el 22 de marzo del 2016. Disponible en: <http://ucanr.org/sites/alternativefruits/files/121265.pdf>.
- BEN-YA'ACOV B.; MICHELSON E. 1995. Avocado rootstocks. *Horticultural Reviews* 17: 381-429.
- CAI G.; SOBIESZCZUK-NOWICKA E.; ALOISI I.; FATTORINI L.; SERAFINI-FRACASSINI D.; DEL DUCA, S. 2015. Polyamines are common players in different facets of plant programmed cell death. *Amino Acids* 47: 27-44
- CARONE S. B.; SANTA-CATARINA C.; SILVEIRA V.; FLOH E. I. S. 2010. Polyamine patterns in haploid and diploid tobacco tissues and *in vitro* cultures. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 53(2): 409-417

- CHERUVATHUR M.; ABRAHAM J.; MANI B.; THOMAS T. 2010. Adventitious shoot induction from cultured internodal explants of *Malaxis acuminata* D. Don, a valuable terrestrial medicinal orchid. *Plant Cell Tissue Organ Culture* 101: 163-170
- DALSASO L.; GUEVARA E. 1989. Multiplicación clonal in vitro del aguacate (*Persea americana*) cv. Fuerte. *Agronomía Costarricense* 13: 61-71
- DAVEY M.; STALS E.; PANIS B.; KEULEMANS J.; SWENNEN R. 2005. High-throughput determination of malondialdehyde in plant tissues. *Annal Biochem.* 347:201-207.
- DEWIR Y.; CHAKRABARTY D.; ALI B.; HAHNA E.; PAEK K. 2006. Lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities of *Euphorbia millii* hyperhydric shoots. *Environ Exp Bot* 58: 93-99
- DIAS L.; SANTA-CATARINA C.; RIBEIRO D.; BARROS R.; FLOH E.; OTONI W. 2009. Ethylene and polyamine production patterns during *in vitro* shoot organogenesis of two passion fruit species as affected by polyamines and their inhibitor. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 99: 199-208
- DIXON A.; FULLER K. 1976. Effect of synthetic auxin levels on *Phaseolus vulgaris* L. *Physiological Plant Pathology* 9(3): 299-312
- DUTTA S. 2010. "Role of free radicals and antioxidants in *in vitro* morphogenesis". *Reactive oxygen species and antioxidants in higher plants*, editado por Science Publishers. 229-247. CRC Press 384 p.
- ENCINA C.; PARISI A.; O'BRIEN C.; MITTER N. 2014. Enhancing somatic embryogenesis in avocado (*Persea americana* Mill.) using a two-step culture system and including glutamine in the culture medium. *Scientia Horticulturae* 165: 44-50
- GARBAZO M. 2011. Manual de aguacate: buenas prácticas de cultivo variedad Hass. 2 ed. San José, CR. MAG. 96 p.

- GIACINTI M. 2002. (en línea). Visión mundial del consumo de aguacate o palta. *Agroalim.* 7(14): 43-50. Disponible en: http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1316-03542002000100004&lng=es&nrm=iso. Consultado el 13/11/2018.
- GHARIBI S.; TABATABACI B.; SAEIDI G.; HOSSEIN S. 2015. Effect of drought stress on total phenolic, lipid peroxidation, and antioxidante activity of *Achillea* species. *Applied Biochemical Biotechnology* 174(4): 796-809.
- GRACE S. 2005. Antioxidants and reactive oxygen species in plants: Phenolics as antioxidants. Blackwell Scientific Publishers, Oxford. 141-168 p.
- HARTY P. 1985. Propagation of avocados by tissue culture: development of a culture medium for multiplication of shoots. *South African Avocado Growers' Yearbook.* 8: 70-71.
- JORDAN M.; CASARETTO J. 2006. Hormonas y Reguladores del crecimiento: Etileno, Ácido Abscísico, Brasinoesteroides, Poliaminas, Ácido Salicílico y Ácido Jasmónico. *Fisiología Vegetal.* Ediciones Universidad de La Serena. 16: 1-28.
- JOSHI P.; SUTHAR D.; DUTTA S. 2014. Effect of polyamines on *in vitro* growth, shoot multiplication and rooting in *Wrightia tomentosa* Roem et Shult. *International Journal of Recent Scientific Research* 5(7): 1270-1273.
- KARIMI S.; YADOLLAHI A. 2012. Using putrescine to increase the rooting ability of hardwood cuttings of the peach X almond hybrid GF677. *Journal of Agrobiology* 29(2): 63-69.
- KUSANO T.; BERBERICH T.; TATEDA C.; TAKAHASHI Y. 2008. Polyamines: essential factors for growth and survival. *Planta* 228: 367-381
- LEÓN J. 2000. *Botánica de los cultivos tropicales.* Agroamérica. 522 p.
- LENG P.; SU S.; WEI F.; YU F.; DUAN Y. 2009. Correlation between browning, total phenolic content, polyphenol oxidase and several antioxidant enzymes during pistachio tissue culture. *Acta Horticulturae* 829: 127-132

