



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

**CAMPUS MONTECILLO
POSTGRADO EN RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD
FRUTICULTURA**

**TOLERANCIA A SALINIDAD
DE *Persea americana* Mill EN CULTIVO *in vitro***

LEOBARDA GUADALUPE RAMÍREZ GUERRERO

**T E S I S
PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE**

DOCTORA EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, ESTADO DE MEXICO

2010

La presente tesis titulada: “**TOLERANCIA A SALINIDAD DE *Persea americana* Mill EN CULTIVO *in vitro***”, realizada por la alumna: **Leobarda Guadalupe Ramírez Guerrero**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

DOCTORA EN CIENCIAS

RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD FRUTICULTURA

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO:



DR. HÉCTOR GONZÁLEZ ROSAS

ASESOR:



DR. GUILLERMO CALDERÓN ZAVALA

ASESOR:



DR. JUAN VELÁZQUEZ MENDOZA

ASESORA:



DRA. ANA MARÍA CASTILLO GONZÁLEZ

ASESOR:



DR. VÍCTOR MANUEL CETINA ALCALÁ

ASESORA:



DRA. ADRIANA DELGADO ALVARADO

Montecillo, Texcoco, Estado de México. Noviembre de 2010

TOLERANCIA A SALINIDAD DE *Persea americana* Mill EN CULTIVO *in vitro*

Leobarda Guadalupe Ramírez Guerrero, Dra.

Colegio de Postgraduados, 2010

El objetivo de la investigación fue conocer los efectos de salinidad en el desarrollo y anatomía de embriones maduros de dos tipos de aguacate cultivados *in vitro* e identificar alguna fuente de tolerancia al estrés salino. El trabajo consistió en: **I)** Establecimiento *in vitro*; **II)** Evaluación del desarrollo y sobrevivencia *in vitro*; **III)** Evaluación de parámetros de tolerancia a salinidad en aguacate en cultivo *in vitro*; **IV)** Cambios anatómicos en la raíz inducidos por salinidad. Se sembraron *in vitro* ejes embrionarios de aguacate tipo criollo y 'Hass' en medio Murashige y Skoog (1962) con diferentes concentraciones de NaCl y CaCl₂ y con la combinación de éstas, en proporción 1:1; se estudió la germinación, emergencia, el desarrollo y la supervivencia de las plántulas de criollo. En tallo y raíz de aguacate criollo se determinaron el potencial hídrico, potencial osmótico, concentración de prolina, de sodio y de calcio. Se identificaron los cambios anatómicos en raíces de criollo y 'Hass'. La adición de NaCl al medio de cultivo MS (1962) en comparación al CaCl₂, tuvo un efecto negativo mayor en los procesos de germinación y emergencia de los ejes embrionarios, en el desarrollo y supervivencia de las plántulas especialmente de 'Hass'. El vástago de criollo acumuló mayor concentración de prolina y su crecimiento fue menos afectado por la restricción hídrica que la raíz. Se identificó que la prolina en vástago y raíz, es un indicador de tolerancia a estrés por sales al encontrarse en mayor cantidad en plántulas de tratamientos con las concentraciones altas de sales. La raíz presentó un potencial hídrico menor que el de vástago, lo que sugiere que éste tuvo mayor capacidad de ajuste osmótico como respuesta al déficit hídrico. Los cortes anatómicos de las raíces de aguacate criollo presentaron una estructura anatómica diferente entre tratamientos; en 'Hass' mostraron una organización anatómica similar. El cultivo *in vitro* de ejes embrionarios maduros de aguacate permitió determinar que es posible identificar materiales tolerantes y sensibles al estrés salino a los 65 días después de su establecimiento.

PALABRAS CLAVES: Ejes embrionarios, aguacate, estrés salino, portainjertos, resistencia a salinidad, relaciones hídricas, anatomía de raíz.

SALINITY TOLERANCE OF *Persea americana* Mill CULTURED *in vitro*

Leobarda Guadalupe Ramírez Guerrero, D.Sc.

Colegio de Postgraduados, 2010

The objective of this study was to determine the effects of salinity in the development and anatomy of mature embryos of two types of avocados grown *in vitro* and identify a source of tolerance to salt stress. The work consisted of: I) Establishment *in vitro*; II) Evaluation of *in vitro* development and survival; III) Evaluation of salt tolerance parameters in avocado growing *in vitro*; IV) Root anatomical changes induced by salinity. Embryonic axes of “criollo” type and ‘Hass’ avocados were incubated *in vitro* on Murashige and Skoog (1962) medium with different concentrations of NaCl and CaCl₂ and their combination in a 1:1 ratio. Germination, emergence, development and survival of the seedlings were studied. Water potential, osmotic potential, proline, sodium and calcium concentration in stem and roots of “criollo” were determined. Anatomical changes in roots of “criollo” and ‘Hass’ were identified. The addition of NaCl to the culture medium MS (1962) compared to CaCl₂, had a greater negative effect on germination and emergence of the embryonic axes in the development and survival of seedlings, especially of ‘Hass’. Stem accumulated higher concentration of proline and its growth was less affected by water stress than the root. Proline was identified in stem and root, as an indicator of salt stress tolerance because it was found in greater amounts in seedlings of treatment with high salt concentrations. Water potential of roots was lower than stem, suggesting that stem had a higher capacity of osmotic adjustment in response to water deficit. Roots of “criollo” avocado had a different anatomical structure between treatments, while in ‘Hass’ showed a similar anatomical organization. The *in vitro* culture of embryonic axes of avocado allowed to determine that it is possible to identify tolerant and sensitive materials to salt stress after 65 days of establishment.

KEY WORDS: Embryonic axes, avocado, salt stress, rootstocks, salinity resistance, water relations, anatomy of roots.

DEDICATORIAS

A Dios

Por ser mi fortaleza

A mi esposo

Marco Antonio Moreno Bajaras por el amor, la confianza, el apoyo, la paciencia, sacrificios, por haberme inspirado y aconsejado en seguir adelante, **GRACIAS.**

A mis hijos

Marco Antonio y Alan Paul, por ser los ángeles más hermosos que he conseguido en la vida, por darme la fuerza en seguir adelante y por ser el motivo de mi superación.

A mis padres

Edmundo Ramírez Gómez y Carmen Guerrero Núñez, por haberme enseñado el amor y respeto a las personas, a ser responsable y perseverante.

A mi suegra

Beatriz Barajas González, por su amabilidad, por su apoyo, confianza y respeto en este periodo de mi vida.

A mi familia

Por el amor y la confianza que nos une, por su apoyo moral, su comprensión, sus sabios consejos, por todas las cosas hermosas que hemos pasado y sobre todo por unirnos a mantener y cuidar a esos seres tan hermosos que dios nos dio, **NUESTROS PADRES.**

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) y a la Universidad Autónoma de Nayarit, por el apoyo otorgado para la realización de los estudios de Doctorado en Ciencias en el Colegio de Postgraduados-Campus Montecillo.

Al Colegio de Postgraduados por la oportunidad brindada, particularmente al Dr. Enrique Becerril y a los profesores que contribuyeron en mi formación académica.

A la Universidad Autónoma de Chapingo, por su valiosa cooperación por el préstamo de instalaciones específicamente del programa de Fitotecnia.

Al Centro de Internacional para el Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT), por el préstamo de sus instalaciones para la determinación de potenciales, en especial a José Luis G. Barrios González, asistente del Laboratorio de Fisiología-Programa de trigo.

A la Fundación Sánchez Colín por su intervención para la obtención de la fruta que se estudió.

Al Dr. Héctor González Rosas, por su invaluable apoyo como profesor consejero y por compartir su amplia experiencia en la dirección del presente trabajo de investigación, así como por sus valiosos consejos, sugerencias, tiempo y por la amistad que siempre me brindó durante la ejecución del presente estudio.

Al Dr. Guillermo Calderón Zavala, por la revisión, el apoyo proporcionado como investigador, por sus acertadas sugerencias y la confianza otorgada.

Al Dr. Juan Velázquez Mendoza, por su acertada revisión y por las explicaciones brindadas en los temas involucrados en la investigación.

A la Dra. Ana María Castillo González, por su asesoría y guía para realizar este trabajo. Agradezco su amistad.

Al Dr. Víctor Manuel Cetina Alcalá, por su aportación en este proyecto doctoral.

A la Dra. Adriana Delgado Alvarado, por su amistad, sus buenos consejos, confianza y por su contribución en la realización de este trabajo gracias.

A Guillermo, Ing. Cecilio y Angela por su apoyo desinteresado en el trabajo de laboratorio y por su calidez humana; Rocío y Olga por su apoyo administrativo.

Al M.C. Jaen, a mis compañeros y amigos por compartir buenos momentos y experiencias durante los estudios, ustedes saben a quienes me refiero.

CONTENIDO

| | |
|--|-----|
| ÍNDICE DE CUADROS | ix |
| ÍNDICE DE FIGURAS | x |
| ÍNDICE DE CUADROS EN EL APÉNDICE | xiv |
| CAPÍTULO I | |
| INTRODUCCIÓN..... | 1 |
| CAPÍTULO II | |
| REVISION DE LITERATURA..... | 4 |
| Aspectos generales de salinidad | 4 |
| Función y efecto de Na, Cl y Ca en las plantas | 5 |
| Efectos del NaCl y CaCl ₂ en las plantas..... | 9 |
| Mecanismos de tolerancia a salinidad | 13 |
| El ajuste osmótico | 15 |
| Acumulación de solutos compatibles..... | 15 |
| Exclusión de iones del citoplasma y su inclusión o compartimentación en la vacuola | 17 |
| Eficiencia del uso del agua | 18 |
| Selectividad iónica..... | 19 |
| Efectos de salinidad en aguacate..... | 21 |
| Cultivo <i>in vitro</i> | 23 |
| Cultivo <i>in vitro</i> en aguacate | 25 |
| CAPÍTULO III | |
| MATERIALES Y MÉTODOS | 26 |
| Fase I. Establecimiento <i>in vitro</i> | 26 |
| Material vegetal y proceso de desinfección | 26 |
| Establecimiento <i>in vitro</i> | 27 |
| Medio de cultivo..... | 27 |
| Condiciones de cultivo..... | 27 |
| Fase II. Evaluación del desarrollo y sobrevivencia <i>in vitro</i> | 28 |
| Material utilizado, experimentos y tratamientos | 28 |
| Variables evaluadas en cada experimento | 28 |
| Diseño experimental..... | 29 |

| | |
|---|-----|
| Fase III. Evaluación de parámetros de tolerancia a salinidad en aguacate en cultivo <i>in vitro</i> | 29 |
| Material vegetal utilizado y tratamientos..... | 29 |
| Variables evaluadas | 30 |
| Potencial hídrico y potencial osmótico..... | 30 |
| Análisis estadístico | 32 |
| Fase IV. Cambios anatómicos en la raíz inducidos por salinidad..... | 32 |
| Material vegetal | 32 |
| Procedimiento..... | 32 |
| CAPÍTULO IV | 35 |
| RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 35 |
| Fase II. Evaluación del desarrollo y sobrevivencia <i>in vitro</i> | 35 |
| Establecimiento de ejes embrionarios en NaCl | 35 |
| Establecimiento de ejes embrionarios en CaCl ₂ | 51 |
| Establecimiento de ejes embrionarios en NaCl:CaCl ₂ | 63 |
| Fase III. Evaluación de parámetros de tolerancia a salinidad en aguacate | 74 |
| Parámetros de crecimiento..... | 74 |
| Materia fresca..... | 75 |
| Materia seca | 76 |
| Parámetros fisiológicos y bioquímicos..... | 78 |
| Contenido de agua | 78 |
| Potencial hídrico | 80 |
| Potencial osmótico | 81 |
| Contenido de prolina | 82 |
| Fase IV. Cambios anatómicos en la raíz inducidos por salinidad..... | 87 |
| Diámetro de raíz | 88 |
| Grosor del cortex | 90 |
| Diámetro del cilindro vascular..... | 90 |
| V. CONCLUSIONES | 99 |
| VI. LITERATURA CITADA..... | 101 |
| VII. APÉNDICE | 119 |

ÍNDICE DE CUADROS

| | | |
|------------|--|----|
| Cuadro 1. | Promedios de días a inicio de germinación y porcentaje de germinación, días a inicio de emergencia y porcentaje de emergencia de ejes embrionarios de aguacate criollo y 'Hass' cultivados <i>in vitro</i> en NaCl. | 37 |
| Cuadro 2. | Promedios de las características de crecimiento de aguacate criollo y 'Hass' cultivados <i>in vitro</i> en NaCl. | 40 |
| Cuadro 3. | Promedios del porcentaje de supervivencia calculado en base a respuesta de crecimiento de aguacate criollo y 'Hass' cultivados <i>in vitro</i> en diferentes concentraciones de NaCl (gL^{-1})..... | 47 |
| Cuadro 4. | Promedios del porcentaje de brotes deshidratados y ejes embrionarios oxidados de aguacate criollo y 'Hass' cultivados <i>in vitro</i> en diferentes concentraciones de NaCl (gL^{-1}). | 49 |
| Cuadro 5. | Promedios de días a inicio de germinación y porcentaje de germinación, días a inicio de emergencia y porcentaje de emergencia de ejes embrionarios de aguacate criollo y 'Hass' cultivados <i>in vitro</i> en diferentes concentraciones de CaCl_2 (gL^{-1}). | 53 |
| Cuadro 6. | Respuesta de crecimiento y porcentaje de sobrevivencia de aguacate criollo y 'Hass' cultivado <i>in vitro</i> en diferentes concentraciones de CaCl_2 (gL^{-1}). | 62 |
| Cuadro 7. | Promedios del porcentaje de brotes deshidratados y ejes embrionarios oxidados de aguacate criollo y 'Hass' cultivados <i>in vitro</i> en diferentes concentraciones de CaCl_2 (gL^{-1}). | 62 |
| Cuadro 8. | Respuesta de crecimiento y porcentaje de sobrevivencia de aguacate criollo y 'Hass' cultivado <i>in vitro</i> en diferentes concentraciones de NaCl: CaCl_2 | 73 |
| Cuadro 9. | Porcentaje de plántulas deshidratadas y oxidadas de aguacate criollo y 'Hass' cultivadas <i>in vitro</i> en diferentes concentraciones de NaCl: CaCl_2 (gL^{-1}). | 74 |
| Cuadro 10. | Diámetro total de raíz, grosor del cortex y diámetro de cilindro vascular de plántulas de aguacate criollo crecidas <i>in vitro</i> en condiciones salinas. | 89 |
| Cuadro 11. | Diámetro total de raíz, grosor del cortex y diámetro de cilindro vascular de plántulas de aguacate 'Hass' crecidas <i>in vitro</i> en condiciones salinas. | 89 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | | |
|------------|---|----|
| Figura 1. | Días a inicio de germinación de ejes embrionarios de aguacate criollo y ‘Hass’ cultivados <i>in vitro</i> en diferentes concentraciones de NaCl (gL ⁻¹). 36 | 36 |
| Figura 2. | Porcentaje de Germinación de aguacate criollo y ‘Hass’ a partir de ejes embrionarios cultivados <i>in vitro</i> en diferentes concentraciones de NaCl (gL ⁻¹). 37 | 37 |
| Figura 3. | Días a inicio de emergencia de brotes de aguacate criollo y ‘Hass’ a partir de ejes embrionarios cultivados <i>in vitro</i> en diferentes concentraciones de NaCl (gL ⁻¹). 38 | 38 |
| Figura 4. | Porcentaje de emergencia de plúmula de aguacate criollo y ‘Hass’ a partir de ejes embrionarios cultivados <i>in vitro</i> en diferentes concentraciones de NaCl (gL ⁻¹). 39 | 39 |
| Figura 5. | Longitud de raíz de plántulas de aguacate criollo y ‘Hass’ obtenidas de ejes embrionarios cultivados <i>in vitro</i> en diferentes concentraciones de NaCl (gL ⁻¹) 40 | 40 |
| Figura 6. | Longitud de tallo de brotes de aguacate criollo y ‘Hass’ obtenidas de ejes embrionarios cultivados <i>in vitro</i> en diferentes concentraciones de NaCl (gL ⁻¹) 42 | 42 |
| Figura 8. | Diámetro de tallo en plántulas de aguacate criollo y ‘Hass’ obtenidas de ejes embrionarios a los 65 días de cultivo <i>in vitro</i> en diferentes concentraciones de NaCl (gL ⁻¹). 44 | 44 |
| Figura 9. | Número de hojas por plántula de aguacate criollo y ‘Hass’ obtenidos de ejes embrionarios a los 65 días de cultivo <i>in vitro</i> en diferentes concentraciones de NaCl (gL ⁻¹). 45 | 45 |
| Figura 10. | A) Criollo. Plántula completa con algunas hojas con punta necrosada y hojas caídas (flechas). B) ‘Hass’. Hojas y yemas foliares. 46 | 46 |
| Figura 11. | Supervivencia de aguacate criollo y ‘Hass’ cultivado <i>in vitro</i> en diferentes concentraciones y tipos de sales (gL ⁻¹). A) Eje embrionario crecido en NaCl; B) Eje embrionario crecido en CaCl ₂ ; C) Eje embrionario crecido en NaCl:CaCl ₂ ; D) Plántula crecida en NaCl; E) Plántula crecida en CaCl ₂ ; F) Plántula en NaCl:CaCl ₂ ; G) Brote sin raíz; H) Raíz sin brote; I) Brote con plúmula incipiente..... 48 | 48 |
| Figura 12. | Respuesta que afectó la supervivencia de aguacate criollo y ‘Hass’ cultivado <i>in vitro</i> en diferentes concentraciones de NaCl (gL ⁻¹). A) Ejes embrionarios oxidados; B) Plántulas deshidratadas..... 50 | 50 |

| | |
|--|----|
| Figura 13. Días a inicio de germinación de ejes embrionarios de aguacate criollo y ‘Hass’ cultivados <i>in vitro</i> en diferentes concentraciones de CaCl_2 (gL^{-1}). | 52 |
| Figura 15. Días a inicio de emergencia de brotes de aguacate criollo y ‘Hass’ a partir de ejes embrionarios cultivados <i>in vitro</i> en diferentes concentraciones de CaCl_2 (gL^{-1})..... | 54 |
| Figura 16. Porcentaje de emergencia de plúmula de aguacate criollo y ‘Hass’ a partir de ejes embrionarios cultivados <i>in vitro</i> en diferentes concentraciones de CaCl_2 (gL^{-1}). | 54 |
| Figura 17. Longitud de raíz de plántulas de aguacate criollo y ‘Hass’ obtenidas de ejes embrionarios cultivados <i>in vitro</i> en diferentes concentraciones de CaCl_2 (gL^{-1})..... | 55 |
| Figura 18. Longitud de tallo de brotes de aguacate criollo y ‘Hass’ obtenidas de ejes embrionarios cultivados <i>in vitro</i> en diferentes concentraciones de CaCl_2 (gL^{-1}) | 57 |
| Figura 19. Diámetro de raíz de plántulas de aguacate criollo y ‘Hass’ obtenidas de ejes embrionarios a los 65 días de cultivo <i>in vitro</i> en diferentes concentraciones de CaCl_2 (gL^{-1}) | 58 |
| Figura 20. Diámetro de tallo en plántulas de aguacate criollo y ‘Hass’ obtenidas de ejes embrionarios a los 65 días de cultivo <i>in vitro</i> en diferentes concentraciones de CaCl_2 (gL^{-1})..... | 59 |
| Figura 21. Número de hojas por plántula de aguacate criollo y ‘Hass’ obtenidos de ejes embrionarios a los 65 días de cultivo <i>in vitro</i> en diferentes concentraciones de CaCl_2 (gL^{-1})..... | 60 |
| Figura 22. Días a inicio de germinación de ejes embrionarios de aguacate criollo y ‘Hass’ cultivados <i>in vitro</i> en diferentes concentraciones de $\text{NaCl}:\text{CaCl}_2$ | 64 |
| Figura 23. Porcentaje de germinación de ejes embrionarios de aguacate criollo y ‘Hass’ cultivados <i>in vitro</i> en diferentes concentraciones de $\text{NaCl}:\text{CaCl}_2$ | 65 |
| Figura 24. Días a inicio de emergencia de brotes de aguacate criollo y ‘Hass’ a partir de ejes embrionarios cultivados <i>in vitro</i> en diferentes concentraciones de $\text{NaCl}:\text{CaCl}_2$ (gL^{-1}). | 66 |
| Figura 25. Porcentaje de emergencia de plúmula de aguacate criollo y ‘Hass’ a partir de ejes embrionarios cultivados <i>in vitro</i> en diferentes concentraciones de $\text{NaCl}:\text{CaCl}_2$ (gL^{-1}). | 67 |

| | | |
|------------|--|----|
| Figura 26. | Longitud de raíz de plántulas de aguacate criollo y 'Hass' obtenidas de ejes embrionarios cultivados <i>in vitro</i> en diferentes concentraciones de NaCl:CaCl ₂ (gL ⁻¹). | 68 |
| Figura 27. | Longitud de tallo de brotes de aguacate criollo y 'Hass' obtenidas de ejes embrionarios cultivados <i>in vitro</i> en diferentes concentraciones de NaCl:CaCl ₂ (gL ⁻¹). | 69 |
| Figura 28. | Diámetro de raíz de plántulas de aguacate criollo y 'Hass' obtenidas de ejes embrionarios a los 65 días de cultivo <i>in vitro</i> en diferentes concentraciones de NaCl:CaCl ₂ (gL ⁻¹). | 70 |
| Figura 29. | Diámetro de tallo en plántulas de aguacate criollo y 'Hass' obtenidas de ejes embrionarios a los 65 días de cultivo <i>in vitro</i> en diferentes concentraciones de NaCl:CaCl ₂ (gL ⁻¹). | 71 |
| Figura 30. | Número de hojas por plántula de aguacate criollo y 'Hass' obtenidos de ejes embrionarios a los 65 días de cultivo <i>in vitro</i> en diferentes concentraciones de NaCl:CaCl ₂ (gL ⁻¹). | 72 |
| Figura 31. | Producción de materia fresca de raíz y vástago de aguacate criollo crecido <i>in vitro</i> en diferentes tipos y concentraciones de sales (gL ⁻¹). | 76 |
| Figura 32. | Producción de materia seca de raíz y vástago de aguacate criollo crecido <i>in vitro</i> en diferentes tipos y concentraciones de sales (gL ⁻¹). | 78 |
| Figura 33. | Porcentaje de agua en raíz y vástago de aguacate criollo crecido <i>in vitro</i> en diferentes tipos y concentraciones de sales (gL ⁻¹). | 79 |
| Figura 34. | Potencial hídrico en raíz y vástago de aguacate criollo crecido <i>in vitro</i> en diferentes tipos y concentraciones de sales (gL ⁻¹). | 81 |
| Figura 35. | Potencial osmótico en raíz y vástago de aguacate criollo crecido <i>in vitro</i> en diferentes tipos y concentraciones de sales (gL ⁻¹). | 82 |
| Figura 36. | Contenido de prolina (μmol·g ⁻¹ materia liofilizada) en raíz y vástago de aguacate criollo crecido <i>in vitro</i> en diferentes tipos y concentraciones de sales (gL ⁻¹). | 84 |
| Figura 37. | Contenido de calcio (mg·kg ⁻¹ materia seca) en raíz y vástago de aguacate criollo crecido <i>in vitro</i> en diferentes tipos y concentraciones de sales (gL ⁻¹). | 85 |
| Figura 38. | Contenido de sodio (mg·kg ⁻¹ materia seca) en raíz y vástago de aguacate criollo crecido <i>in vitro</i> en diferentes tipos y concentraciones de sales (gL ⁻¹). | 87 |

- Figura 39. Cortes transversales de raíces de aguacate criollo a los 65 días después de su cultivo *in vitro* en condiciones salinas. A= Testigo; B= 0.1 gL⁻¹ de NaCl; C= 0.3 gL⁻¹ de NaCl. Ct:cortex, Cv:cilindro vascular, Ep:epidermis, Ex:exodermis, F:floema, Me:médula, Pc:pared celular lignificada, Vx:vasos de xilema, Xi:xilema. 93
- Figura 40. Cortes transversales de raíces de aguacate criollo a los 65 días después de su cultivo *in vitro* en condiciones salinas. A= Testigo; B= 0.1 gL⁻¹ de CaCl₂; C= 0.3 gL⁻¹ de CaCl₂. Ct:cortex, Cv:cilindro vascular, Ep:epidermis, Ex:exodermis, F:floema, Me:médula, Pc:pared celular lignificada, Vx:vasos de xilema, Xi:xilema. 94
- Figura 41. Cortes transversales de raíces de aguacate criollo a los 65 días después de su cultivo *in vitro* en condiciones salinas. A= Testigo; B= 0.1:0.1 gL⁻¹ de NaCl:CaCl₂; C=0.3:0.3 gL⁻¹ de NaCl:CaCl₂. Ct:cortex, Cv:cilindro vascular Ep:epidermis, Ex:exodermis, F:floema, Ga:gránulos de almidón, Me:médula, Pc:pared celular, Xi:xilema. 95
- Figura 42. Cortes transversales de raíces de aguacate 'Hass' a los 65 días después de su cultivo *in vitro* en condiciones salinas. A= Testigo; B= 0.7 gL⁻¹ de NaCl; C= 0.1 gL⁻¹ de CaCl₂. Ct:cortex, Cv:cilindro vascular, Ep:epidermis, Ex:exodermis, Ga:gránulos de almidón, Me:médula, Xi:xilema. 97

ÍNDICE DE CUADROS EN EL APÉNDICE

| | | |
|------------|--|-----|
| Cuadro 1A. | Concentración de macro y micronutrientes contenidos en el medio Murashige and Skoog ¹ (1962)..... | 119 |
| Cuadro 2A. | Significancia estadística, R ² , C.V. y Media general entre tratamientos de las variables evaluadas durante el desarrollo y sobrevivencia <i>in vitro</i> de ejes embrionarios de aguacate criollo y 'Hass' establecidos en NaCl. | 119 |
| Cuadro 3A. | Significancia estadística, R ² , C.V. y Media general entre tratamientos de las variables evaluadas durante el desarrollo y sobrevivencia <i>in vitro</i> de ejes embrionarios de aguacate criollo y 'Hass' establecidos en CaCl ₂ | 120 |
| Cuadro 4A. | Significancia estadística, R ² , C.V. y Media general entre tratamientos de las variables evaluadas durante el desarrollo y sobrevivencia <i>in vitro</i> de ejes embrionarios de aguacate criollo y 'Hass' establecidos en NaCl:CaCl ₂ | 120 |
| Cuadro 5A. | Significancia de la fuente de variación de las variables durante el desarrollo y sobrevivencia <i>in vitro</i> de ejes embrionarios de aguacate criollo y 'Hass' establecidos en NaCl..... | 120 |
| Cuadro 6A. | Significancia de la fuente de variación de las variables durante el desarrollo y sobrevivencia <i>in vitro</i> de ejes embrionarios de aguacate criollo y 'Hass' establecidos en CaCl ₂ | 121 |
| Cuadro 7A. | Significancia de la fuente de variación de las variables durante el desarrollo y sobrevivencia <i>in vitro</i> de ejes embrionarios de aguacate criollo y 'Hass' establecidos en NaCl:CaCl ₂ | 121 |
| Cuadro 8A. | Significancia estadística, R ² , C.V. y media general entre tratamientos de los parámetros de tolerancia a salinidad evaluados a las plántulas producidas vía ejes embrionarios de aguacate criollo establecidos <i>in vitro</i> en NaCl, CaCl ₂ y NaCl:CaCl ₂ | 121 |

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

La salinidad, ocasionada específicamente por la acumulación de NaCl en los suelos, es uno de los factores abióticos causantes de estrés, que provocan pérdidas económicas, en la agricultura mundial (Zhu, 2002; Xu y Shi, 2007). Debido a la salinización paulatina de los suelos, se predice que la pérdida de los suelos cultivables será del 30 % en los próximos 25 años y del 50 % para el 2050 (Wang *et al.*, 2003).

La mayoría de las investigaciones enfocadas al estudio de los efectos del estrés, han identificado que el estrés osmótico y el estrés iónico son los componentes principalmente involucrados en el daño a las plantas (Hasegawa *et al.*, 2000; Xu y Shi, 2007; Munns y Tester, 2008). El estrés osmótico es el efecto de las sales totales disueltas en el suelo que reduce la cantidad de agua que puede ser absorbida por las raíces; el estrés iónico ocurre debido a la absorción y acumulación de cloro y sodio en los tejidos de la planta (Crowley, 2008). Estos dos aspectos afectan inicialmente la división y alargamiento de las células radicales, lo que trae como consecuencia cambios morfológicos, fisiológicos, bioquímicos y anatómicos que conllevan a inhibir el crecimiento en la mayoría de las plantas y la productividad en muchos cultivos frutícolas (Flowers, 2007; Munns y Tester, 2008), entre los que se encuentra *Persea americana*, comúnmente nombrado aguacate (Embleton *et al.*, 1964; Ben-Ya'acov y Zilberstaine, 1999a; Mickerlbart y Arpaia, 2002).

En México, el aguacate es un cultivo de importancia económica, de acuerdo a la superficie cultivada (133,441 ha), ubicada principalmente en los estados de Michoacán, Jalisco, Morelos, México, Nayarit y Guerrero (SIAP-SAGARPA, 2010). Su distribución es afectada por ser una de las especies frutales más sensibles a la salinidad (C.E. menor a $3 \text{ dS}\cdot\text{m}^{-1}$) principalmente por la presencia de NaCl en el suelo y en el agua de riego (Bernstein *et al.*, 2001; Mickerlbart y Arpaia, 2002). En campo se ha encontrado, que los síntomas de toxicidad por el exceso de Cl son más comunes que los provocados por Na (Salazar-García y Cortés-Flores, 1988; Lahav, 2003). El cloro (Cl)

inhibe el crecimiento de la raíz, disminuye el tamaño del árbol y quema las hojas adultas, principalmente; la toxicidad inicia con necrosis apical y marginal que avanza al centro de la hoja. Cuando la necrosis cubre más del 50 % de la hoja, provoca su caída prematura, lo que conlleva a afectar los procesos fisiológicos, como la fotosíntesis y por ende la producción. En el caso del sodio (Na), su acumulación es paulatina, lo que produce una toxicidad que se observa, primeramente, como una necrosis en el margen y entre las nervaduras de las hojas produciendo la muerte de los brotes y, además, de daños en el sistema radical (Salazar-García *et al.*, 1987; Chirachint y Turner, 1988; Lahav, 2003; Bernstein *et al.*, 2004; Castro *et al.*, 2009). En huertos de aguacate se observó que el crecimiento de raíces fue más limitado por salinidad que el crecimiento de brotes (Salazar *et al.*, 1987; Bernstein *et al.*, 2004); no obstante, la sensibilidad o tolerancia al exceso de cloro y sodio varían entre cultivares y entre portainjertos (Bernstein, 1981). Esto se debe a que existen materiales que desarrollan mecanismos de tolerancia a condiciones de estrés (Munns y Tester, 2008), tales como: la exclusión (Hu y Schmidhalter, 2005) e inclusión de iones (Ashraf, 1994); la compartimentación de sales en la vacuola (Yamaguchi y Blumwald, 2005) y la capacidad de ajuste osmótico, entre otros. El ajuste osmótico permite mantener turgencia celular e induce que el crecimiento prosiga, al igual que la producción de metabolitos orgánicos (Hasegawa *et al.*, 2000). Empero, en aguacate, este tipo de información es escasa.

Existen varias formas para manejar suelos con problemas de salinidad, pero, la mayoría de ellas sólo son temporales. Una opción permanente, para superar esta situación, es el uso de portainjertos tolerantes al exceso de sales. En México existe poca investigación dirigida a la obtención de materiales tolerantes o bien a la selección y evaluación de portainjertos tolerantes a salinidad (Ben-Ya'acov y Zilberstaine, 1999; Pire *et al.*, 2007). Esto se debe, posiblemente, a que la metodología que se utiliza en la producción de materiales y la evaluación de tolerancia en experimentos de campo, implican periodos mayores a 10 años, y generalmente, los resultados son afectados por muchas variables ambientales (Salazar-García *et al.*, 1987; Ben-Ya'acov y Zilberstaine, 1999a).

La investigación *in vitro* es una opción, para seleccionar materiales vegetales tolerantes a salinidad, en corto tiempo (Zhang, 1994), debido a que se pueden realizar estudios de los procesos fisiológicos y bioquímicos inherentes a la célula y detectar los que contribuyen a la tolerancia del estrés salino (Dix, 19993; Hasegawa *et al.*, 2000; Ehsanpour y Fatahian, 2003). Se demostró que el cultivo *in vitro* de embriones maduros es útil, porque son más competentes para dar origen a procesos organogénicos (Hartmann *et al.*, 1993) y como un material inicial para la propagación de especies, como *Nothofagus procera* (Sánchez-Olate *et al.*, 2004) y *Cucumis sativus* (Akinci y Simsek, 2004). En aguacate, según Fuentes *et al.* (2004), el cultivo *in vitro* de embriones maduros es un método empleado con fines de mejoramiento, por la variación genética natural que presentan y de acuerdo con González *et al.* (2003), es una técnica que puede ser útil para identificar materiales tolerantes por su capacidad de ajuste osmótico por la acumulación de solutos. Sin embargo, muchos aspectos se desconocen de su respuesta en condiciones salinas, por lo que aún es necesario conocer más acerca de la activación de mecanismos naturales, que le permitan tolerar las condiciones de salinidad o al exceso de cloruros, para que su utilidad como portainjerto pudiera ser desarrollada. En este sentido, el presente trabajo tuvo como objetivo general: conocer los efectos de salinidad en el desarrollo y anatomía de embriones maduros de dos tipos de aguacate cultivados *in vitro* e identificar alguna fuente de tolerancia al estrés salino.

Objetivos específicos:

- Evaluar la germinación, emergencia, respuesta de crecimiento y sobrevivencia de ejes embrionarios de aguacate 'Hass' y criollo, sometidos a diferentes concentraciones de dos tipos de sales (NaCl y CaCl₂) en cultivo *in vitro*.
- Evaluar el contenido de agua, potencial hídrico y osmótico en células de tallo y raíz de aguacate criollo, sometidas a estrés salino durante su ciclo de crecimiento *in vitro*.
- Medir la acumulación de prolina, Na y Ca en tejido de tallo y raíz, de aguacate criollo sometido a salinidad, en cultivo *in vitro*.
- Identificar diferencias anatómicas en raíces de aguacate 'Hass' y criollo crecidas *in vitro* en condiciones salinas.

CAPÍTULO II

REVISION DE LITERATURA

Aspectos generales de salinidad

En el mundo existen 14 billones de hectáreas cultivables y alrededor de 3.2 billones son dedicadas a la producción agrícola, de estas, 2% tienen problemas de salinidad; condición presente en prácticamente todas las regiones climáticas en diferentes altitudes (Singh y Chatrath, 2001); aunque más acentuada, en zonas áridas, semiáridas y las cercanas a los océanos (Akhtar, 2006). De los aproximadamente 30 millones de hectáreas de tierras irrigadas, de 0.25 a 0.5 millones pierden su producción cada año como resultado de la acumulación de sales (Shani *et al.*, 2005). Debido al incremento de la salinización de los suelos, se predice que la pérdida de los suelos cultivables será del 30 % en los próximos 25 años y del 50 % para el 2050 (Wang *et al.*, 2003).

En México, SEMARNAT (2002) reporta alrededor de 6 200 000 ha, degradadas por salinidad, en su mayoría representadas por suelos que de forma natural son salinos, debido a las condiciones ambientales prevalecientes en el país (Sánchez, 2003). De los 5.5 millones de hectáreas de suelo irrigados, aproximadamente 30% presentan problemas de salinidad (Barkla *et al.*, 2007), debido posiblemente a que el agua de riego es la fuente principal de Na y Cl. Se considera que el empleo de agua de calidad baja para riego, la aplicación excesiva de fertilizantes minerales y los suelos con drenaje deficiente, son las razones principales para incrementar el problema de salinidad en los suelos de cultivo (González-Rosas *et al.*, 2003; Aktas *et al.*, 2006). La mayoría de las plantas de importancia agrícola son sensibles a la salinidad y su producción es significativamente reducida cuando se cultivan en suelos salinos (Barkla *et al.*, 2007).

Un suelo salino puede ser definido como un suelo que tiene conductividad eléctrica en el extracto de saturación (CEe) $>4 \text{ dS m}^{-1}$ (United States Salinity Laboratory

Staff, 1954; Chinnusamy *et al.*, 2005), que equivale a 40 mM de NaCl y una presión osmótica de -0.2 MPa; pH <8.5; menos de 15 % de sodio intercambiable (PSI) y relación de adsorción del sodio (RAS) inferior a 13 (Davis *et al.*, 2004; Munns y Tester, 2008; Vijayan, 2009).

Los iones que favorecen la salinidad de los suelos, en concentración y proporción variable, son: cloro, sulfatos, bicarbonatos, sodio, calcio, magnesio, boro, yodo y en algunos casos nitratos, potasio, cobre, zinc y bromo. Entre las sales más solubles en el suelo se encuentran: NaCl, MgSO₄, Na₂SO₄, Na₂CO₃, NaHCO₃ y MgCl₂. (Bernstein, 1975; Epstein y Rains, 1987; Sánchez, 2003). Sin embargo, el Na y Cl son los iones que predominan en suelos salinos (Villa-Castoreña *et al.*, 2006; Munns y Tester, 2008); debido a que por lo general, son agregados por el agua de riego y su acumulación daña la estructura del suelo (Singh y Chatrath, 2001).

Las plantas difieren su respuesta de crecimiento a la salinidad. Las que son capaces de completar su ciclo de vida a concentraciones altas de sales son llamadas halófitas (400 mM NaCl); en contraste, las plantas que no toleran los ambientes salinos y modifican su patrón de crecimiento son denominadas glicófitas (Hasegawa *et al.*, 2000; Barkla *et al.*, 2007; Flowers, 2004).

Función y efecto de Na, Cl y Ca en las plantas

El ion Na está presente en los suelos y en el agua; aunque es absorbido y utilizado por las plantas no es considerado como nutrimento esencial para la mayoría de ellas. Se ha comprobado, en ciertas halófitas su esencialidad y en algunas especies C₄ como micronutrimento, al tener un papel específico en su metabolismo (Smith *et al.*, 1980; Subbarao *et al.*, 2003; Barkla *et al.*, 2007); en este tipo de plantas, el Na en algunas ocasiones actúa como ahorrador de potasio, el cual es el principal regulador del estado hídrico de la célula (Mathews y Van Holde, 1999) y toma parte en la síntesis de los cloroplastos (Johnston *et al.*, 1988). Algunas especies con metabolismo C₄ son: *Atriplex vesicaria*, *A. tricolor*, *Kochia childsii*, *Panicum miliaceum* y *Distichlis spicata* L.;

otras plantas, que requieren sodio para su óptimo desarrollo son los cultivos: apio, espinaca, remolacha azucarera, betabel y nabo (Subbarao *et al.*, 2003).

Las plantas varían su habilidad de absorber y transportar Na a los brotes (Shone *et al.*, 1969). Las especies que absorben Na, lo traslocan libremente a los tallos, lo retienen en concentraciones bajas en la raíz, tienen proporción baja K/Na en las hojas, reemplazan el K no solo en sus funciones como un soluto osmóticamente activo en las vacuolas, sino en algunas funciones específicas en el metabolismo celular y que puede ser más efectivo que el K en la prevención del estrés hídrico asociado con salinidad, son llamadas natrofílicas. La capacidad, que tiene este tipo de plantas, de trasladar grandes cantidades de Na a los brotes, varía entre las especies, donde las halófitas representan mayormente este grupo (Smith *et al.*, 1980; Subbarao *et al.*, 2003; Morales *et al.*, 2008). Las plantas que no absorben fácilmente Na, o si lo absorben, cuando están sujetas a concentraciones altas en la zona radical (≥ 100 mM) y lo retienen en la raíz con escasa traslocación a los brotes, son denominadas natrofóbicas (Shone *et al.*, 1969; Smith *et al.*, 1980). En estas últimas, se menciona que los mecanismos fisiológicos que regulan los niveles de Na, son para dirigirlo a otro sitio (Cheeseman, 1988; Subbarao y Johansen, 2002). En las plantas natrofóbicas tropicales en comparación a las natrofóbicas templadas y las natrofílicas, el Na es retenido en mayor proporción en las raíces y la proporción K/Na es más alta en las hojas (Smith *et al.*, 1980).

La diferencia de absorción y traslocación, puede ser indicada por el proceso de transpiración. En la mayoría de las especies natrofílicas la mayor acumulación de Na es en las hojas, cuya tasa de transpiración es mayor en comparación de las natrofóbicas templadas y las natrofóbicas tropicales (Sinha y Singh, 1976; Smith *et al.*, 1980). Maathuis y Amtmann (1999) y Tester y Davenport (2003) indican que el Na es transportado a los brotes a través del xilema por transpiración y puede ser retornado a la raíz vía floema; sin embargo, por las pocas evidencias de la recirculación de los brotes a la raíz, se considera que el Na es unidireccional. Su acumulación es progresiva en las hojas conforme estas maduran, ocasionando problemas osmóticos y metabólicos

(Tester y Davenport, 2003). La sintomatología visual en las hojas, debido a su efecto tóxico o como un síntoma típico de desorden nutricional, es: la deshidratación celular, necrosis del tejido y muerte de la parte afectada (Tarakcioglu y Inal, 2002). Estos síntomas son comunes, cuando el nivel de Na y la proporción Na/K es alta, por la habilidad del Na de competir con el K en sitios comunes de absorción en la raíz, por ser cationes monovalentes similares química y estructuralmente, con un radio iónico hidratado de 0.358 nm de Na y 0.331 nm de K, que no limitan su absorción. Esta situación altera las funciones del K en varios procesos enzimáticos en el citoplasma y el Na no puede ejercer esas funciones en la célula (Bhandal y Malik, 1988; Tester y Davenport, 2003) y, reduce la absorción de iones esenciales del suelo como NO_3^- , K y Ca. Muchos de los efectos del Na parecen estar relacionados con la integridad estructural y funcional de las membranas, como la pérdida de la permeabilidad y selectividad (Blumenthal-Goldschmidt *et al.*, 1968; Flowers y Läuchli, 1983; Leopold y Willing, 1984; Renault *et al.*, 2001). Algunos efectos atribuidos al sodio también pueden ser debidos a los iones cloruro, por ser el ion acompañante de sodio y fuente usual de NaCl en los suelos (Alcántar *et al.*, 2007).

El cloro, es el ión de mayor movilidad; es absorbido tanto por las raíces como por las hojas; en el suelo se encuentra en forma de cloruro y así es absorbido por la planta (Alcántar *et al.*, 2007). La mayoría de las plantas absorben de 10 a 100 veces más de lo que necesitan, debido posiblemente a su elevada solubilidad y disponibilidad en los suelos (Salisbury y Ross, 1994). Se han reportado más de 130 compuestos orgánicos que lo contienen en pequeñas cantidades, algunos de ellos con actividad fungicida, otros como antibióticos y unos más como hormona natural tipo auxina (4-cloroindolacético) (Engvild, 1986). Se considera un elemento esencial en el metabolismo de las plantas, debido a que participa en la oxidación de la molécula de H_2O en el fotosistema II (PS II) durante la fotosíntesis (Salisbury y Ross, 1994); es el anión principal de la vacuola y tiene un papel importante como osmorregulador en las raíces; como ión acompañante del K, es esencial en el cierre y apertura de estomas (Churchill y Sze, 1984; Marschner, 2002); estimula la síntesis de asparagina sintetasa, enzima que funciona en el metabolismo del nitrógeno (Rognes, 1980). Aún cuando

realiza funciones importantes en el metabolismo de las plantas, a concentraciones altas en el suelo, el Cl llega a ser tóxico (Abel y Mackenzie, 1964; Bernstein, 1975; Marschner, 1995; Zhu, 2001). Provoca quemaduras, amarillamiento y caída prematura de las hojas; disminuye la fotosíntesis e inhibe la absorción de nitratos y sulfatos (Zekri y Parsons, 1992). Incrementa la elongación de las células de empalizada, ocasionando engrosamiento, succulencia de las hojas y, en especies como en las crucíferas y algunos pastos la cutícula de las hojas se torna de color verde grisáceo (Bernstein, 1975; Shannon, 1992; Singh y Chatrath, 2001). En los cultivos sensibles, se considera que la reducción de los rendimientos y la calidad de la producción, están asociados a niveles de 0.5 a 2 % de Cl presente en los tejidos y más del 4 % en la materia seca de especies tolerantes (Reisenauer *et al.*, 1973).