- LLOYD G.; MCCOWN B. 1980. Commercially feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture. Combined Proceedings of the International Plant Propagators Society 30: 421-427.
- MENDES A.; CIDADE L.; OTONI W.; SOARES-FILHO W.; COSTA M. 2011. Role of auxins, polyamines and ethylene in root formation and growth in sweet orange. *Biologia Plantarum* 55(2): 375-378.
- MENDOZA C.; ROCHA P. 2002. Poliaminas: Reguladores del crecimiento con múltiples efectos en las plantas. *Palmas* 23(4): 39-46.
- MENZEL C.; LAGADEC M. 2014. Increasing the productivity of avocado orchards using high-density plantings: a review. *Scientia Horticulturae* 177: 21-36
- MINOCHA R.; MAJUMDAR R.; MINOCHA S. 2014. Polyamines and abiotic stress in plants: A complex relationship. *Frontiers in Plant Science* 15: 1-17.
- MURASHIGE T.; SKOOG F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiology Plant* 15: 473-497.
- NAIJA S.; ELLOUMI N.; AMMAR S.; KEVERS C.; DOMMES J. 2009. Involvement of polyamines in the adventitious rooting of micropropagated shoots of the apple rootstock MM106. *In Vitro Cellular & Developmental Biology Plant* 45: 83-91
- NAZ R.; ANIS M.; ATTA H. 2015. Micropropagation of *Cassia occidentalis* L. and the effect of irradiance on photosynthetic pigments and antioxidative enzymes. *Biologia Plantarum* 59: 1-10
- OYADENEL EA. 1995. Propagación in vitro de portainjertos de palto (*Persea americana* Mill.) resistentes a salinidad, cv. Velvick y Lula. Facultad de Agronomía. Universidad Católica de Valparaíso, Quillota, Chile, p 90.
- PASCHALIDIS K.; ROUBELAKIS-ANGELAKIS, K. 2005. Spatial and temporal distribution of polyamine levels and polyamine anabolism in different organs/tissues of the tobacco plant. Correlations with age, cell division/expansion, and differentiation. *Plant Physiology* 138(1): 142-52.

- 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.
- RAZDAN K. 2003. Introduction to plant tissue culture. Science Publishers, EEUU. 375 p.
- RODRÍGUEZ N.; CAPOTE M.; ZAMORA V. 1999. Cultivo in vitro del aguacatero (*Persea americana* Mill.). Revista Chapingo Serie Horticultura 5: 231-237
- ROGEL, I.; MUÑOZ, B.; CRUZ, G. 2000. Propagación de aguacatero por acodo utilizando etiolación, ácido indolbutírico, y obstrucción de savia. Revista Chapingo Serie Horticultura 6 (1): 101-104
- SALAZAR S.; VALASCO JJ.; MEDINA R. 2004. Selecciones de aguacate con potencial de uso como portainjertos II. Respuesta al enraizamiento mediante acodos. Revista Fitotecnia Mexicana 27:183-190.
- SEN A.; ALIKAMANOGLU S. 2013. Antioxidant enzyme activities, malondialdehyde, and total phenolic content of PRG-induced hyperhydric leaves in sugar beet tissue culture. In Vitro Cell Dev Biol Plant 49:396-404.
- SHUKLA M.; JONES A.; SULLIVAN J.; LIU C.; GOSLING S.; SAXENA K. 2012. *In vitro* conservation of American elm (*Ulmus americana*): potential role of auxin metabolism in sustained plant proliferation. Canadian Journal of Forest Research 42: 686-697
- SILVESTRI C.; SABBATINI G.; MARANGELLI F.; RUGINI E.; CRISTOFORI V. 2018. Micropropagation and *ex vitro* rooting of Wolfberry. HortScience 53(10): 1494-1499.
- SINGH S.; DALAL S.; SINGH R.; DHAWAN A.; KALIA R. 2012. Seasonal influences on *in vitro* bud breaking in *Dendrocalamus hamiltonii* Arn. Ex Munro nodal explants and effect of culture microenvironment on large scale

shoot multiplication and plantlet regeneration. *Indian Journal Plant Physiology* 17(1): 9-21

SIVANANDHAN G.; MARIASHIBU T.; ARUN M.; RAJESH M.; KASTHURIRENGAN S.; SELVARAJ N.; GANAPATHI A. 2011. The effect of polyamines on the efficiency of multiplication and rooting of *Withania somnifera* (L.) Dunal and content of some withanolides in obtained plants. *Acta Physiol Plant* 33: 2279-2288

TABART J.; FRANCK T.; KEVERS C.; DOMMES J. 2015. Effect of polyamines and polyamine precursors on hyperhydricity in micropropagated apple shoots. *Plant Cell Tissue Organ Culture* 120: 11-18.

TANG W.; NEWTON R.; OUTHAVONG V. 2004. Exogenously added polyamines recover browning tissues into normal callus cultures and improve plant regeneration in pine. *Physiological Plantarum* 122: 386-395.

TIBURCIO A.; ALTABELLA T.; BITRIÁN M.; ALCÁZAR R. 2014. The roles of polyamines during the lifespan of plants: from development to stress. *Planta* 240: 1-18.

TIAN Q.; CHEN J.; WANG D.; WANG H.; LIU C.; WANG S.; XIA X.; YIN W. 2017. Overexpression of a *Populus euphratica* *CBF4* gene in poplar confers tolerance to multiple stresses. *Plant Cell Tissue Organ Culture* 128: 391-407

UMAÑA G. 2007. Caracterización de la agrocadena de aguacate: Zona de los Santos. San José, CR. MAG. 50 p.

VARGAS E. 2017. Micropropagación de patrones de aguacate (*Persea americana*) con tolerancia a *Phytophthora cinnamomi* utilizados en Costa Rica. Tesis Maestría. Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica. 145 p.

VENNING F.; LINCOLN F. 1958. Developmental morphology of the vegetative axis of avocado (*Persea Americana* L.) and its significance to spacing, pruning practices, and yields of the grove. *Proceedings of the Florida State Horticultural Society* 71: 350-356