En la mayoría de las especies, los estudios se han enfocado más al efecto del Na en la planta que al Cl, posiblemente, por ser el ión que alcanza concentraciones tóxicas, rápida y fácilmente (Subbarao *et al.*, 2003). A pesar de que, no se ha definido la concentración tóxica del Cl, este ion es considerado tóxico en soya, cítricos, uvas y aguacate (Storey y Walker, 1999; Bernstein *et al.*, 2004).

El calcio, es un nutrimento inmóvil, absorbido del suelo como un catión divalente. Las zonas meristemáticas (de raíces, tallos y hojas) son las de mayor demanda (Salisbury y Ross, 1994). Es un nutrimento esencial e importante en la división celular, en la estabilidad de la membrana y pared celular. Asociado con proteínas localizadas en el citosol de la célula vegetal (calmodulinas) cumple funciones de mensajero secundario. Puede participar en el equilibrio electrostático de la célula, debido a la cantidad alta que normalmente se encuentra en las vacuolas (Alcántar *et al.*, 2007). La elasticidad de las paredes celulares se debe a que forma un complejo quelatado estable unido a los pectatos de la lámina media (Marschner, 2002). Es necesario en la germinación, favorece el crecimiento radical y es requerido por el mecanismo selectivo de absorción del plasmalema (Hewwit, 1983). En las plantas, los primeros síntomas de deficiencia son evidentes en las hojas jóvenes (Alcántar *et al.*, 2007). En condiciones salinas, es esencial por su papel señalizador, su función estructural en la membrana y

su efecto sobre la actividad de algunos transportadores iónicos (Rengel, 1992; Marschner, 1995). Es decir, es capaz de proteger la absorción y evitar la pérdida de K, al inhibir el efecto de Na presente a concentraciones altas y mantener la capacidad selectiva K/Na (Epstein, 1961; Zhu, 2000). Mantener una relación alta K/Na, es una función importante por ser el K el principal regulador del estado hídrico de la célula (Mathews y Van Holde, 1999) y activador o cofactor de más de 50 enzimas (cinasas, sintetasas, deshidratasas, aldolasas, deshidrogenasas) del metabolismo de carbohidratos y proteínas (Tester y Davenport, 2003).

Efectos del NaCl y CaCl₂ en las plantas

La salinidad de los suelos, es un factor abiótico, que causa a la planta, estrés y daño durante su periodo de crecimiento y desarrollo. Generalmente los síntomas, son atribuidos al estrés hídrico, toxicidad por un ión específico y desbalance nutrimental (Akinci y Simsek, 2004). Por su parte, Xu y Shi (2007) mencionan que las plantas sufren en primer lugar estrés iónico y osmótico; en segundo término, desbalance nutrimental (exceso o deficiencia) y estrés oxidativo. En tanto que, Munns y Tester (2008) lo resumen en estrés osmótico y el estrés iónico. Sin embargo, coinciden en que la concentración alta de sales en el suelo dificulta la absorción de agua por las raíces y en la planta puede ser tóxica. El efecto inmediato en la zona radical es inhibir el crecimiento celular y afectar su metabolismo; en la planta altera sus funciones fisiológicas (Shannon, 1992; Xu y Shi, 2007; Munns y Tester, 2008). Los efectos negativos del estrés osmótico son rápidamente visibles al inhibir el crecimiento de los brotes nuevos, mientras que el efecto iónico es lento y conforme se acumula en las hojas maduras acelera su senescencia e impacta el crecimiento mucho más tarde (Munns y Tester, 2008).

Los efectos de estrés por sales, específicamente por la presencia de NaCl en el suelo, ocasionan a nivel celular, tejido y órgano cambios morfológicos, fisiológicos, bioquímicos y anatómicos, que conllevan a inhibir el crecimiento en la mayoría de las plantas y la productividad en muchos cultivos (Shannon, 1992; Akhtar *et al.*, 2001;

Jaleel *et al.*, 2007; Munns y Tester, 2008). Efectos que varían con la especie, estado de desarrollo de la planta, el tipo de sal, la concentración y el tiempo de exposición (Singh y Chatrath, 2001; Ye *et al.*, 2005). A nivel celular, la división y el alargamiento celular, directa o indirectamente afectados por la salinidad, ocasiona que los puntos de crecimiento sean inhibidos y como resultado los tallos y las hojas de las plantas producidas presentan síntomas de raquitismo (Munns *et al.*, 1982; Munns y Tester, 2008). Entre los procesos fisiológicos y moleculares involucrados se encuentran: el cierre de estomas, disminución del contenido de agua, inhibición de la fotosíntesis, reducción de la tasa respiratoria, alteración en la expresión génica, descenso en la síntesis de proteínas y/o incremento en la hidrólisis de las proteínas. Aspectos que pueden inhibir la acumulación de aminoácidos libres como la prolina, aumentar la formación de radicales libres de oxígeno, reducir la replicación de ADN y división celular y por consecuencia la reducción del crecimiento y producción de los cultivos (Hassaneim, 2004).

En condiciones salinas la primer respuesta perceptible es la inhibición de crecimiento de brotes y raíces (Lazof y Bernstein, 1998; Munns, 1993). La raíz es el órgano inmediato que sufre la salinidad más que las hojas (Jaleel *et al.*, 2007); sin embargo, el primer síntoma visible es la reducción de la expansión de la hoja en la mayoría de las plantas (Parida y Das, 2005) como una reacción ante el estrés para conservar energía (Jaleel *et al.*, 2008) o a la detención de crecimiento por la acumulación de sales (Prisco y O'Leary, 1970). Las raíces son importantes porque están en contacto directo con el medio de desarrollo, del cual absorben agua y nutrimentos para proveer al resto de la planta (Jamil *et al.*, 2004). Por su parte, el tallo es también importante por contener los tejidos vasculares o de conducción y la hoja por ser el órgano dinámico donde la concentración de nutrimentos está cambiando constantemente (Bárcenas *et al.*, 2003).

Passera y Albuzio (1997) explican que, el impacto de la salinidad en la reducción del área foliar, al influir en el crecimiento, expansión y duración de la hoja, tiene como resultado la reducción de la fotosíntesis y respiración por unidad de área. El cierre de

estomas también puede afectar la fotosíntesis, inhibir el transporte de agua y de elementos necesarios para el crecimiento de las plantas; además, de afectar el proceso de transpiración. Eventos asociados a los cambios en los niveles hormonales (ácido abscísico, etileno, entre otros) y cambios en la síntesis de proteínas (Singh y Chatrath, 2001; Mahajan y Tuteja, 2005).

Las causas del agotamiento de las plantas en los suelos salinizados, es la absorción y la acumulación de iones hidrofílicos osmóticamente activos en las células vegetales, entre los que destacan el Na y Cl; elementos que provocan una modificación en la homeostasis iónico-osmótica y en el sistema acuoso del citoplasma, lo que a su vez altera el metabolismo de la planta, que inevitablemente reducen la eficiencia de todas las reacciones de síntesis y que se manifiestan en la disminución el crecimiento y el rendimiento en los cultivos (Zhu, 2003; González *et al.*, 2002). No obstante, los mecanismos exactos de la inhibición del crecimiento en condiciones de estrés salino no son claros por completo, dado que la salinidad puede tener efecto diferente en el proceso de crecimiento de acuerdo al tipo de planta (Casierra-Posada y Rodríguez, 2006).

La inhibición del crecimiento se considera asociado a la reducción del potencial hídrico (efecto osmótico), desequilibrio nutrimental (exceso o deficiencia); fitotoxicidad por sales y al estrés oxidativo (Lazof y Bernstein, 1998; Singh y Chatrath, 2001; Akhtar, 2006; Xu y Shi, 2007; Munns y Tester, 2008). El agua, por ser el principal componente de la célula y tejidos de todos los seres vivos, y la manera como se regula la entrada y salida en las células, debe ser uno de los aspectos más importantes de la fisiología de los organismos en general (Barkla *et al.*, 2007). En ambientes salinos, el agua disponible para las plantas es regulada por el efecto de iones móviles en ella (Sancho *et al.*, 1996). Con respecto al efecto del ión específico, se atribuye que ciertos iones en el suelo son perjudiciales para el cultivo, debido a que operan en concentraciones bajas o altas y logran que nutrimentos como K, Ca, P, NO₃, no estén disponibles para la planta, al modificar la estructura del suelo dejándolo inestable o, a que distorsionan su absorción y distribución en la planta (Epstein, 1972; West, 1986). El estrés oxidativo puede ser debido a que la acumulación de Na y Cl en los tejidos, promueve la

formación de especies reactivas al oxígeno (ROS) ocasionando daños en los lípidos de la membrana, oxidación de las proteínas y en los ácidos nucleicos (Askraf y McNeilly, 2004; Xu y Shi, 2007).

En trigo, el estrés salino induce adelanto de la floración, reduce el contenido de materia seca, incrementa la proporción raíz:brote, disminuye el tamaño de las hojas y de los rendimientos; esto último es atribuido al reducido número de semillas, espigas y vástagos, así como al peso bajo de la semilla (Singh y Chatrath, 2001). El aumento de sales en el suelo (0.13, 9.11 y 15.19 dS m⁻¹), retarda la germinación de semillas de *Sagittaria latifolia* (Delesalle y Blum, 1994), situación similar sucedió en semillas de maíz de diferentes pesos, sin importar el tamaño (Layne-Garsaball *et al.*, 2007). La germinación puede ser inhibida por la salinidad, desde el momento que la semilla no es capaz de adquirir agua por el proceso físico de imbibición, ocasionando retraso en la activación metabólica necesaria para el desenvolvimiento meristemático y la posterior movilización de las reservas de la semilla, útiles para el crecimiento del embrión y la emisión radical y/o por la absorción excesiva de iones tóxicos, específicamente Na y Cl (Ayer y Hayward, 1948; Prisco y O'Leary, 1970; Prisco *et al.*, 1981; Jamil *et al.*, 2006). No obstante, la germinación de las semillas puede ser menos afectada que el crecimiento de las plantas (Ungar, 1996).

Casierra-Posada y Rodríguez (2006) manifiestan, que en la mayoría de los cultivos, el crecimiento de los brotes es más sensible a la salinidad que el crecimiento de la raíz. En remolacha, el porcentaje de fotosíntesis por unidad de área foliar se redujo a concentraciones de 200 a 300 M/m⁻³ NaCl, sin afectar la respiración (Norman y Waldron, 1984). En variedades tolerantes de caña de azúcar, la materia seca, el contenido de agua, el área foliar, la tasa fotosintética, la conductancia estomática, el área de las células de la epidermis y del mesófilo, disminuyeron conforme la salinidad se incrementó (0, 8 y 12 dS m⁻¹); la inhibición del crecimiento de las células del mesófilo, afectó negativamente la capacidad fotosintética de la hoja y por consiguiente la eficiencia fotosintética de la planta (Akhtar *et al.*, 2001). Song *et al.* (2006) encontraron en arroz, que la transpiración y el estado hídrico decrecieron conforme

incrementó la concentración de Na en la solución nutritiva. Por su parte, Netondo *et al.* (2004) mostraron que en plantas de sorgo, el crecimiento de tallos y área foliar disminuyeron cuando se expusieron a 250 mM de NaCl. Resultados similares se han reportado en cebada (Delane *et al.*, 1982), arroz (Zeng y Shannon, 2000) y en plantas de guayabo del Brasil o guayaba piña (Casierra-Posada y Rodríguez, 2006).

El suplemento de Ca reduce el flujo del Na, mejora la selectividad de K/Na e interrumpe la inhibición del crecimiento típico de la mayoría de las plantas expuestas a estrés salino (Gerard, 1971; Cramer *et al.*, 1986; Song *et al.*, 2006). En *Brassica* spp, la adición de Ca no disminuyó la concentración de Na en los brotes, pero si mejoró su crecimiento (Essah *et al.*, 2003). En plantas de frijol expuestas a 50 mM de NaCl y elevados niveles de Ca minimizó la absorción de Na y restableció el crecimiento (LaHaye y Epstein, 1971). En plántulas de algodón (*Gossypium hirsutum* L.), la velocidad de producción celular disminuyó en el intervalo de 25 a 100 mM de NaCl; con la adición de 10 mM de Ca, la longitud y el peso de la raíz mejoró, la producción de células corticales aumentó aproximadamente del 20 al 30 %, fueron más largas y gruesas que las originadas por las plantas control (Kurth *et al.*, 1986). Essah *et al.* (2003) reportan que en *Arabidopsis*, las plantas establecidas a 50 mM de NaCl, el crecimiento se inhibió, la materia fresca y seca disminuyeron del 30 al 50 %, comparado con el testigo; con la adición de Ca la supervivencia de las plantas aumentó conforme se incrementó su concentración (0.05, 0.2 a 3 mM de Ca). Para poder adecuarse a condiciones salinas, la mayoría de las plantas han desarrollado mecanismos de tolerancia, que se reflejan en diversas formas durante su desarrollo (Munns, 2002; Barkla *et al.*, 2007; Munns y Tester, 2008).

Mecanismos de tolerancia a salinidad

Desde el punto de vista biológico, la tolerancia a la salinidad es la habilidad desarrollada por la planta para crecer, completar su ciclo de vida y perpetuar la especie en un sustrato que contiene concentraciones altas de sales solubles (Parida y Das, 2005). Desde el punto de vista agronómico, es la habilidad de las plantas de sobrevivir y

producir rendimientos económicos en condiciones de estrés con respecto a sus rendimientos en condiciones normales (González *et al.*, 2002). Shannon (1985), Flowers (2004) y Munns y Tester (2008) indicaron, que la tolerancia es una propiedad complicada que involucra cambios morfológicos y de desarrollo, en estrecha relación con los principales procesos fisiológicos y bioquímicos que operan en las plantas, que varía entre géneros, especies y entre genotipos o variedades de una misma especie. Por ejemplo, de los cereales, el arroz (*Oryza sativa*) es el más sensible y la cebada (*Hordeum vulgare*) es la más tolerante. El trigo de pan (*Triticum aestivum*) es moderadamente tolerante y trigo duro (*Triticum turgidum ssp durum*) es menos tolerante. En leguminosas, el frijol (*Phaseolus vulgaris*) es más sensible que el arroz; la alfalfa (*Medicago sativa*) es muy tolerante (Munns y Tester, 2008).

Algunos mecanismos por los cuales las especies vegetales toleran salinidad, están relacionados con propiedades intrínsecas de células individuales; las más comunes son: la exclusión (Hu y Schmidhalter, 2005) e inclusión de iones (Ashraf, 1994); la compartimentación de sales en la vacuola (Yamaguchi y Blumwald, 2005); deposición de iones tóxicos dentro de la corteza, radio celular, paredes de las traqueidas, lumen, hojas senescentes; la presencia de glándulas especiales en las hojas para secretar concentraciones altas de sales y la disminución en la ramificación de las raíces (Niknam y Mc Comb, 2000); la acumulación de K en el citoplasma que disminuye los efectos tóxicos de iones como Na (Volkow *et al.*, 2003; Zhao *et al.*, 2004); la capacidad de ajuste osmótico para mantener turgencia celular para que el crecimiento prosiga y la producción de metabolitos orgánicos como consecuencia del ajuste osmótico (Hasegawa *et al.*, 2000). Los mecanismos de tolerancia están enfocados en tres categorías: la tolerancia al estrés osmótico, la exclusión e inclusión de iones tóxicos en diversos órganos y la tolerancia de los tejidos (Munns y Tester, 2008).

El estrés osmótico afecta los tejidos jóvenes, mientras que el estrés iónico los tejidos maduros. La tolerancia del tejido al estrés osmótico puede distinguirse cuando la planta es capaz de producir hojas continuamente; la tolerancia al estrés iónico es

evidente cuando se incrementa la sobrevivencia de las hojas viejas y permanecen más tiempo en la rama (Munns y Tester, 2008).

Actualmente, la tolerancia de los cultivos al estrés salino se ha probado en campo pero ha sido difícil, por la variación de los niveles de salinidad presentes en los suelos de cultivo y por la interacción con otros factores ambientales, como la contaminación del aire, la fertilidad y drenaje del suelo, la temperatura, intensidad luminosa y la pérdida de agua por transpiración (Flowers, 2004); sin embargo, algunos mecanismos de tolerancia involucrados por la planta para ajustar su fisiología y metabolismo al estrés salino y comúnmente descritos, son los siguientes:

El ajuste osmótico

El ajuste osmótico se define como la reducción del potencial osmótico debido a la acumulación de solutos en respuestas al estrés hídrico, que permite mantener la turgencia celular (Ramanjulu y Sudhakar, 2000; Martínez *et al.*, 2004; Silva-Robledo *et al.*, 2007). Las plantas pueden disminuir su potencial osmótico interno en condiciones salinas, para compensar el potencial osmótico externo y continuar la actividad enzimática para, de esta forma, evitar la deshidratación y la muerte de la célula, tejido u órgano (Gómez-Cadena, 2001). Este mecanismo, generalmente, está ligado a la síntesis de compuestos nitrogenados, como la betaína, colina, glicina-betaina y prolina (González *et al.*, 2002), varios compuestos de carbono (carbohidratos, alcohol y ácidos orgánicos), muchos de los cuales se supone son compartimentados principalmente en el citoplasma (Martínez *et al.*, 2004).

Acumulación de solutos compatibles

La acumulación de solutos compatibles en las plantas ha adquirido atención en los últimos años (Martínez *et al.*, 2004). Se consideran solutos compatibles porque no inhiben el metabolismo celular, mientras generan el potencial osmótico requerido para la absorción de agua en condiciones de menor potencial hídrico. Se acumulan en el citoplasma y en la vacuola a concentraciones altas; tienen como función principal disminuir y mantener el potencial osmótico bajo en el citosol y están involucrados en la

estabilidad de proteínas y estructuras celulares (Zhu, 2003). En algunos casos tienen más función protectora y/o estabilizadora de membranas y enzimas que propiamente osmótica (Hasewaga *et al.*, 2000). Los solutos compatibles (osmolitos citosolitos) son metabolitos hidrofílicos, entre los que destacan aminoácidos (prolina), azúcares (trehalosa, sacarosa, fructanos), compuestos cuaternarios de nitrógeno (glicinabetaína; prolina-betaína; β -alaninabetaína y colina-O-sulfato) y polioles (manitol, sorbitol) y otros metabolitos de peso molecular bajo (Nuccio *et al.*, 1999; Chen y Murata, 2002; González *et al.*, 2002).

En las plantas, los efectos de los solutos compatibles son varios: los azúcares interactúan con las cabezas polares de los fosfolípidos para prevenir la fusión de la membrana (Chen y Murata, 2002); los aminoácidos, pueden actuar como osmolitos en la regulación del transporte iónico y participar en la síntesis y actividad enzimática (Ray, 2002); la prolina, en las plantas es sintetizada vía glutamato o de ornitina. Se ha demostrado que en condiciones de estrés osmótico la síntesis es vía glutamato (Delauney y Verma, 1993); es un aminoácido presente en cantidades pequeñas, en diferentes órganos de las plantas cuando estas crecen en condiciones óptimas. En condiciones de estrés, se incrementa para funcionar como un agente osmótico, que protege a las plantas de la deshidratación (Stewart y Lee, 1974; Tajdoost *et al.*, 2007). Inicialmente se localiza en el citosol (Pahlich *et al.*, 1983) es fuente de C y N, fácilmente disponible para la rehidratación celular (Brugiere *et al.*, 1999); participa como estabilizador de proteínas y membranas, inductor de genes relacionados a estrés osmótico (Iyer y Caplan, 1998), en la desintoxicación de NH_4 y ayuda a las células a superar la tensión oxidativa ocasionada por las especies reactivas al oxígeno (Ramanjulu y Sudhakar, 2000).

En las plantas halófitas, la concentración de prolina o glicina betaína es alta (> 40 mM) que contribuye a una presión osmótica de 0.1 MPa, tanto en la célula como en la planta completa. En las glicófitas, la acumulación de este soluto apenas alcanza 10 mM, encontrados específicamente en el citoplasma (Flowers *et al.*, 1977). En concentración

alta de solutos, las células ejercen presión de turgencia contra las paredes celulares, lo que fundamenta el crecimiento celular (Zyalalov, 2004).

En plantas de trigo sometidas a estrés salino, se observó que la actividad de prolina y glicina betaína se incrementó más en los brotes que en las raíces (Nayyar, 2003). En plantas de maíz, además de acumular prolina, se observó, incremento en la actividad de la enzima prolina deshidrogenasa (Ghoulam *et al.*, 2002); tanto en maíz como en trigo, además de acumular concentraciones altas de osmolitos, mostraron potenciales hídricos altos (Ghoulam *et al.*, 2002; Nayyar, 2003). En genotipos sensibles de caña de azúcar, la acumulación de prolina fue mayor en las raíces y en la mayoría de las vainas foliares, excepto en la lámina foliar de la hoja más joven (García y Medina, 2003).

Exclusión de iones del citoplasma y su inclusión o compartimentación en la vacuola

La exclusión de Na y Cl del citoplasma y su compartimentación en la vacuola, es un mecanismo que desarrollan las plantas para lograr su supervivencia (Munns, 2002; Xu y Shi, 2007). Estos mecanismos de tolerancia están en función de la habilidad del sistema radical para limitar el transporte de iones tóxicos, a los tallos (Renault *et al.*, 2001); mantener los niveles adecuados de K y Ca en sus tejidos (Rengel, 1992; Munns y Tester, 2008) y conservar una proporción alta K/Na en el citoplasma (Maathuis y Amtmann, 1999). La exclusión de Na por las raíces asegura que no se deposite a niveles tóxicos en las hojas. En otras plantas a través de la succulencia han desarrollado habilidades para incrementar los compartimentos celulares de las hojas y retener concentraciones altas de sales en las vacuolas (González *et al.*, 2002; Munns y Tester, 2008). La compartimentación intracelular de iones tóxicos es un prerrequisito para mantener la integridad celular; al tiempo que libera al citosol de Na, contribuye a disminuir el potencial osmótico y a ajustar el potencial hídrico celular para permitir la absorción de agua durante el estrés salino (Maathuis y Amtmann, 1999; Glenn *et al.*, 1999).

En ciertas especies, en el tonoplasto se encuentra presente un antiporte Na^+/H^+ ; el cual es activado en las plantas que crecen en NaCl , cuya función es acumular Na en la vacuola, utilizando un gradiente de trans-tonoplasto H^+ , dirigido por una fuerza. Su actividad sólo se ha demostrado en especies tolerantes como betabel, caña de azúcar, cebada y en llantén del mar; debido a que está ausente en especies sensibles como llantén media (Barkla y Pantoja, 1996).

Se considera que son dos los mecanismos para controlar la concentración de Na y prevenir su exceso en el simplasto de las células vegetales. Uno es la compartimentación de Na en la vacuola, mediada por los antiportes Na^+/H^+ localizado en el tonoplasto (Barkla y Pantoja, 1996; Fukuda *et al.*, 2004); el otro, el transporte de Na^+ hacia el apoplasto, a través del antiporte Na^+/H^+ se encuentran ubicados en la membrana citoplasmática (Qui *et al.*, 2004).

Se ha encontrado asociación positiva entre la exclusión de Na y Cl y la tolerancia a la salinidad en variedades de soya (González *et al.*, 2002). Algunas variedades de trébol, mostraron capacidad de controlar la distribución de Na y Cl en los tallos y hojas y de retraslocarlos a la raíz (Roger y Nobles, 1991).

Eficiencia del uso del agua

El agua es el componente predominante de los organismos (80 a 90 %). Es importante para las plantas por su papel en los procesos fisiológicos y por la gran cantidad que requieren para su sobrevivencia y desarrollo (Hasegawa *et al.*, 2000; Zyalalov, 2004). Se entiende por eficiencia del uso del agua, al volumen de agua que las plantas necesitan consumir (evapotranspirar) para incorporar a su biomasa una determinada cantidad de carbono proveniente de la atmósfera (CO_2). Se puede estimar, de manera aproximada, mediante la producción de biomasa total producida o parte cosechada de un cultivo (Fernández y Ferre, 2005; Medrano *et al.*, 2007). La producción de biomasa y el gasto de agua, están en función de los procesos básicos (fotosíntesis y transpiración, respectivamente), los cuales utilizan la misma vía: los estomas de las hojas. La regulación de la pérdida de agua en los estomas es un

mecanismo que se establece mediante variaciones de la apertura; situación que es, en parte, responsable de la eficiencia del uso del agua por las plantas y, que esta va a depender del tipo de planta y de las condiciones ambientales en las que se desarrolle (Medrano *et al.*, 2007). Uno de los eventos afectados por la concentración alta de sales en el suelo, es la reducción de la capacidad de absorción de agua, lo que ocasiona la pérdida de turgencia celular (Hasegawa *et al.*, 2000; Zyalalov, 2004); la eficiencia del uso del agua, es un mecanismo que beneficia el balance energético de la hoja (Zyalalov, 2004) y que permite una recuperación del área foliar y de la relación raíz/parte aérea (Maurel y Chrispeels, 2001).

Selectividad iónica

Los solutos se absorben y acumulan por procesos selectivos (Salisbury y Ross, 1994). En condiciones salinas, la absorción es afectada por la concentración elevada de sales en el suelo, particularmente de Na y Cl, impidiendo que elementos como K, Ca, Mg y NO₃, sean captados en niveles adecuados para el desarrollo de la planta. La similitud química entre el K y el Na, provoca que estos compitan en los sitios de absorción en la raíz (Subbarao *et al.*, 2003). Por lo tanto, mediante el desarrollo de este mecanismo, la planta puede ser capaz de restringir la absorción de iones tóxicos, evitar el desbalance nutricional y mantener los intervalos adecuados de los nutrientes para su crecimiento. Los mecanismos responsables de discriminación de iones tóxicos, probablemente, estén localizados en las membranas de los tejidos y en varios organelos de las plantas (Kuiper, 1968; Bliss *et al.*, 1984). La entrada de K y Na en la célula se realiza por la acción de transportadores y canales iónicos del plasmalema. Existen transportadores muy selectivos para el K con una afinidad alta por K, pero que también pueden transportar Na con afinidad baja y que pueden ser bloqueados por las concentraciones altas de Na en el suelo (Maathuis y Amtmann, 1999). El calcio, es esencial para mantener el transporte iónico selectivo (Epstein, 1961).

Aspectos generales del Aguacate (*Persea americana* Mill)

Aguacate es el nombre común con que se conoce a esta planta de la familia de las Lauráceas, cuyo origen viene del náhuatl Ahuácatl, que significa testículo. *Persea americana* Mill es el nombre científico de la principal especie cultivada, originaria de las zonas altas del centro y del Este de México, así como de las partes altas de Guatemala. Se divide en tres variedades botánicas o razas: Mexicana, Guatemalteca y Antillana. Los aguacates originados en las zonas altas del centro y Este de México generan la raza Mexicana, en las zonas altas de Guatemala se origina la raza Guatemalteca y la raza Antillana proviene de las primeras plantas encontradas en las Antillas. Su sabor, textura y propiedades alimenticias, medicinales, maderables y en la industria, han cautivado a los países que lo han adoptado (Sánchez-Colín *et al.*, 1992).

En México, el aguacate ha sido establecido y consumido, desde hace cientos de años en cantidades extensivas. Es un cultivo de importancia económica, de acuerdo a la superficie cultivada (133,441 ha) localizada principalmente en los estados de Michoacán, Jalisco, Morelos, México, Nayarit y Guerrero (SIAP-SAGARPA, 2010); por su valor nutritivo alto y por los ingresos que genera (Salazar *et al.*, 1987). Durante las últimas décadas o más, fue desarrollada una nueva industria, específicamente en el estado de Michoacán, basada en un cultivar llamado 'Hass' que ocupa más de 95,000 ha, con más de 895,000 ton de producción de fruto en 2005.

La propagación de aguacate comúnmente es por semilla o por injerto. La propagación por semilla no es recomendable para plantaciones comerciales debido a la variabilidad genética que presentan, lo que puede traer como consecuencia aumento del porte del árbol, disminución en la producción y la calidad del fruto no es la deseable. No obstante, puede ser útil para el mejoramiento genético. La propagación por injerto, es el método más apropiado para reproducir las variedades seleccionadas para el cultivo comercial; con esta técnica los árboles son precoces, uniformes en cuanto a calidad, forma y tamaño de la fruta; sin embargo, la producción está en función del origen del portainjerto, de la compatibilidad o relación patrón-injerto y las condiciones

ambientales prevalecientes en su entorno (Whiley *et al.*, 1990; Ben-Ya'acov y Michelson, 1995; Suárez *et al.*, 2004). Otros métodos que permiten propagar y seleccionar portainjertos tolerantes son: por acodos (Salazar *et al.*, 2004) y mediante técnicas de cultivo *in vitro* (Pliego-Alfaro y Litz, 2007).

El fruto de aguacate, a pesar de tener aceptación en la dieta de muchos países, en la actualidad, la producción intensiva es limitada por la pudrición radical que causa el hongo *Phytophthora cinnamoni* (Dalsaso y Guevara, 1988), factores abióticos como la salinidad y sequía (Fuentes *et al.*, 2004) y a las combinaciones de estos, debido a que causan daños y pérdidas en los huertos (Ben-Ya y Zilberstaine, 1999a). En los últimos años, países como Israel, Estados Unidos y, en menor grado México, entre otros, están trabajando en la obtención de portainjertos capaces de tolerar el estrés provocado por estos fenómenos (Bernstein *et al.*, 2001; González-Rosas *et al.*, 2003; Salazar *et al.*, 2004; Musyimi *et al.*, 2007).

Mientras que en Israel, se han desarrollado portainjertos tolerantes a salinidad; en México el interés principal ha sido, específicamente por la Fundación Sánchez Colín, desarrollar portainjertos de porte enano mediante la técnica del interinjerto (Litz *et al.*, 2005). Israel a pesar de ocupar el noveno lugar como productor, es el país que obtiene los mejores rendimientos y es el más activo en la investigación de muchos frutales. En Israel y en las Islas Canarias, dos lugares donde la selección de las razas está concentrada, el porcentaje de portainjertos tolerantes es mucho más alto en poblaciones de West Indian que en la población Mexicana y Guatemalteca (Ben-Ya'acov y Michelson, 1995; Litz *et al.*, 2005).

Efectos de salinidad en aguacate

El aguacate (*Persea americana* Mill) es un cultivo sensible a la salinidad (Embleton *et al.*, 1962; Ben-Ya'acov y Zilberstaine, 1999a; Mickerlbart y Arpaia, 2002). Diversos investigadores han determinado que genotipos de la raza Antillana son más resistentes a salinidad que los de las razas Mexicana y Guatemalteca (Oppenheimer,

1947; Cooper, 1951; Zamora, 1997); sin embargo, se han identificado entre portainjertos de West Indian, algunos materiales sensibles al estrés salino. Debido a la respuesta de crecimiento entre los portainjertos, Bernstein *et al.* (2001), señalan que el aguacate puede ser un modelo para comparar los efectos de la salinidad, en los mecanismos fisiológicos involucrados en la inhibición del crecimiento y la tolerancia.

En la mayoría de los estudios, la cuantificación de daño en los portainjertos sensibles de aguacate, se ha enfocado en la disminución de la producción y necrosis foliar debido a la acumulación de Cl y Na. En los materiales tolerantes, es menor el daño en las hojas pero el efecto negativo sigue notándose en los rendimientos (Ben-Ya'acov *et al.*, 1979; Bernstein *et al.*, 2001; Musyimi *et al.*, 2007). Algunas características consideradas como criterios de tolerancia en aguacate son la producción de biomasa, proporción raíz/vástago, altura del árbol y diámetro de tallo (Bernstein *et al.*, 2001). Se está investigando la posible interacción entre la salinidad, absorción nutrimental, parámetros de crecimiento y de intercambio gaseoso entre portainjertos; sin embargo, aún es poca la información disponible acerca de los efectos del estrés en aguacate; debido posiblemente a que los trabajos realizados, se han llevado en campo, lo que implica periodos largos de tiempo para que la información esté disponible (Bernstein *et al.*, 2001; Musyimi *et al.*, 2007).

Este frutal tolera una conductividad eléctrica en el suelo de 2 dS m^{-1} , por encima a este valor, se estima que su rendimiento se reduce 20 % por cada unidad que se incrementa en conductividad (Cabalceta y Cordero, 1991); sin embargo, la presencia de síntomas de toxicidad en aguacate no está tan relacionada con la conductividad eléctrica del suelo o del agua, como con la presencia de cloruros en el suelo, los cuales aumentan con la aplicación de riegos en el período de sequía (Ayer *et al.*, 1951; Gustafson, 1962; Salazar *et al.*, 1987). El exceso de Cl, en el medio en que se desarrollan los árboles de aguacate, causa cambios en el comportamiento y son perjudiciales para este cultivo, debido a que es el factor principal causante de necrosis foliar. Sin embargo, su intensidad y manifestación puede ser afectada por las

características del portainjerto utilizado, factor a considerar en estudios posteriores (Salazar *et al.*, 1987).

Los síntomas de toxicidad por el exceso de Cl son más comunes que los causados por Na (Salazar *et al.*, 1987; Salazar-García y Cortés-Flores, 1988; Lahav, 2003). El cloro inhibe el crecimiento de la raíz, pero se acumula principalmente en ápices de hojas adultas, mientras que el Na, en las nervaduras de las hojas maduras y en algunos casos en el tejido de la raíz principal (Chirachint y Turner, 1988; Lahav, 2003; Bernstein *et al.*, 2004). La toxicidad por cloruros en las hojas, se inicia con necrosis apical y marginal que avanza al centro de la hoja. En base al Na, la necrosis se presenta cerca del margen y entre las nervaduras de las hojas, su acumulación paulatina, provoca la muerte de los brotes y daños al sistema radical (Ayer *et al.*, 1951). En huertos de aguacate se ha observado que el crecimiento de raíces es más limitado por la salinidad que el crecimiento de brotes (Salazar *et al.*, 1987; Bernstein *et al.*, 2004); sin embargo, la presencia de necrosis en las hojas, causadas por excesos de Cl o Na, difieren con el cultivar o portainjerto (Bernstein, 1981). Los patrones de aguacate de la raza Mexicana estimulan la acumulación de Cl y Na en las variedades injertadas (Patel *et al.*, 1975-76). Otros portainjertos muestran variabilidad en su producción (Ben-Ya'Acob, 1986) y tolerancia a salinidad y suelos calcáreos (Kadman, 1968). De ahí la importancia en la agricultura, de identificar y seleccionar materiales que muestren tolerancia a la salinidad (Chalernpol *et al.*, 1998) y, una opción para identificar, en corto tiempo, materiales tolerantes a condiciones ambientales adversas, es a través de cultivo *in vitro* (Zhang, 1994).

Cultivo *in vitro*

El cultivo de tejidos es una vía esencial en el quehacer científico-tecnológico (Kessel, 2008); en la aplicación de la ingeniería genética como la selección celular, el rescate de embriones, fusión de protoplastos y la tecnología del ADN recombinante, es un prerrequisito (Janick, 1992). Los programas de mejoramiento genético pueden ser reducidos en varios años (Krikorian, 1991). Puede ser una herramienta útil para el

estudio de mecanismos celulares del estrés y sus aplicaciones a nivel celular independientemente de los procesos regulatorios que ocurren en la planta (Ehsanpour y Fatahian, 2003) y es una opción para seleccionar materiales vegetales tolerantes a salinidad (Zhang, 1994).

En frutales, ha resultado ser una herramienta valiosa para la multiplicación, el rescate y la conservación de estas especies (Kessel, 2008). Las técnicas comúnmente utilizadas para mejorar un número limitado de cultivos de interés económico en el mundo, como cítricos (*Citrus* sp), plátano y/o banano (*Musa* sp), piña (*Ananas comosus* L.) mango (*Mangifera indica* L.), guayabo (*Psidium guajava* L) y aguacate (*Persea americana* Mill), son: la embriogénesis somática, organogénesis, cultivo de embriones cigóticos, cultivo de meristemos, cultivo de anteras y cultivo de células en suspensión, multiplicación mediante el sistema de inmersión temporal, entre otras (Kessel, 2008).

Con fines de estudiar la tolerancia a salinidad, las técnicas *in vitro* se han aplicado en plántulas enraizadas y no enraizadas de *Olea europea* L. (Bracci *et al.*, 2008); en la proliferación de callos y órganos en cultivares de *Triticum* sp (Akhtar, 2006); en brotes de *Actinidia deliciosa* A. Chev. (Sotiropoulos y Dimassi, 2004); callos producidos de segmentos de tallo de *Medicago sativa* (Ehsanpour y Fatahian, 2003); esquejes de *Rhododendrom* R. 'Catawbuebse grabdufkiry' (Giel y Bojarczuk, 2002); brotes apicales de portainjertos de *Prunus cerasifera* (Dimassi-Theriou, 1998) y en la inducción de callo a partir de segmentos de hojas de *Rosmarinus officinalis* L. (Tawfik, 1997). La mayoría enfocados a evaluar los efectos de la salinidad, presente en el medio de cultivo, en el desarrollo de callos, órganos y plántulas; otros para seleccionar genotipos tolerantes e identificar mecanismos de tolerancia y en menor proporción para aprender acerca de la sensibilidad del material vegetal a los factores de estrés. Dix, (1993) indica, que el cultivo de células en suspensión, ofrece los medios para concentrar los procesos fisiológicos y bioquímicos inherentes a las células, los cuales contribuyen a la adaptación al estrés salino en corto tiempo (Llano-Agudelo *et al.*, 1995).

Cultivo *in vitro* en aguacate

Los explantes utilizados para el cultivo *in vitro* de aguacate han sido embriones maduros e inmaduros, brotes apicales y yemas axilares de plántulas y árboles maduros, de hojas, mesocarpo del fruto, pedúnculo, polen cotiledones y protoplastos (Mohamed-Yasseen, 1993; Suárez *et al.*, 2004). La embriogénesis somática sólo ha sido obtenida de callos inducidos de embriones inmaduros (Skeme y Baslass, 1983; Pliego-Alfaro y Murashige, 1988); la formación de brotes y plantas se ha logrado de ejes embrionarios (Mohamed-Yasseen *et al.*, 1992) y de yemas axilares (Shall, 1987). Por lo que es necesario desarrollar protocolos tanto para la regeneración y propagación *in vitro* (Mohamed-Yasseen, 1993) como para acelerar los programas de mejoramiento genético de aguacate (Pliego y Litz, 2007).

El cultivo de embriones implica el aislamiento del embrión y su germinación *in vitro*, con el fin de obtener una planta viable. No obstante, es importante conocer su estado de desarrollo, para determinar los requerimientos necesarios para lograr su crecimiento. El cultivo de embriones inmaduros normalmente da paso a un proceso de embriogénesis somática, en lugar de una germinación precoz; en tanto que los embriones maduros son más competentes para dar origen a procesos organogénicos (Hartman *et al.*, 1993; Pierik, 1990).

El cultivo *in vitro* de embriones maduros de aguacate, responde a problemas de orden práctico que se presentan en el campo de su mejoramiento genético (Mohamed-Yasseen, 1993; Rodríguez *et al.*, 1999) a través de la selección de genotipos prometedores a los problemas bióticos y abióticos (Llano-Agudelo *et al.*, 1995), como los tolerantes a la salinidad (González-Rosas *et al.*, 2003). No obstante, se desconocen muchos aspectos de su respuesta a las condiciones salinas. En la medida que se conozcan nuevos mecanismos de tolerancia a este factor, su utilidad como portainjerto podría ser desarrollada.

CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo experimental se dividió en cuatro fases: **I)** Establecimiento *in vitro*. **II)** Evaluación del desarrollo y sobrevivencia *in vitro*. **III)** Evaluación de parámetros de tolerancia a salinidad en aguacate en cultivo *in vitro*. **IV)** Cambios anatómicos en la raíz inducidos por salinidad.

Fase I. Establecimiento *in vitro*

Material vegetal y proceso de desinfestación

Se utilizaron ejes embrionarios extraídos de semillas de aguacate provenientes de frutos fisiológicamente maduros.

Los frutos se cosecharon de árboles del banco de germoplasma de la Fundación Sánchez Colín, ubicado en Ixtapan de la Sal, Estado de México. Los frutos utilizados fueron: de peso y tamaño uniforme, 170 g de peso promedio, 9 cm de longitud, 6 cm de diámetro y 28 g de peso de la semilla; a los cuales, se les eliminó la pulpa y se les extrajo la semilla.

Las semillas se tallaron con escobillón para eliminar los residuos de pulpa, se lavaron con agua corriente y una solución jabonosa (5 gL^{-1} de detergente Roma). Posteriormente, se sumergieron en solución de etanol al 70 %, durante 1 min. Enseguida se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril a intervalos de 3 min cada uno para eliminar los residuos del producto. Inmediatamente se extrajo el eje embrionario.

En la campana de flujo laminar marca VECO, los cotiledones de las semillas que cubren el eje embrionario, se cortaron hasta dejarlos en forma de cubo de 1 cm por lado. Los cortes de los cotiledones, al inicio fueron con cuchillo y posteriormente con

bisturí, mismos que frecuentemente se sumergieron en etanol al 96 % y se flamearon. Los ejes embrionarios obtenidos, se sumergieron en la solución 20 % de hipoclorito de sodio, de su concentración comercial (6 %), durante 15 min. Cumplido el tiempo, se dieron tres enjuagues sucesivos con agua destilada esterilizada, para eliminar el reactivo químico; por último, se sumergieron 1 h en solución al 2 % KH_2PO_4 para evitar su oxidación.

Establecimiento *in vitro*

En condiciones asépticas, manejadas en la campana de flujo laminar, los ejes embrionarios se tomaron uno a uno del recipiente con apoyo de pinzas y se estableció uno en cada tubo de ensaye, que contenían medio de cultivo (ver medio de cultivo). Los tubos se taparon con tapas transparentes autoclavables y se sellaron con cinta autoadherente “kleen pack”. Enseguida los tubos se colocaron en la sala de incubación (ver condiciones de cultivo).

Medio de cultivo

El medio de cultivo empleado, fue el desarrollado por Murashige y Skoog (1962), al 100 % de sus sales (Cuadro 1 A) suplementado con $2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de glicina, $10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de mio-inositol, $4 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de tiamina-HCl, 3 % de sacarosa y la adición de sales de acuerdo a la concentración de cada tratamiento (NaCl y CaCl_2) y descrita en cada fase experimental. El pH se ajustó a 5.7 ± 1 con NaOH 0.1N y HCl 0.1N. Al medio de cultivo se le agregó 0.8 % de agar-agar (p/v) marca SIGMA[®], el cual se disolvió en horno de microondas (modelo MW5630T, marca SAMSUNG). Se colocaron 25 mL de medio en tubos de ensaye de 25 cm de largo por 2 cm de diámetro. Posteriormente, se esterilizaron en autoclave automática vertical (marca BRISTOL[®]) a $121 \text{ }^\circ\text{C}$ y presión de $1.5 \text{ kg}\cdot\text{cm}^{-2}$ durante 15 min.

Condiciones de cultivo

Las condiciones de cultivo en la sala de incubación fueron: temperatura de $27 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$, con fotoperiodo de 16 h luz/8 h oscuridad, con intensidad luminosa de $47 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}$

$2 \cdot s^{-1}$ proporcionada por lámparas fluorescentes de luz blanca de 34 watts (marca MAGG).

Fase II. Evaluación del desarrollo y sobrevivencia *in vitro*

Material utilizado, experimentos y tratamientos

El material genético evaluado fue: las variedades de aguacate criollo y 'Hass'. Se establecieron en tres experimentos con diferentes niveles de las siguientes sales: **1)** NaCl, **2)** CaCl₂ y **3)** NaCl:CaCl₂. En los experimentos 1) y 2), las concentraciones empleadas fueron: 0, 0.1, 0.3, 0.5, 0.7, 0.9 g L⁻¹; en el experimento 3) la combinación de estas (NaCl:CaCl₂), se evaluó en proporción 1:1. En cada experimento el testigo fue el medio MS al 100 % de su composición (concentración 0 % NaCl y CaCl₂).

Variables evaluadas en cada experimento

Días a inicio de germinación y porcentaje de germinación. Los días a germinación se contabilizaron a partir de su establecimiento y hasta la aparición de la raíz. El porcentaje de germinación se obtuvo, considerando el número de ejes embrionarios germinados con respecto al número de ejes embrionarios establecidos, multiplicados por 100.

Días a inicio de emergencia y porcentaje de emergencia. Los días de emergencia se contabilizaron desde el momento que se establecieron *in vitro* los ejes embrionarios y hasta la aparición de la plúmula. Para el porcentaje de emergencia se contabilizaron el número de plántulas emergidas, con o sin raíz y se dividió entre el número de ejes embrionarios establecidos, multiplicados por 100.

Las plántulas se cosecharon a los 65 días después de su cultivo *in vitro* y se les midieron:

Longitud de tallo y raíz. Se midieron, en centímetros, desde la base de inicio de cada órgano hasta su ápice.

Diámetro de tallo y raíz. Los diámetros se midieron, en milímetros, de la parte media de la longitud de cada órgano.

Número de hojas. Se contó el número de hojas formadas en cada plántula.

Supervivencia. El porcentaje de supervivencia se calculó considerando todos los ejes embrionarios vivos con o sin respuesta de desarrollo; debido a que, algunos ejes embrionarios de 'Hass' y criollo lograron germinar, emerger y producir brotes completos y otros formaron brotes sin raíz, o crecieron solo en volumen.

Se consideró el porcentaje de ejes embrionarios oxidados y deshidratados, debido a que son respuestas asociadas al estrés salino que afectaron el crecimiento y la sobrevivencia de aguacate.

Diseño experimental

Para cada experimento, el diseño experimental que se utilizó fue completamente al azar con cinco repeticiones. El diseño de tratamientos fue un factorial 2 X 6. El factor A fueron los materiales genéticos de aguacate con dos niveles (criollo y 'Hass') y el factor B las concentraciones con seis niveles (0, 0.1, 0.3, 0.5, 0.7 y 0.9 gL⁻¹). La unidad experimental fue una plántula por tubo. A los datos obtenidos de las variables se realizó un análisis de varianza y comparación de medias, mediante la prueba de Tukey ($\alpha=0.05$) usando el paquete estadístico SAS (2009) versión 9.3.

Fase III. Evaluación de parámetros de tolerancia a salinidad en aguacate en cultivo *in vitro*

Material vegetal utilizado y tratamientos

En esta fase, el material genético de aguacate utilizado fue el tipo criollo. Los tratamientos salinos se formaron con las sales NaCl y CaCl₂ y la combinación NaCl:CaCl₂. Las concentraciones empleadas para cada sal fueron: 0.1 y 0.3 gL⁻¹, en la combinación la proporción 1:1 y el testigo fue el medio MS al 25 % de su composición.

Las plántulas se cosecharon a los 65 días posteriores a su establecimiento, se seleccionaron las que mostraron mejor desarrollo, considerando que las características morfológicas pueden ser útiles como criterio de tolerancia al estrés salino (Jamil *et al.*, 2006) y se cortaron transversalmente, separando el tallo y la raíz.

Variables evaluadas

Materia fresca, materia seca y contenido de agua. La materia fresca y materia seca se midieron en miligramos, mediante el uso de la balanza analítica (modelo GMBH-GOTTING, marca Sartorius). La materia fresca se obtuvo del peso fresco del tallo y la raíz de la plántula. Posteriormente, los órganos se colocaron por separado, en bolsas de papel y se metieron a la estufa a 70 °C durante 72 horas. Se pesaron nuevamente para obtener el peso seco. El contenido de agua se midió en porcentaje, a partir del peso fresco y peso seco, mediante la fórmula:

$$\text{Contenido de agua (\%)} = \frac{\text{Materia fresca} - \text{Materia seca}}{\text{Materia fresca}} \times 100$$

Potencial hídrico y potencial osmótico

Potencial hídrico (Ψ_w). Se determinó utilizando la Bomba Scholander marca Soilmoisture Equipment Corp. Modelo 3000-1412. Las muestras de tallo y raíz empleadas se colocaron en la cámara de la bomba. Se aplicó presión y se tomó la lectura del manómetro una vez que se logró la aparición de la gota de agua. La unidad de medida fue en bares y se transformó a MPa, considerando que 1bar = 0.1 MPa.

Potencial osmótico (Ψ_π). Se obtuvo mediante el Osmómetro de Presión de Vapor Wescor 5220C®, previamente calibrado con 3 estándares de osmolalidad en ampolla Optimol® de cloruro de sodio grado reactivo (100, 290 y 1000 mmol kg⁻¹), fabricados por Wescor, cuyos potenciales osmóticos calculados son -0.454, -1.344, y -4.079 Mpa. El tallo y raíz se colocaron por separado en tubos Eppendorf. Mediante presión con una barra de vidrio se obtuvo la savia de cada uno. Con una micropipeta se extrajeron 10 µL

y se colocaron sobre el disco de papel filtro de 0.05 cm de diámetro que se insertó en el portamuestras de la cámara del osmómetro. Se registró la lectura en mmol Kg^{-1} y se transformó a Mpa mediante la ecuación:

$$\Psi_{\pi} = - CiRT$$

Donde:

C = concentración (medición del osmómetro) mmol Kg^{-1}

i = constante para la ionización del soluto y otras variaciones respecto a soluciones ideales (igual a 1)

R = constante general de los gases ($0.00831 \text{ Kg Mpa mol}^{-1} \text{ k}^{-1}$)

T = temperatura absoluta en grados Kelvin ($^{\circ}\text{K} = ^{\circ}\text{C} + 273$)

Contenido de prolina. La determinación se realizó de acuerdo a la metodología de Bates *et al.* (1973) con algunas modificaciones. Se utilizaron 50 mg de tejido liofilizado de tallo y raíz (liofilizador marca LABCONCO).

Procedimiento. Del tallo y la raíz se tomaron aproximadamente 1.5 cm del ápice hacia la base de cada órgano. La muestra se maceró en mortero con 5 mL de ácido sulfosalicílico al 3 %; se obtuvo una masa fina, se centrifugó a 14 000 rpm durante 5 min a 4 °C. Del sobrenadante, se tomaron 2 mL, se colocaron en tubos de ensaye, se les adicionaron 2 mL de ninhidrina ácida y 2 mL de ácido acético glacial. Como blanco se utilizó: 2 mL de ácido sulfosalicílico más 2 mL de ninhidrina ácida y 2 mL de ácido acético glacial. Cada tubo se agitó con un vortex hasta obtener una emulsión. Los tubos se taparon con aluminio y se colocaron a baño maría en ebullición (aproximadamente 90 °C) durante 45 min. Posteriormente, los tubos se sumergieron en agua con hielo (5-10 min). A cada tubo se le adicionaron 4 mL de tolueno y se agitó de nuevo en el vortex. Se dejaron reposar hasta que se separaron dos fases. La fase superior orgánica de color rojo que se formó se separó y se colocó en tubo nuevo. Se elaboró la curva patrón de 0-240 nmol mL^{-1} de L-prolina (SIGMA®) grado reactivo y se utilizó como solvente ácido sulfosalicílico al 3 %.

Lectura. La lectura de absorbancia a 520 nm, se realizó en espectrofotómetro (Espectronic 21D, Milton Roy). Se registró en nmol mL^{-1} , la cual se transformó a $\mu\text{mol g}^{-1}$ de peso liofilizado.

Contenido de Na y Ca. La cantidad de sales se determinó con un espectrofotómetro de emisión de plasma, de acuerdo a la metodología propuesta por Alcántar y Sandoval (1999). La muestra utilizada fue de 100 mg de materia seca de tallo y raíz. La digestión de las muestras fue en húmedo con ácido sulfúrico:ácido perclórico en proporción 2:1 más 2 mL de peróxido de hidrógeno al 30 %. La cantidad se determinó con base en peso seco.

Análisis estadístico

El diseño experimental utilizado fue completamente al azar, con cuatro repeticiones para las variables materia fresca, materia seca, potencial osmótico, potencial hídrico y cuantificación de prolina; tres repeticiones para la determinación de Na y Ca. La unidad experimental la constituyó una plántula. Los resultados se sometieron a un análisis de varianza y la comparación de medias se realizó con la prueba de Tukey ($\alpha \leq 0.05$) usando el paquete estadístico SAS (2009) versión 9.3.

Fase IV. Cambios anatómicos en la raíz inducidos por salinidad.

Material vegetal

El estudio anatómico se realizó en segmentos transversales de la parte media de la raíz (de 1 cm de largo, aproximadamente), de los materiales genéticos criollo y 'Hass', colectados de cada tratamiento y experimento (ver Fase II)

Procedimiento

Fijación. Los segmentos de raíz se fijaron en FAA (50 mL de etanol al 96 %; 5 mL ácido acético glacial, 10 mL formaldehído y 35 mL agua destilada). El tejido permaneció un mes en esa solución. Cumplido el tiempo, los tejidos se lavaron con agua corriente,

en agitación manual y se enjuagaron con etanol al 50 y 70 % a intervalos de 1 min cada uno. Los fragmentos de tejido se colocaron en solución GAA (25 % glicerol + 50 % etanol + 25 % agua destilada) y permanecieron ahí hasta continuar con el proceso.

Deshidratación y aclaramiento. Estos procesos se realizaron en un procesador automático de tejidos (Histokinette). Se preparó una serie creciente de etanol (50, 70, 85, 96 y 100 %) y una serie creciente de xileno (25, 50, 75 y 100 %). Las soluciones se colocaron en los vasos de cristal del Histokinette (procesador automático de tejidos). Los tejidos de raíz se envolvieron en mallas, se colocaron en cápsulas metálicas y se sumergieron gradualmente en las soluciones de etanol a xileno, permaneciendo 5 h en la solución contenida en cada recipiente. El proceso duró 2 días.

Inclusión en parafina. Los segmentos se colocaron en parafina fundida a 56 ± 2 °C donde permanecieron por 24 h. Posteriormente, el tejido se solidificó dentro de moldes pequeños de lámina de aluminio que contenían parafina fundida. Los tejidos se orientaron en un plano deseado dentro de cada bloque. Los bloques se cortaron en fragmentos que contenían el tejido y se ensamblaron en trozos pequeños de madera.

Corte y montaje. Las muestras se cortaron (12 μm de grosor) con un micrótopo rotatorio (marca Leica). Los cortes se montaron sobre portaobjetos con adhesivo de Haupt [1 % gelatina + 2 % fenol, en agua] y unas gotas de formaldehído al 10 %. Los portaobjetos se colocaron en una platina a 55 °C, lo que permitió que el tejido se extendiera y adhiriera mejor. Enseguida, se colocaron en la estufa de secado a 56 ± 2 °C durante 48 h.

Remoción de parafina. La parafina se removió del tejido, de la manera siguiente: los portaobjetos que contenían el tejido se colocaron, en tres cambios al 100 % xileno (3 min en cada cambio). Posteriormente, el tejido se hidrató parcialmente, colocando los portaobjetos por 3 min en cada concentración de una serie decreciente de 2-propanol (100, 96, 70 y 50 %).

Tinción. Los cortes sin parafina y parcialmente hidratados, se colocaron en safranina (0.05 % safranina en etanol al 50 %) durante 2 min; enseguida, se lavaron con agua corriente y se sumergieron para su hidratación en una serie creciente de etanol (50, 70, 96, 100 %); los cuales permanecieron 3 min en cada concentración. La tinción se hizo con verde fijo (0.12 % fast green en etanol al 96 %) durante 3 min. Posteriormente, se colocaron en 100 % etanol y se les dieron tres cambios en 100% xileno (3 min en cada cambio). Finalmente, a los tejidos se les añadieron dos gotas de bálsamo de Canadá y se les colocó un cubreobjetos.

Observación de los cortes. Los cortes se observaron en un microscopio óptico. Las imágenes se digitalizaron con una cámara digital montada en microscopio. Los cambios anatómicos se describieron de acuerdo a lo observado en cada tratamiento y material de aguacate.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Fase II. Evaluación del desarrollo y sobrevivencia *in vitro*

Establecimiento de ejes embrionarios en NaCl

El análisis de varianza mostró interacción altamente significativa entre las concentraciones de NaCl y las variedades de aguacate criollo y 'Hass' en días a inicio de germinación, porciento de germinación, días a inicio de emergencia, porciento de emergencia, longitud de raíz y tallo, diámetro de raíz y tallo y número de hojas por tallo así como entre el porcentaje de supervivencia (Cuadros 5A). Esto indica que el patrón de crecimiento de los ejes embrionarios de aguacate criollo y 'Hass' varió entre las diferentes concentraciones de NaCl, durante su crecimiento y sobrevivencia *in vitro*.

Días a inicio de germinación y porcentaje de germinación. La germinación de los ejes embrionarios de aguacate criollo y 'Hass', se inhibió con la presencia de NaCl en el medio de cultivo. En el tratamiento sin NaCl (testigo), 'Hass' superó a criollo; pero el proceso requirió 54 días para lograr el 100% de la germinación, lo que indica que en criollo, la germinación fue en menor tiempo, aunque en porcentaje menor (Figuras 1 y 2). En Hass, la adición de NaCl, la germinación se inhibió en tres de las cinco concentraciones; en tanto que en criollo sólo en una. El tiempo de inicio de la germinación osciló de 15 a 59 días en 'Hass' y en criollo de 5 a 54 días. En general, 50 % de los ejes embrionarios de criollo germinaron a los 18 días después de su establecimiento *in vitro*; en 'Hass', 37 % germinaron a los 21 días (Cuadro 1). Estos resultados indican que entre las concentraciones de NaCl, en 'Hass', la germinación se retardó y fue menor en comparación con criollo. Aunque, no se identificó si la inhibición de la germinación fue debido al efecto osmótico de las sales o al efecto iónico, en relación con la toxicidad de un ión específico (Bezerra *et al.*, 2007) o por el efecto de la combinación de ambos factores como lo señalan Katembe *et al.*, (1998). En este estudio, el retardo de la germinación y el reducido número de ejes embrionarios

germinados de aguacate, pudo ser el resultado de la reducción del potencial hídrico en el medio de cultivo, ocasionado por un incremento en la concentración de NaCl. Es posible que el crecimiento de los tejidos embrionícos se inhibieran, debido a que la hidratación de los embriones durante el proceso de imbibición pudo ser limitada o a que la excesiva absorción de iones tóxicos, consiguiera modificar la actividad enzimática y esto a su vez pudiera traer como consecuencia que la división y el alargamiento celular se inhibieran, el metabolismo se alterara por la limitación o el retardo en la movilización de las reservas para que el crecimiento radical prosiguiera, tal como lo manifiestan Prisco y O'Leary (1970) y Prisco *et al.*, (1981) en frijol; Katembe *et al.*, (1998) en especies de saladillo o cenizo (*Chenopodiaceae*); Al-Karaki (2001) en cebada y Bezerra *et al.*, (2007) en marañón. Los embriones que tuvieron la habilidad de germinar en condiciones salinas y/o recuperarse y germinar después de haber sido expuestas en alta salinidad, pueden ser criterios de tolerancia de acuerdo a lo reportado por Ungar (1996).

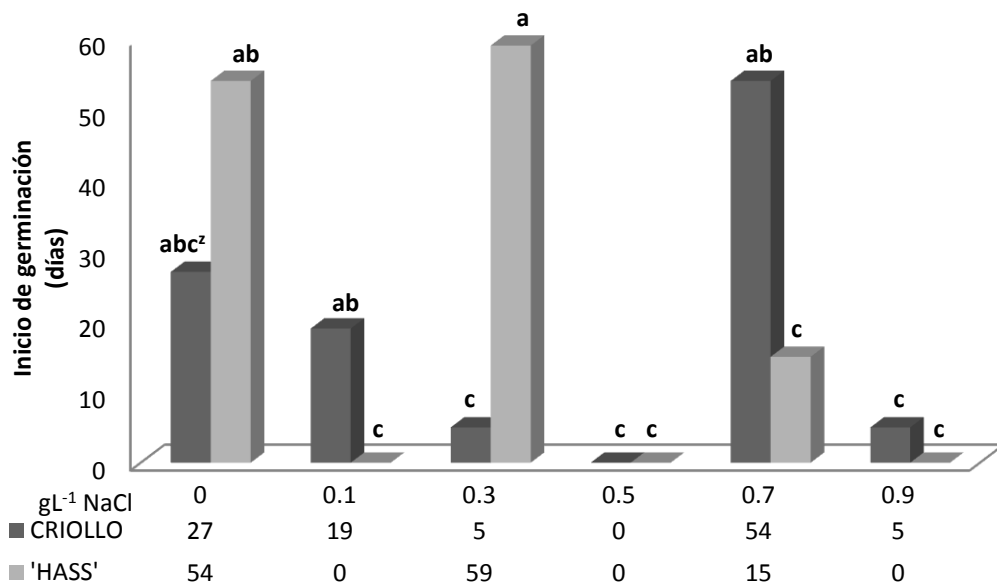


Figura 1. Días a inicio de germinación de ejes embrionarios de aguacate criollo y 'Hass' cultivados *in vitro* en diferentes concentraciones de NaCl (g^L⁻¹).

²Promedios con la misma letra son iguales estadísticamente según la prueba de Tukey (P≤0.05)

Cuadro 1. Promedios de días a inicio de germinación y porcentaje de germinación, días a inicio de emergencia y porcentaje de emergencia de ejes embrionarios de aguacate criollo y ‘Hass’ cultivados *in vitro* en NaCl.

| Material vegetal | Inicio de germinación (días) | Germinación (%) | Inicio de emergencia (días) | Emergencia (%) |
|------------------|------------------------------|-----------------|-----------------------------|----------------|
| Criollo | 18 | 50 | 24 | 57 |
| ‘Hass’ | 21 | 37 | 23 | 37 |
| Promedio general | 20 | 43 | 24 | 47 |

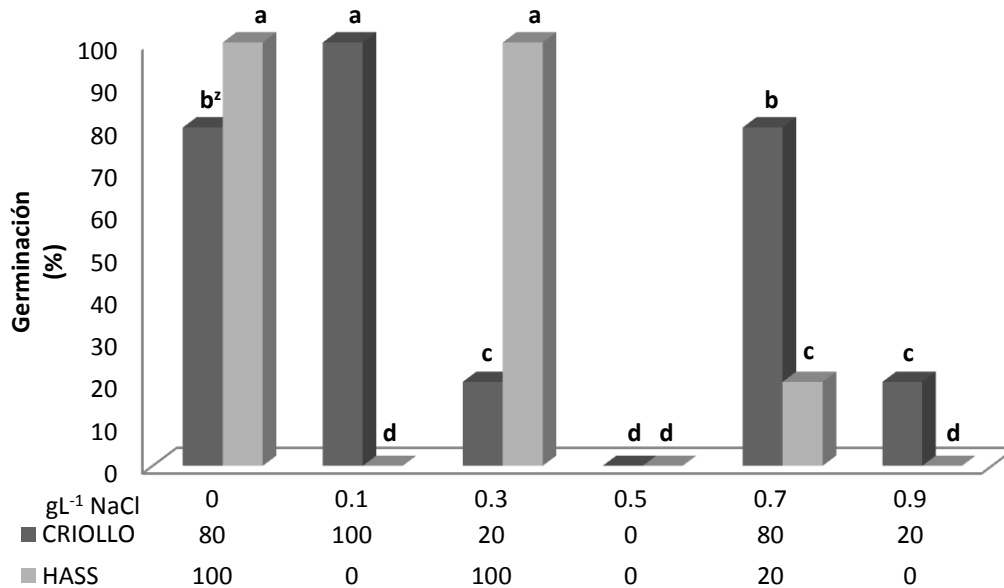


Figura 2. Porcentaje de Germinación de aguacate criollo y ‘Hass’ a partir de ejes embrionarios cultivados *in vitro* en diferentes concentraciones de NaCl (gL⁻¹).

²Promedios con la misma letra son iguales estadísticamente según la prueba de Tukey (P≤0.05)

Días a inicio de emergencia y porcentaje de emergencia. Las plantas, desde el inicio de su desarrollo, muestran sensibilidad a la salinidad (Chang, 1961) y los materiales de aguacate criollo y ‘Hass’ no fueron la excepción. Si bien, en este experimento algunos ejes embrionarios manifestaron ser tolerantes durante su exposición en NaCl, al lograr formar una plántula, la emergencia de ‘Hass’ en condiciones salinas mostró ser más tardía y en menor proporción que el criollo (Figuras 3 y 4). De los 30 ejes embrionarios de cada material de aguacate establecidos entre los tratamientos, en ‘Hass’, 37 % de

los que germinaron, lograron emerger la plúmula y desarrollar una plántula completa a los 23 días de cultivo *in vitro*; en criollo, del 57 % que emitieron tallo sólo 50 % presentaron raíz. En este trabajo se apreció que la germinación fue más sensible a NaCl, que la emergencia del brote. Efecto que puede ser debido a la limitada disponibilidad de agua y el exceso de NaCl en el ambiente de la raíz, que pudieron contribuir en la pérdida de la integridad estructural y funcional de las membranas de los tejidos embriogénicos (Zhao *et al.*, 2007) o por la acumulación en las células embriogénicas de especies reactivas al oxígeno que posiblemente ocasionaron estrés oxidativo e inhibieran la viabilidad de los embriones (Amor *et al.*, 2005; Musyimi, 2007). En este contexto, es posible que los ejes embrionarios que tuvieron la capacidad de germinar y posteriormente emerger en condiciones de estrés ocasionado por la presencia de NaCl, sea un indicador del potencial genético que contienen para tolerarlo (Norlyn y Epstein, 1984; Prisco, 1987; Ungar, 1996; Zhu, 2001).

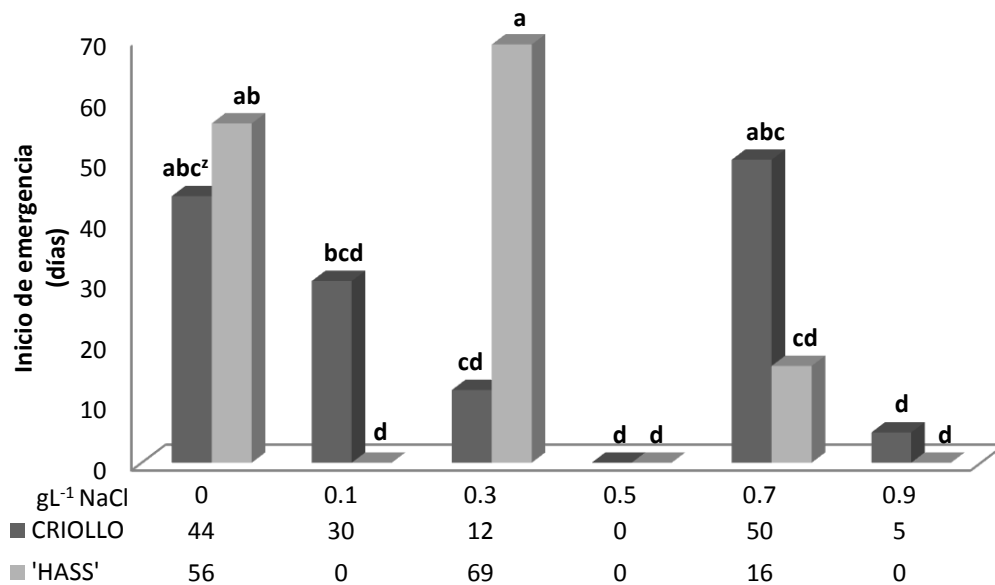


Figura 3. Días a inicio de emergencia de brotes de aguacate criollo y 'Hass' a partir de ejes embrionarios cultivados *in vitro* en diferentes concentraciones de NaCl (gL⁻¹).

²Promedios con la misma letra son iguales estadísticamente según la prueba de Tukey (P≤0.05)

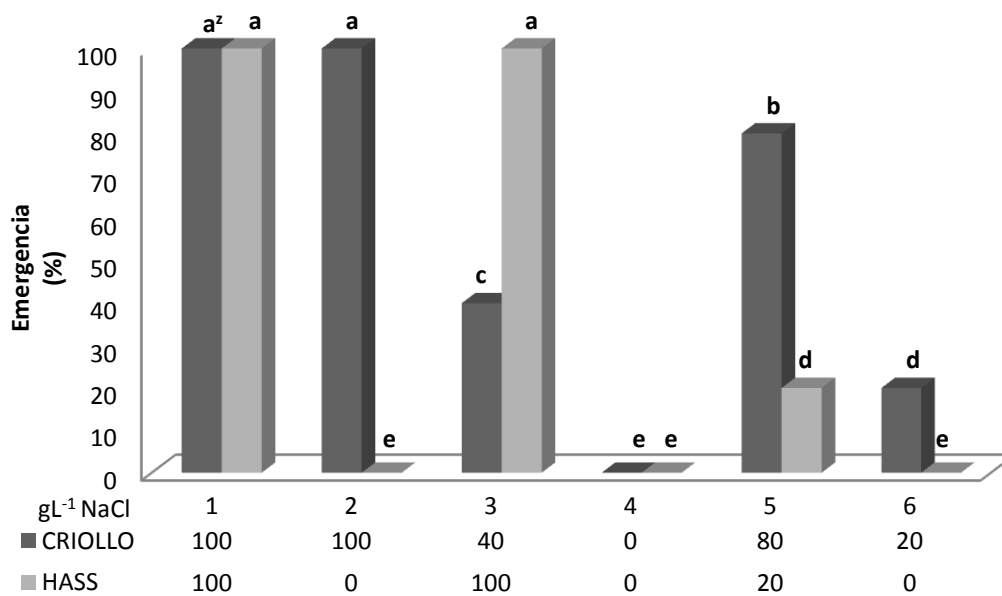


Figura 4. Porcentaje de emergencia de plúmula de aguacate criollo y ‘Hass’ a partir de ejes embrionarios cultivados *in vitro* en diferentes concentraciones de NaCl (g^L⁻¹).

²Promedios con la misma letra son iguales estadísticamente según la prueba de Tukey (P≤0.05)

Longitud de raíz. En el Cuadro 2, se observa que en promedio a los 65 días de cultivo, la longitud de raíz en criollo fue de 2.45 cm y en ‘Hass’ de 2 cm. En el testigo de ‘Hass’, la longitud de raíz fue 1.4 cm mayor con respecto al testigo de criollo (Figura 5). La presencia de NaCl en el medio afectó negativamente el sistema radicular de ambos materiales, evidenciada por las diferencias marcadas en la longitud de raíz. En los tratamientos con NaCl, en criollo la longitud de raíz fue severamente reducida con 0.3 y 0.9 g^L⁻¹ de NaCl y en ‘Hass’, específicamente con 0.7 g^L⁻¹ de NaCl. La disminución del crecimiento de la raíz puede ser asociada con la inhibición de la división y alargamiento celular, debido a que son los procesos involucrados en el crecimiento radicular que directa o indirectamente son afectados por la salinidad (Poljakoff-Mayber y Lerner, 1999). Las altas concentraciones de sal en la membrana de las células de la raíz, pueden llegar a modificar la permeabilidad y selectividad de la membrana (Renault *et al.*, 2001) e interferir en el estado nutricional de los brotes (Ashraf, 1994), pues se ha encontrado que la absorción y traslocación de K, Ca y, en menor importancia Mg son reducidos por estrés salino, entre otros (Ashraf, 1994; Netondo *et al.*, 2004). Por esta

razón se considera que el alargamiento de la raíz es vital para el crecimiento y la sobrevivencia de las plántulas en ambientes salinos (Ashraf *et al.*, 1986).

Cuadro 2. Promedios de las características de crecimiento de aguacate criollo y 'Hass' cultivados *in vitro* en NaCl.

| Material vegetal | Longitud de raíz (cm) | Longitud de tallo (cm) | Diámetro de raíz (mm) | Diámetro de tallo (mm) | Número de hojas |
|------------------|-----------------------|------------------------|-----------------------|------------------------|-----------------|
| Criollo | 2.45 | 3.37 | 1.11 | 1.35 | 2 |
| 'Hass' | 2.00 | 2.27 | 0.84 | 0.81 | 1 |
| Promedio general | 2.22 | 2.82 | 0.98 | 1.08 | 1 |

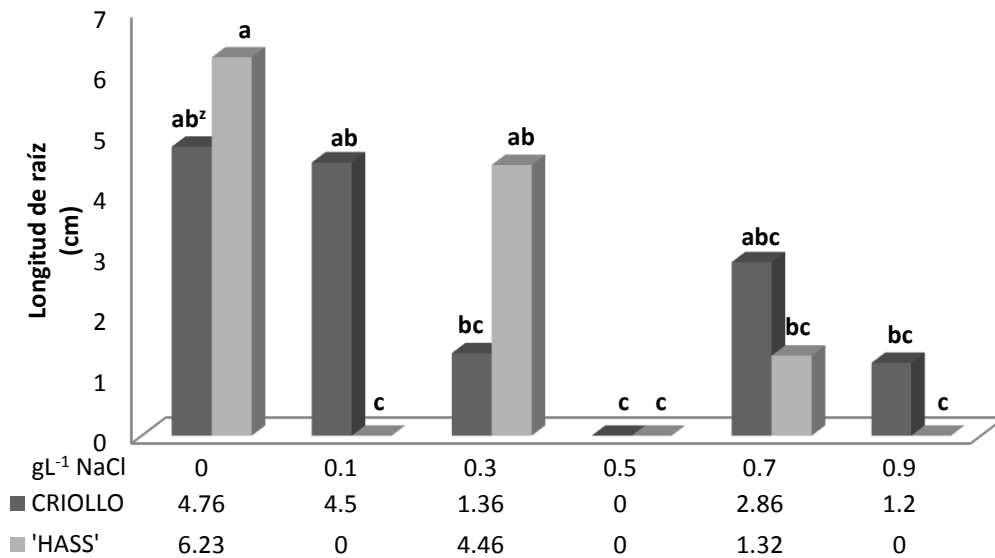


Figura 5. Longitud de raíz de plántulas de aguacate criollo y 'Hass' obtenidas de ejes embrionarios cultivados *in vitro* en diferentes concentraciones de NaCl (g^L-¹)

²Promedios con la misma letra son iguales estadísticamente según la prueba de Tukey (P≤0.05)

Longitud de tallo. En la Figura 6 se observa que en el testigo de 'Hass', la longitud de tallo fue superior en comparación al testigo de criollo, resultados similares se encontraron en la longitud de raíz; aunque, la longitud de raíz fue menor con respecto a la longitud de tallo. Resultado que permite determinar que la raíz tuvo menor

crecimiento que el tallo en ambos materiales. Con la presencia de NaCl, 'Hass' mostró una reducción drástica en la longitud de tallo, con 0.3 y 0.7 gL⁻¹ de NaCl. El criollo con 0.1 gL⁻¹ de NaCl, la longitud de tallo superó al testigo con 1.72 cm. Los dos cultivares con el resto de las concentraciones, la longitud de tallo fue significativamente muy variada. Empero, el promedio de cada material de aguacate en este experimento indicó que el criollo logró mayor longitud de tallo que el 'Hass' (3.37 cm contra 2.27 cm, respectivamente. Cuadro 2). En los dos materiales la longitud de la raíz fue más afectada que la longitud de tallo; aunque, 'Hass' fue menos tolerante a NaCl que criollo.

Fue notable que la formación y el crecimiento de la raíz y el tallo disminuyeran en presencia de NaCl, debido posiblemente a su efecto osmótico y/o tóxico, principalmente, ocasionado al sistema radicular. No obstante, se puede considerar que los embriones que lograron formar plántulas, pudo deberse a que la raíz tuvo la habilidad de controlar la entrada de iones tóxicos y la capacidad de absorber agua y mantener un balance hídrico y nutrimental, que permitieron su desarrollo (Espinar *et al.*, 2005). Debido al comportamiento diferencial de los ejes embrionarios de aguacate expuestos a NaCl, no se puede definir el umbral de tolerancia *in vitro* a NaCl pero si se puede sugerir que con esta técnica se pueden localizar materiales tolerantes de aguacate en corto tiempo.

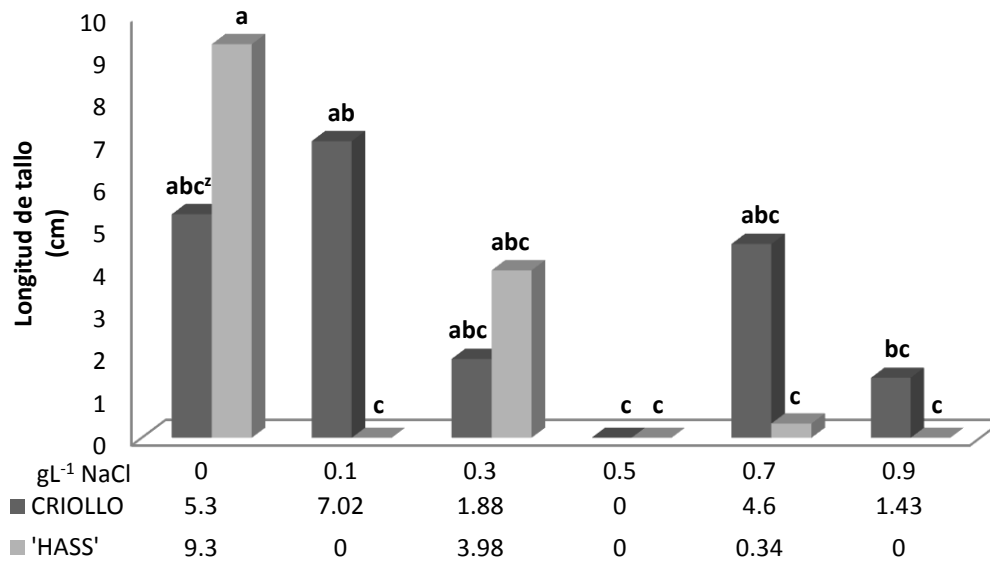


Figura 6. Longitud de tallo de brotes de aguacate criollo y 'Hass' obtenidas de ejes embrionarios cultivados *in vitro* en diferentes concentraciones de NaCl (g^L⁻¹)

²Promedios con la misma letra son iguales estadísticamente según la prueba de Tukey (P≤0.05)

Diámetro de raíz. El efecto de las concentraciones de NaCl en el diámetro de raíz y diámetro de tallo varió entre los cultivares de aguacate 'Hass' y criollo (Figura 7). La interacción que mostró superioridad estadística en el diámetro de raíz fue el cultivar 'Hass' con 0.3 g^L⁻¹ de NaCl, siguiéndole en orden de superioridad e igualdad estadística, el cultivar criollo tanto con 0.1 g^L⁻¹ de NaCl, como con el testigo. Los dos cultivares, en el resto de los tratamientos con NaCl, el diámetro de raíz fue severamente disminuido en comparación al testigo. En general, el criollo alcanzó un diámetro de raíz ligeramente superior a 1 mm y 'Hass', levemente inferior a 1 mm (Cuadro 2). El diámetro de raíz es una característica de la planta que influye en la absorción de los nutrimentos del suelo. Es decir, que a mayor diámetro se aumenta la superficie de contacto de la raíz y de igual manera se acrecenta la absorción potencial de nutrimentos. Esta varía entre especies, cultivares, edad de la planta y las condiciones en que se desarrolla (Pessarakli, 1999).

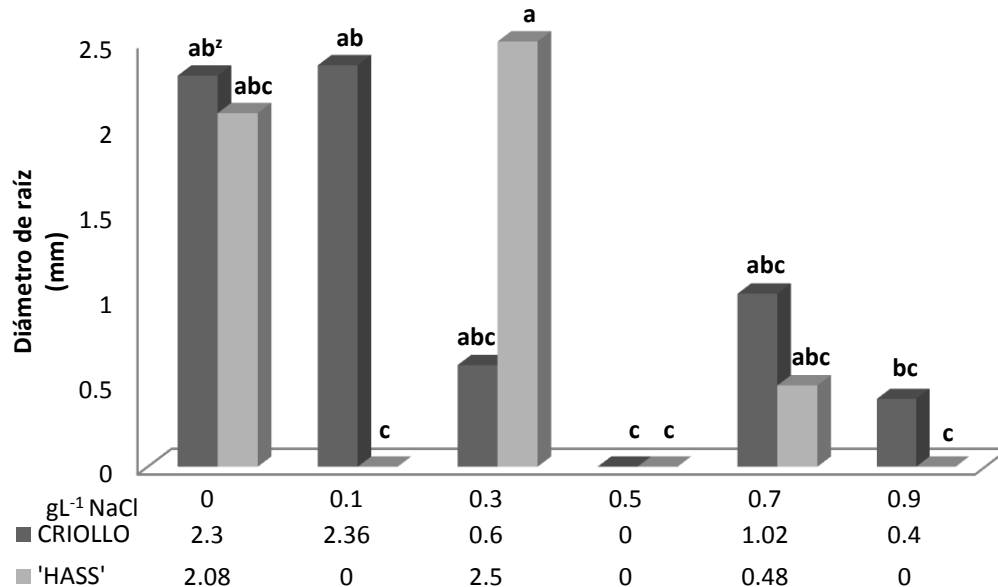


Figura 7. Diámetro de raíz de plántulas de aguacate criollo y 'Hass' obtenidas de ejes embrionarios a los 65 días de cultivo *in vitro* en diferentes concentraciones de NaCl (g^L⁻¹).
²Promedios con la misma letra son iguales estadísticamente según la prueba de Tukey (P≤0.05).

Diámetro de tallo. El grupo de interacciones significativas, en orden de superioridad estadística en el diámetro de tallo fueron: criollo con 0.1 g^L⁻¹ de NaCl y la interacción testigo de 'Hass' y testigo de criollo, con un diámetro de tallo de 2.60, 2.42 y 2.36 mm, respectivamente (Figura 8). Entre cultivares, el criollo tuvo un diámetro de tallo de 1.35 mm y 'Hass', 0.81 mm (Cuadro 2). En criollo, el diámetro de tallo fue 0.24 mm mayor que el de raíz, en tanto que en 'Hass', el diámetro de raíz fue 0.03 mm superior que el diámetro de tallo. En la mayoría de las plantas, el daño que se ocasiona al incrementar la salinidad es menor en la raíz que en el vástago (Munns, 1993), en estos materiales de aguacate, la raíz fue más sensible a la salinidad que el tallo de acuerdo a lo reportado por Bernstein *et al.*, (2004). El crecimiento de la raíz y del tallo, son parámetros clave en la respuesta de la planta al estrés salino, debido a que la raíz es el órgano encargado de dar soporte, absorber y transportar agua y nutrimentos al resto de la planta y, el tallo por contener los tejidos vasculares de conducción de estos elementos esenciales para el crecimiento (Jamil *et al.*, 2006). La tolerancia de las plantas a las sales está en función de la habilidad del sistema radical para excluir o limitar el transporte de iones tóxicos como Na y Cl a los tallos y restablecer su balance

hídrico para que el crecimiento prosiga (Maurel y Chrispeels, 2001; Renault *et al.*, 2001; Singh *et al.*, 2003).

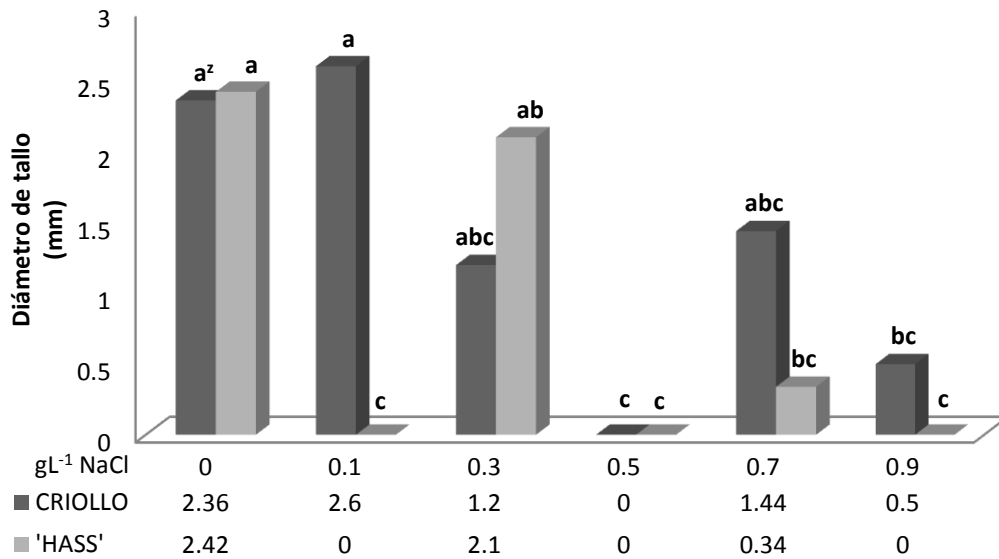


Figura 8. Diámetro de tallo en plántulas de aguacate criollo y 'Hass' obtenidas de ejes embrionarios a los 65 días de cultivo *in vitro* en diferentes concentraciones de NaCl (g^L-¹).
²Promedios con la misma letra son iguales estadísticamente según la prueba de Tukey (P≤0.05).

Número de hojas. En el testigo, sin sales, ambos materiales formaron el mismo número de hojas. En los tratamientos con NaCl, el criollo logró el mayor número de hojas a una concentración de 0.7 g^L-¹ de NaCl (Figura 9). En el resto de los tratamientos salinos los dos materiales tuvieron el mismo comportamiento, en cuanto al número de hojas formadas. El promedio entre cultivares, el criollo logró la formación de 2 hojas por tallo, mientras que el 'Hass' apenas formó una hoja (Cuadro 2).

Durante la formación y expansión de la hoja en condiciones salinas, se encontró que el criollo desarrolló hojas con lámina totalmente expandida, algunas de ellas con la punta necrosada (Figura 10A). En la mayoría de las plantas, el necrosamiento o daño foliar normalmente resulta por la alta acumulación de Na o Cl en las hojas (Zhu, 2002); en aguacate, este síntoma pudo ser debido al exceso de Cl más que de Na en el medio de desarrollo (Salazar *et al.*, 1987). En 'Hass', el crecimiento de yemas foliares fue escaso y apenas visible (Figura 10B); en consecuencia, la formación de hojas se redujo y la expansión foliar fue mínima. La raíz es el órgano inmediato que sufre la salinidad

más que las hojas (Jaleel *et al.*, 2007) por ser el primer órgano que queda expuesto a la salinidad (Rodríguez *et al.*, 1997); sin embargo, en la mayoría de las plantas el primer síntoma visible es la reducción de la expansión de la hoja (Parida y Das, 2005) como una reacción ante el estrés para conservar energía (Jaleel *et al.*, 2008) o a la inhibición de crecimiento ocasionada por la acumulación de sales (Prisco y O’Leary, 1970) o al desbalance en la síntesis de citocininas, que son las que promueven la división y alargamiento celular y por ende la expansión foliar (Pospíšilová *et al.*, 2000).

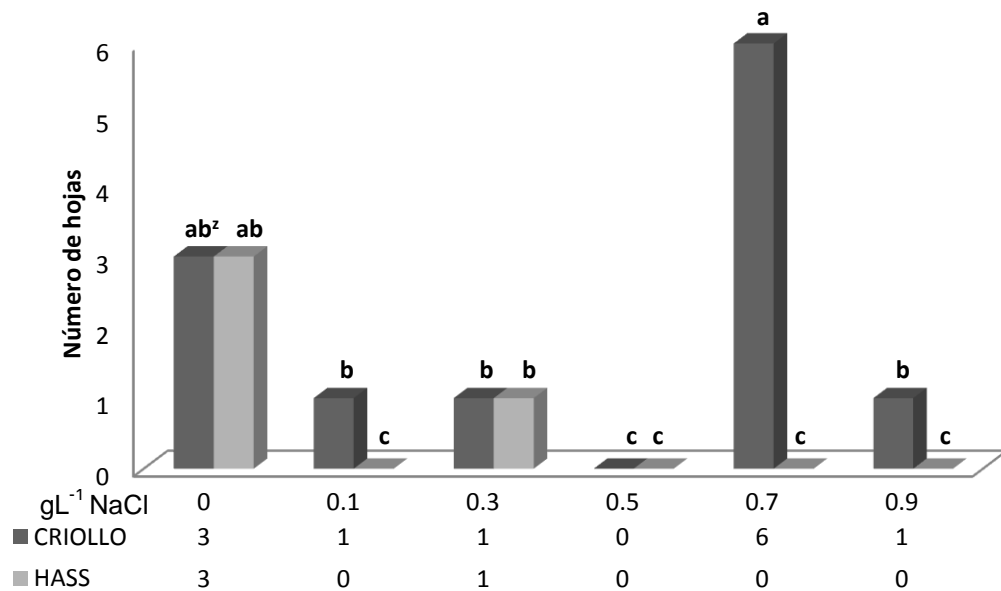


Figura 9. Número de hojas por plántula de aguacate criollo y ‘Hass’ obtenidos de ejes embrionarios a los 65 días de cultivo *in vitro* en diferentes concentraciones de NaCl (gL⁻¹).
²Promedios con la misma letra son iguales estadísticamente según la prueba de Tukey (P≤0.05).

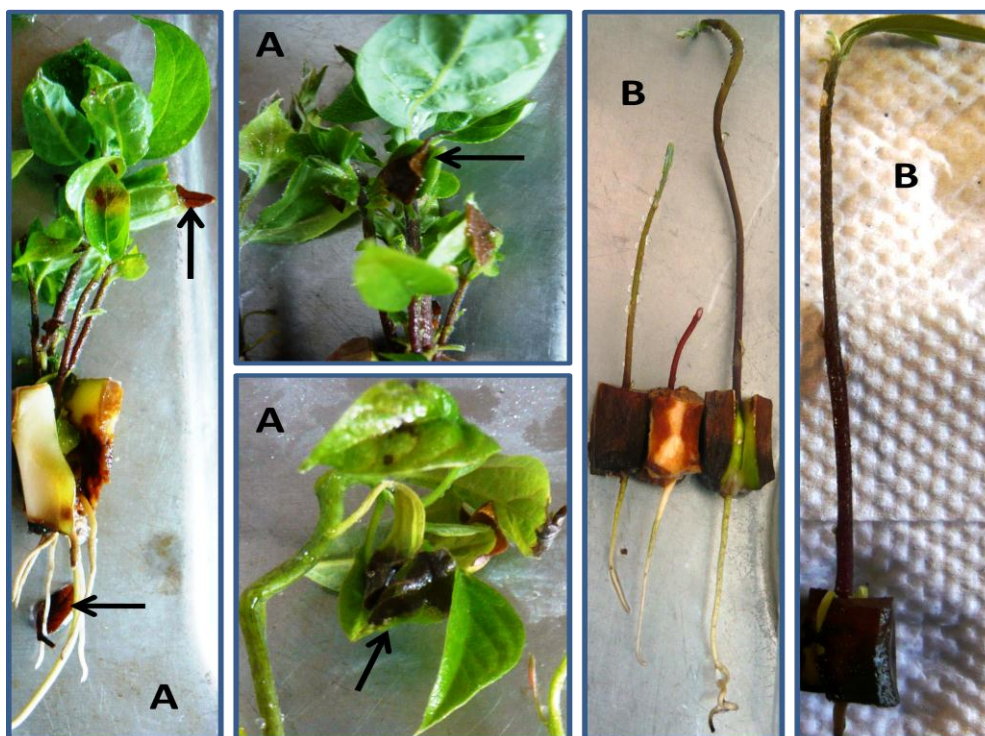


Figura 10. A) Criollo. Plántula completa con algunas hojas con punta necrosada y hojas caídas (flechas). B) 'Hass'. Hojas y yemas foliares.

La germinación y las características de crecimiento de las plántulas glicófitas pueden ser los primeros criterios para seleccionar plantas tolerante al estrés salino (Jamil *et al.*, 2006); debido a que la mayoría de estos cultivos pueden no crecer a concentraciones altas de sales y solo por definición, las halófitas logran su desarrollo hasta en concentraciones superiores a los 400 mM NaCl (Flowers, 2004). En aguacate, los principales cambios morfológicos notorios en condiciones salinas, sobre todo en 'Hass', fueron el crecimiento reducido, modificación de la relación parte aérea/raíz y limitación en la expansión foliar (Maurel y Chrispeels, 2001). Sin embargo, los ejes embrionarios que lograron germinar y continuar su crecimiento lograron sobrevivir en estrés salino.

Supervivencia. La salinidad afecta el desarrollo y supervivencia de las plantas en diferentes formas y este va a depender de la intensidad del estrés salino y del nivel de tolerancia del cultivo (Shannon *et al.*, 1994). En general, en este experimento se logró el 64 % de supervivencia (Cuadro 3), del cual se observó en orden de superioridad porcentual, la producción de plántulas (Figura 10A), ejes embrionarios crecidos

únicamente en volumen con tonalidad blanca (Figura 11B) posiblemente por la oxidación de la clorofila (Jaleel *et al.*, 2007) y en menor proporción tallos sin raíz (Figura 11C). En los dos materiales, el porcentaje de plántulas fue mayor. Entre materiales, 'Hass' superó con el 13 % en la supervivencia a criollo. No obstante, 'Hass' en comparación a criollo, el crecimiento fue detenido al lograr en mayor proporción ejes embrionarios crecidos en volumen, específicamente a concentraciones altas de NaCl. En el testigo, ambos cultivares lograron el 100 % de supervivencia, aunque, en criollo el porcentaje de plántulas fue menor al formar tallos sin raíz. En criollo, el porcentaje de supervivencia fue alto tanto en el testigo como en 0.1 gL⁻¹ de NaCl (100 %) y en 'Hass' resultó con 0.3 y 0.7 gL⁻¹ de NaCl. Se puede considerar, que los principales efectos perjudiciales por la baja o moderada salinidad, es la presión osmótica negativa provocada por la presencia de sales en la zona radicular (Vijayan, 2009) y aunque los mecanismos de tolerancia no son muy claros, una explicación de la supervivencia de las plántulas de aguacate al estrés salino, puede ser que desarrollaron efectos de adaptación que mediaron la homeostasis iónica, biosíntesis de osmolitos compatibles, inquirieron radicales tóxicos, aumentaron el transporte de agua y coordinaron la respuesta a larga distancia (Hasegawa *et al.*, 2000), o como lo indican Jaleel *et al.*, (2007), es debido a que las plántulas fueron capaces de manifestar ajuste osmótico, que es la primer respuesta típica de las plantas estresadas por la salinidad.

Cuadro 3. Promedios del porcentaje de supervivencia calculado en base a respuesta de crecimiento de aguacate criollo y 'Hass' cultivados *in vitro* en diferentes concentraciones de NaCl (gL⁻¹).

| Trat. | gL ⁻¹ NaCl | Supervivencia (%) | | Plántulas completas (%) | | Ejes embrionarios voluminosos (%) | | Brotos sin raíz (%) |
|---------------------|--------------------------|--------------------|-------|-------------------------|-------|-----------------------------------|------|---------------------|
| | | Criollo | Hass | Criollo | Hass | Criollo | Hass | Criollo |
| 1 | 0 | 100 a ^z | 100 a | 80 b | 100 a | 0 b | 0 c | 20 a |
| 2 | 0.1 | 100 a | 0 e | 100 a | 0 d | 0 b | 0 c | 0 b |
| 3 | 0.3 | 40 c | 100 a | 20 c | 100 a | 20 a | 0 c | 0 b |
| 4 | 0.5 | 0 e | 40 c | 0 d | 20 c | 0 b | 20 b | 0 b |
| 5 | 0.7 | 80 b | 100 a | 80 b | 20 c | 0 b | 80 a | 0 b |
| 6 | 0.9 | 20 d | 80 b | 20 c | 0 d | 0 b | 80 a | 0 b |
| Promedio cultivares | | 58 | 70 | 50 | 40 | 4 | 30 | 4 |
| Promedio general | | 64 | | 45 | | 17 | | 2 |

^zPromedios con la misma letra son iguales estadísticamente según la prueba de Tukey (P≤0.05).

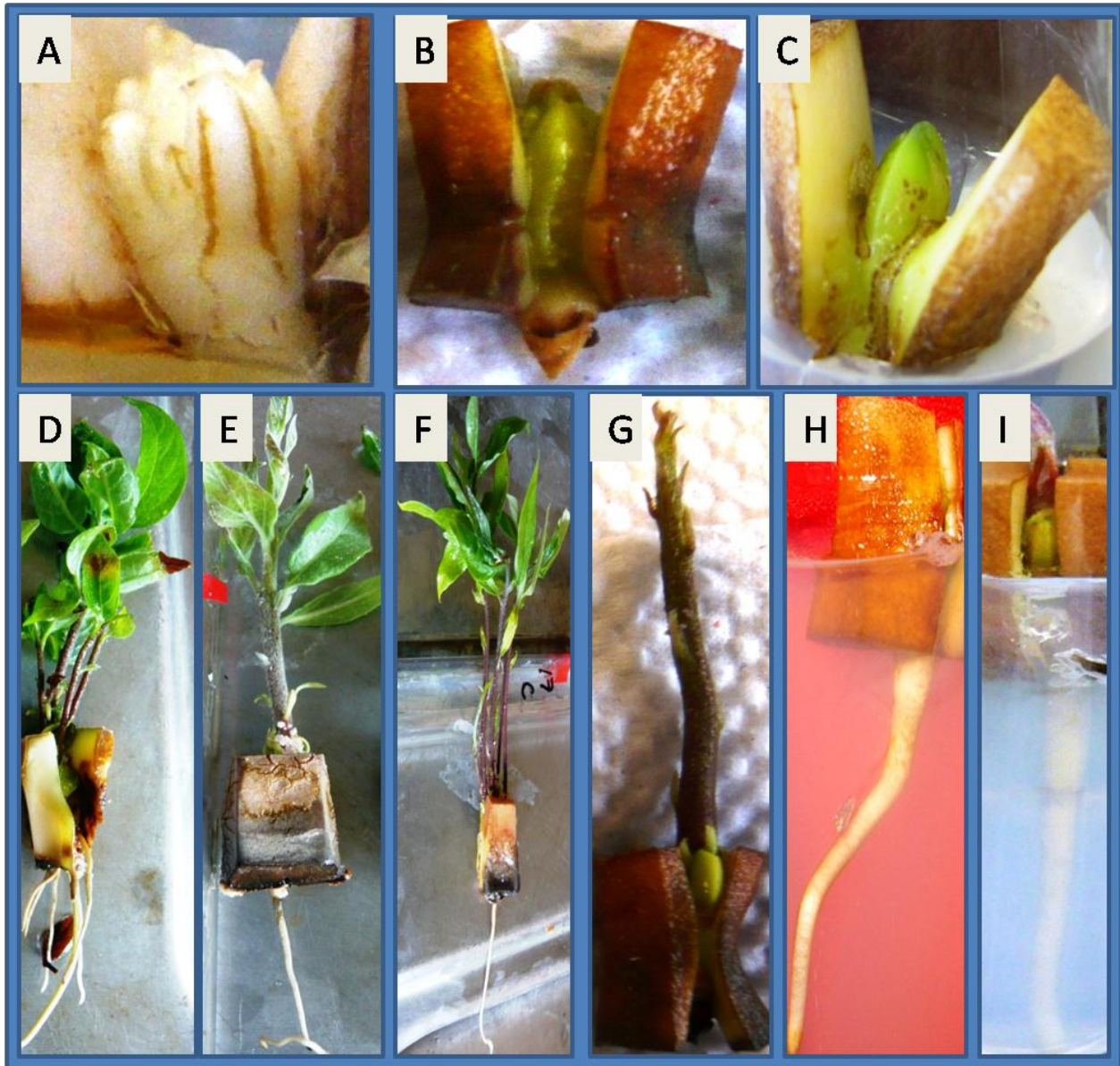


Figura 11. Supervivencia de aguacate criollo y 'Hass' cultivado *in vitro* en diferentes concentraciones y tipos de sales (gL^{-1}). A) Eje embrionario crecido en NaCl; B) Eje embrionario crecido en CaCl_2 ; C) Eje embrionario crecido en NaCl: CaCl_2 ; D) Plántula crecida en NaCl; E) Plántula crecida en CaCl_2 ; F) Plántula en NaCl: CaCl_2 ; G) Brote sin raíz; H) Raíz sin brote; I) Brote con plúmula incipiente.

La supervivencia se redujo por efectos negativos ocasionados por la presencia de NaCl en el medio de cultivo. Los efectos adversos observados fueron la oxidación y la deshidratación (Cuadro 4). En ambos cultivares, la oxidación ocurrió en mayor porcentaje tanto en ejes embrionarios crecidos en volumen como en plántulas (Figura 12A); la deshidratación sucedió únicamente en plántulas (Figura 12B). La oxidación fue

más frecuente en criollo, la cual osciló entre 0.3 y 0.9 g L⁻¹ de NaCl, con un promedio del 33 %. La oxidación pudo ser debido, a que la acumulación de Na y Cl en los tejidos, promueve la formación de especies reactivas al oxígeno (ROS), tales como radicales de superóxido (O₂), peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y radicales hidróxilos (OH) ocasionando daños en los lípidos de la membrana, oxidación de las proteínas y en los ácidos nucleicos (Askraf y McNeilly, 2004; Xu y Shi, 2007; Vinocur y Altman, 2005) y las plantas que lograron sobrevivir en condiciones de estrés, pudo ser a que activaron enzimas desintoxicantes de radicales de oxígeno, tales como superóxido dismutasa (SOD), ascorbato peroxidasa (APX), catalase (CAT) y moléculas antioxidantes como ácido ascórbico (AA), α-tocoferol y glutatona reducida (GSH) (Jaleel *et al.*, 2007). La desintoxicación de las ROS es un mecanismo que puede considerarse como una estrategia para incrementar la tolerancia al estrés salino en las plantas; el cual es realizado por un sistema de moléculas reducidas no enzimáticas como el AA (ácido ascórbico) y antioxidantes enzimáticos (Jaleel *et al.*, 2007).

Cuadro 4. Promedios del porcentaje de brotes deshidratados y ejes embrionarios oxidados de aguacate criollo y 'Hass cultivados *in vitro* en diferentes concentraciones de NaCl (gL⁻¹).

| Trat. | gL ⁻¹ NaCl | Deshidratación (%) | | Oxidación (%) | |
|---------------------|--------------------------|--------------------|------|---------------|--------|
| | | Criollo | Hass | Criollo | 'Hass' |
| 1 | 0.0 | 0 c ^z | 0 c | 0 f | 0 f |
| 2 | 0.1 | 0 c | 0 c | 0 f | 100 a |
| 3 | 0.3 | 20 b | 0 c | 40 d | 0 f |
| 4 | 0.5 | 20 b | 40 a | 80 b | 20 e |
| 5 | 0.7 | 0 c | 0 c | 20 e | 0 f |
| 6 | 0.9 | 20 b | 20 b | 60 c | 0 f |
| Promedio cultivares | | 10 | 10 | 33 | 20 |
| Promedio general | | 10 | | 27 | |

^zPromedios con la misma letra son iguales estadísticamente según la prueba de Tukey (P≤0.05).

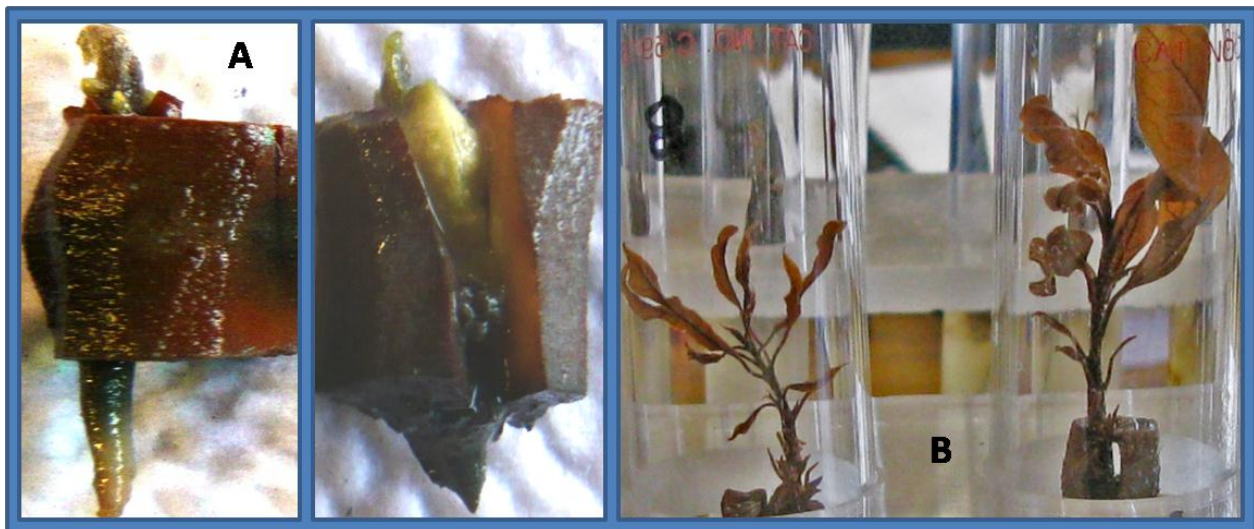


Figura 12. Respuesta que afectó la supervivencia de aguacate criollo y 'Hass' cultivado *in vitro* en diferentes concentraciones de NaCl (gL^{-1}). A) Ejes embrionarios oxidados; B) Plántulas deshidratadas.

Los efectos de la salinidad más comunes en plantas glicófitas son la pérdida de turgencia, reducción del crecimiento, hojas pequeñas, tallos cortos, senescencia prematura, fotosíntesis disminuida, cambios respiratorios, pérdida de la integridad celular, necrosis de tejido, y/o muerte de la planta (Cheeseman, 1988). En aguacate, el NaCl influyó negativamente en el crecimiento y supervivencia. 'Hass', mostró un crecimiento inversamente proporcional a la concentración de la sal; ocurrió que del 70 % de la supervivencia, aproximadamente, 50 % de los ejes embrionarios crecieran únicamente en volumen, aunque con tonalidad blanca posiblemente por la pérdida de clorofila (Figura 11A). En criollo, la supervivencia disminuyó por la oxidación, posiblemente, de diferentes componentes de las células (Vinacur y Altman, 2005). En campo, la primera respuesta visible al estrés salino es la detención de crecimiento de los vástagos (Lazorf y Bernstein, 1998; Munns, 1993). En cultivo *in vitro*, se tiene la ventaja de observar claramente el crecimiento del tallo y la raíz, así como registrar los cambios morfológicos y de crecimiento ocasionados por la presencia de NaCl en el medio, que conllevan también a detener su crecimiento.

Establecimiento de ejes embrionarios en CaCl₂

El análisis estadístico mostró interacción altamente significativa en porcentaje de germinación, días a inicio de emergencia, porcentaje de emergencia, porcentaje de supervivencia y significativa en longitud de tallo (Cuadro 6A). En días a inicio de germinación, longitud de raíz, diámetro de tallo, diámetro de raíz y número de hojas, la diferencia estadística fue no significativa, por lo tanto, la descripción de los resultados fue en base a los efectos simples de cada factor. Lo que permite inferir que debido a la adición de CaCl₂ en el medio de cultivo, el crecimiento pudo ser menos afectado o más uniforme, en comparación a lo interpretado en el experimento con NaCl; debido posiblemente a la participación del Ca en el crecimiento de los ejes embrionarios y/o a que este material vegetal tuvo la capacidad de inhibir el efecto de Cl y/o de secuestrarlo en alguna parte de la plántula (Castro *et al.*, 2009).

Días a inicio de germinación y porcentaje de germinación. El inicio de la germinación de los ejes embrionarios osciló entre 11 y 61 días de cultivo *in vitro* en CaCl₂; en promedio, 62 % de la germinación inició a los 31 días después del establecimiento *in vitro* del eje embrionario (Cuadro 5). En el testigo, 80 % de criollo inició a los 27 días, en tanto que en 'Hass', la germinación fue de 100 % a los 54 días (Figura 13 y 14). En los tratamientos con CaCl₂, la germinación de criollo fue menos afectada que 'Hass'. Resultados que permiten señalar que 'Hass' es menos tolerante a CaCl₂, posiblemente, por la presencia en exceso de cloro (Cl); el cual, es un ión que a concentraciones bajas es esencial en el metabolismo de las plantas (Salisbury y Ross, 1994) pero que a altos niveles puede ser tóxico (Zhu, 2001), sobretodo en aguacate como lo manifiestan Salazar-García *et al.* (1987); Salazar-García y Cortés-Flores, (1988) y Lahav (2003). Investigadores como Hewwit (1983) y Gobinathan *et al.* (2009) señalan que el calcio (Ca) es necesario en la germinación, favorece el crecimiento radicular y es requerido por el mecanismo selectivo de absorción de la plasmalema. Por esta razón, es posible que la adición de Ca en el medio de cultivo contrarrestara el efecto del ión acompañante (Cl), que ejerce en aguacate, lo que permitió tener mayor germinación en comparación a la respuesta obtenida de los ejes embrionarios

establecidos en NaCl, sal compuesta por dos iones tóxicos para la mayoría de las plantas.

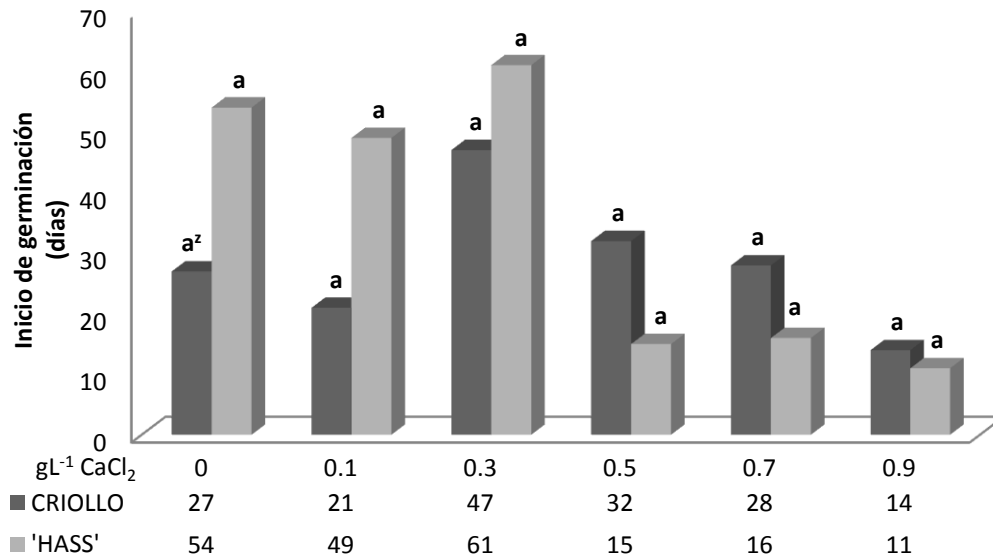


Figura 13. Días a inicio de germinación de ejes embrionarios de aguacate criollo y 'Hass' cultivados *in vitro* en diferentes concentraciones de CaCl_2 (gL^{-1}).

^zPromedios con la misma letra son iguales estadísticamente según la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$)

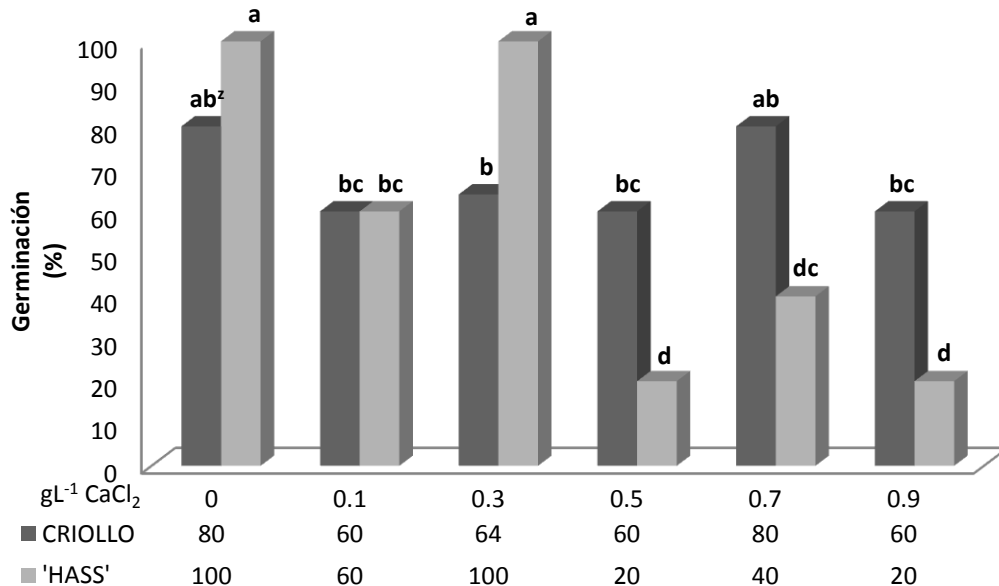


Figura 14. Porcentaje de germinación de ejes embrionarios de aguacate criollo y 'Hass' cultivados *in vitro* en diferentes concentraciones de CaCl_2 (gL^{-1}).

^zPromedios con la misma letra son iguales estadísticamente según la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$).

Cuadro 5. Promedios de días a inicio de germinación y porcentaje de germinación, días a inicio de emergencia y porcentaje de emergencia de ejes embrionarios de aguacate criollo y 'Hass' cultivados *in vitro* en diferentes concentraciones de CaCl_2 (gL^{-1}).

| Material vegetal | Inicio de germinación (días) | Germinación (%) | Inicio de emergencia (días) | Emergencia (%) |
|------------------|------------------------------|-----------------|-----------------------------|----------------|
| Criollo | 28 | 67 | 32 | 86 |
| 'Hass' | 34 | 57 | 35 | 60 |
| Promedio general | 31 | 62 | 34 | 73 |

Días a inicio de emergencia y porcentaje de emergencia. La aparición de la plúmula varió entre criollo y 'Hass' y las concentraciones de CaCl_2 . En el testigo, ambos materiales de aguacate emergieron al 100 %, la diferencia la marcó el tiempo de inicio en cada material; así, tenemos que 'Hass' emergió 12 días después que criollo (Figuras 15 y 16). En presencia de CaCl_2 en el medio, la emergencia del criollo fue directamente proporcional de 0.1 gL^{-1} hasta 0.5 gL^{-1} y en el resto de las concentraciones fue inversamente proporcional a la concentración de esta sal. En 'Hass', la emergencia fue del 100 % tanto en el testigo como en la concentración más baja de CaCl_2 (0.1 gL^{-1}); en los tratamientos restantes, el porcentaje de emergencia disminuyó, concretamente en las concentraciones altas de CaCl_2 . En promedio, 86 % de la emergencia en criollo inició a los 32 días y 60 % en 'Hass' fue a los 35 días (Cuadro 5). En CaCl_2 , la germinación y la emergencia de la plúmula de los ejes embrionarios mejoraron en comparación a los establecidos en NaCl ; se considera que esta respuesta puede estar asociada a que el CaCl_2 es menos dañino por estar compuesto por un catión divalente (Ca); el cual, es un nutrimento esencial e importante en el alargamiento y división celular, en la estructura y permeabilidad de las membranas celulares y a que en condiciones salinas, es esencial por su papel señalizador y su efecto sobre la actividad de algunos transportadores iónicos, como lo reportan Rengel (1992), Marschner (1995), Akinci y Simseck (2004) y Mahajan y Tuteja (2005). Por lo que, el Ca puede ser un elemento importante en la tolerancia del aguacate a la salinidad.

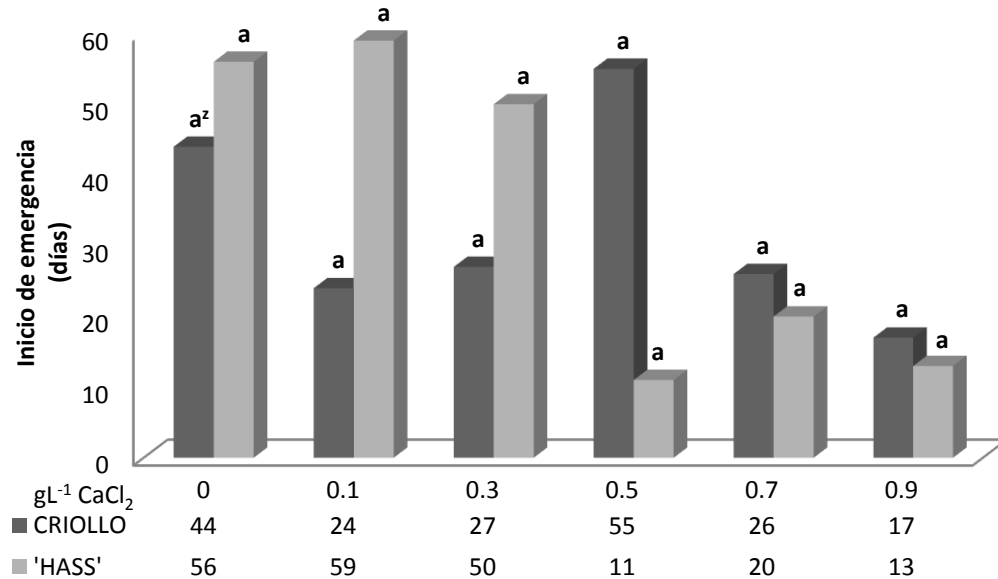


Figura 15. Días a inicio de emergencia de brotes de aguacate criollo y 'Hass' a partir de ejes embrionarios cultivados *in vitro* en diferentes concentraciones de CaCl₂ (g^L⁻¹).

^²Promedios con la misma letra son iguales estadísticamente según la prueba de Tukey (P≤0.05).

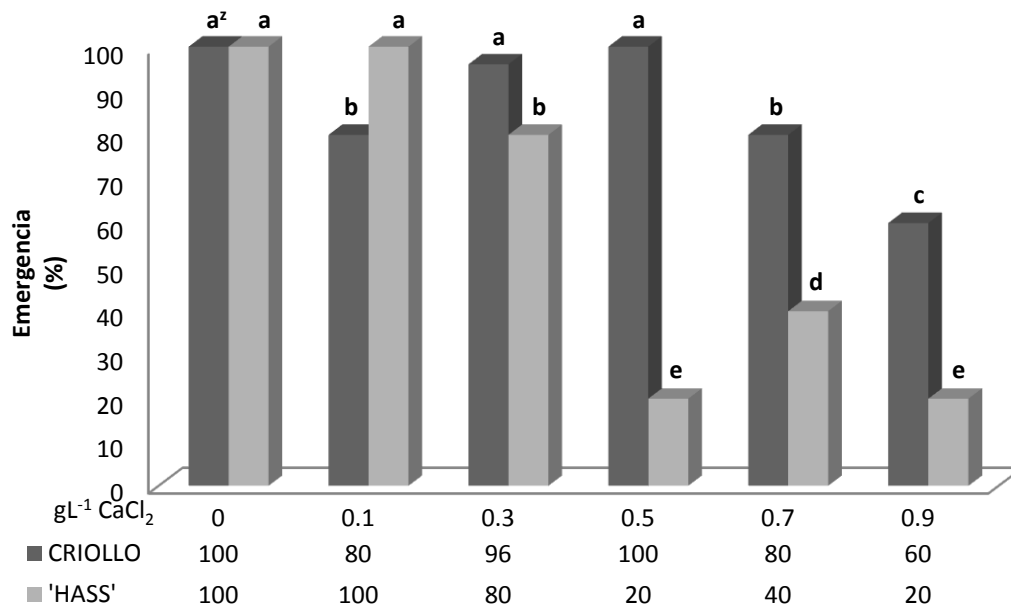


Figura 16. Porcentaje de emergencia de plúmula de aguacate criollo y 'Hass' a partir de ejes embrionarios cultivados *in vitro* en diferentes concentraciones de CaCl₂ (g^L⁻¹).

^²Promedios con la misma letra son iguales estadísticamente según la prueba de Tukey (P≤0.05).

Longitud de raíz. El crecimiento de las plántulas de aguacate medido con base en la longitud de raíz y tallo fue limitado por el estrés causado posiblemente por la presencia de Cl en la sal compuesta por CaCl_2 (Bernstein, 1975; Epstein y Rains, 1987; Sánchez, 2003). En comparación al testigo, con la adición de CaCl_2 al medio de cultivo, la longitud de raíz de 'Hass' se observó severamente disminuida (Figura 17). Si bien en el testigo, la longitud de raíz de 'Hass' fue 1.4 cm superior a la de criollo; con la adición de CaCl_2 el criollo tuvo un crecimiento de raíz mayor que 'Hass'. Lo que indica que 'Hass' fue menos tolerante al estrés por sales, aunque estas contengan elementos esenciales para su crecimiento. No obstante, el crecimiento de estos materiales fue menos afectado con CaCl_2 en comparación a los tratados con NaCl ; debido posiblemente a que el Ca también participa en el ajuste osmótico mediante la acumulación de solutos orgánicos compatibles, el cual favorece el balance hídrico y el crecimiento de la planta como lo mencionan Girija *et al.* (2002). A pesar de que, el empleo de CaCl_2 puede ser una práctica útil para mejorar la tolerancia de aguacate a la salinidad, Gobinathan *et al.*, (2009) señalan que no existe un consenso de su efectividad específicamente cuando se aplica como CaCl_2 .

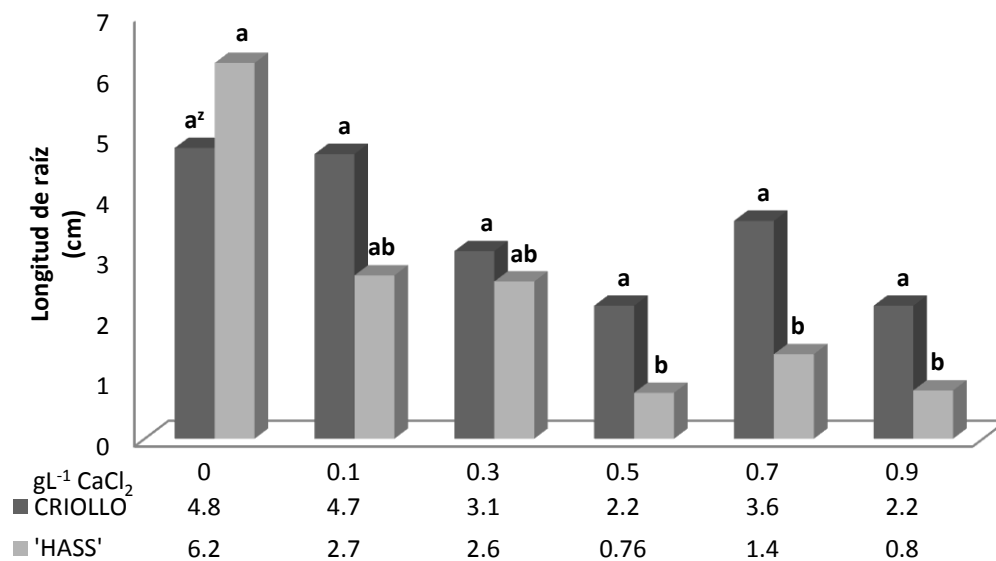


Figura 17. Longitud de raíz de plántulas de aguacate criollo y 'Hass' obtenidas de ejes embrionarios cultivados *in vitro* en diferentes concentraciones de CaCl_2 (gL^{-1}).

²Promedios con la misma letra son iguales estadísticamente según la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$).

Longitud de tallo. En el testigo, la longitud de tallo de 'Hass' superó a testigo de criollo con aproximadamente 23 % (Figura 18). En criollo, la longitud de tallo no mostró diferencia significativa entre las plántulas crecidas en CaCl_2 y el testigo; no obstante, la longitud de tallo, en el testigo fue ligeramente mayor con respecto a las concentraciones 0.3, 0.7 y 0.9 gL^{-1} y levemente menor en 0.1 y 0.5 gL^{-1} de CaCl_2 . En 'Hass', con la adición de CaCl_2 , el crecimiento de tallo fue inversamente proporcional a su concentración en el medio. Resultados que permiten señalar que en criollo, la longitud de tallo fue menos afectada por CaCl_2 , debido a que mostró un crecimiento de tallo más uniforme, en tanto que en 'Hass' se observó una asociación negativa entre la longitud de tallo y la concentración de CaCl_2 presente en la solución externa, es decir, la longitud de tallo disminuyó conforme la concentración de CaCl_2 se incrementó. La proporción aproximada tallo:raíz en criollo fue de 1.6:1 y en 'Hass' de 1.4:1; respuesta que permite sugerir que, el sistema radical, a pesar de ser el primer órgano afectado por la salinidad en la mayoría de las plantas (Jamil *et al.*, 2006) entre las que se puede incluir el aguacate (Bernstein *et al.*, 2004), tuvo la capacidad de regular la absorción de elementos necesarios a través de las membranas plasmáticas celulares y traslocarlos al vástago para que el crecimiento del tallo prosiguiera, proceso que puede ser asociado a la participación de Ca en la estabilidad de las membranas (Gobinathan *et al.*, 2009) y a la contribución de cloro en el ajuste osmótico de las raíces como lo señala Marschner (2002). Estudios recientes en aguacate han mostrado que la estimulación del crecimiento vegetativo en niveles bajos de salinidad, puede ser debido al alargamiento celular y a un aumento en el número de células como un resultado de la osmorregulación (Musiyimi *et al.*, 2007a).

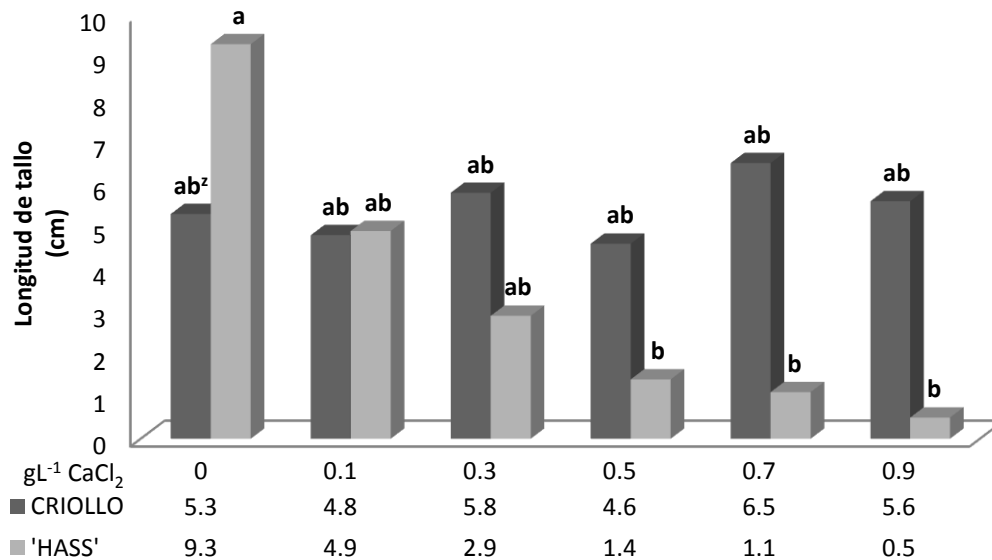


Figura 18. Longitud de tallo de brotes de aguacate criollo y 'Hass' obtenidas de ejes embrionarios cultivados *in vitro* en diferentes concentraciones de CaCl₂ (g^L⁻¹)

^zPromedios con la misma letra son iguales estadísticamente según la prueba de Tukey (P≤0.05).

Diámetro de raíz. A pesar de no encontrarse diferencia estadística entre los materiales de aguacate, la raíz en criollo fue aproximadamente 30 % más gruesa que la de 'Hass'. En el testigo, ambos materiales de aguacate consiguieron superar en el diámetro de raíz a la mayoría de las concentraciones de CaCl₂ (Figura 19). En los dos materiales experimentales expuestos en 0.5 g^L⁻¹ CaCl₂, el diámetro de raíz disminuyó notablemente. El aguacate es considerado como una especie sensible a la salinidad, la cual es reflejada en una reducción del crecimiento (Bernstein *et al.*, 2004; Mickelbart *et al.*, 2007); sin embargo, se ha observado cierto nivel de tolerancia que varía entre las razas mexicana, antillana y guatemalteca, entre materiales de una misma raza y entre portainjertos (Whiley *et al.*, 2002; Mickelbart y Arpaia, 2002). A pesar de que el cloro es el ión de mayor movilidad (Alcántar *et al.*, 2007) y el más dañino en el cultivo de aguacate (Salazar *et al.*, 1987), es posible que esta especie tenga la capacidad de secuestrarlo en las raíces, que le permite tolerar su presencia y lograr su crecimiento. Según Munns (2002), los materiales que muestran disturbios mínimos en el crecimiento en condiciones salinas o tienen un crecimiento vigorosos pueden ser indicadores de ser cultivares más tolerantes.

De acuerdo con Bernstein *et al.* (2004), el sistema radical de aguacate es más sensible a la salinidad que la parte aérea debido probablemente a que es un órgano que crece superficialmente, (lugar donde hay mayor acumulación de sales), con poca ramificación, lo que reduce la capacidad de absorción de agua y nutrimentos (Whiley *et al.*, 2002); razones por las cuales, se considera que las raíces en aguacate juegan un papel importante en la tolerancia a la salinidad (Bernstein *et al.*, 2003).

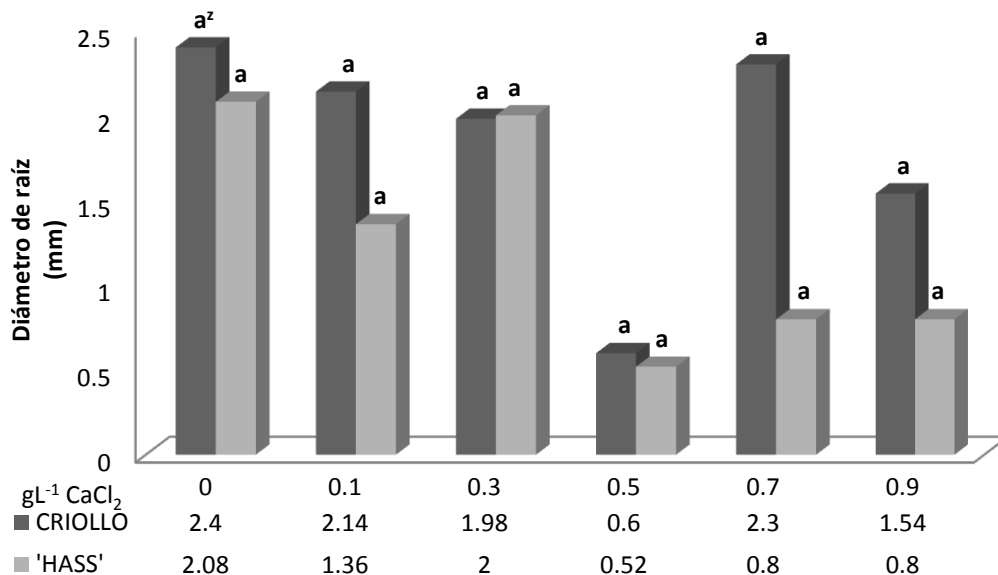


Figura 19. Diámetro de raíz de plántulas de aguacate criollo y 'Hass' obtenidas de ejes embrionarios a los 65 días de cultivo *in vitro* en diferentes concentraciones de CaCl₂ (g^L⁻¹)
²Promedios con la misma letra son iguales estadísticamente según la prueba de Tukey (P≤0.05).

Diámetro de tallo. El testigo de ambos materiales no mostró significancia en el diámetro de tallo; sin embargo, en 'Hass', el diámetro de tallo mostró una tendencia ligeramente superior al de criollo (Figura 20). En cuanto a los tratamientos con CaCl₂, el diámetro de tallo en 'Hass' manifestó una tendencia inversamente proporcional a la concentración y criollo, a pesar de no mostrar una tendencia, el diámetro de tallo fue superior al de 'Hass'; sobresaliendo la concentración 0.7 g^L⁻¹ de CaCl₂; por lo que se considera que criollo fue más tolerante que 'Hass' a esta sal. Musyimi *et al.* (2007) manifiestan que las modificaciones en el tamaño de los órganos de la planta en aguacate como, el incremento en el diámetro de tallo, son probablemente mecanismos

de respuesta a la salinidad para reducir la pérdida de agua y evitar el embolismo, los cuales afectan el crecimiento de la planta. De acuerdo con Zimmermann (1983), el embolismo consiste en la evaporación del agua en el interior de los conductos del xilema, produciéndose la obstrucción con aire del conducto afectado y se presenta cuando el potencial hídrico es muy negativo.

'Hass' es una variedad mejorada mayormente afectada por las sales, lo que permite suponer que en una plantación comercial el nivel de tolerancia es dependiente del portainjerto utilizado (Salazar *et al.*, 1987; Oster y Arpaia, 1992; Mickelbart *et al.*, 2007) y el criollo puede ser una alternativa como portainjerto para las variedades comerciales sensibles a salinidad, debido a que tuvo respuesta morfogénica diferente, modulada potencialmente por su variación genética natural (Dalsaso y Guevara, 1988).

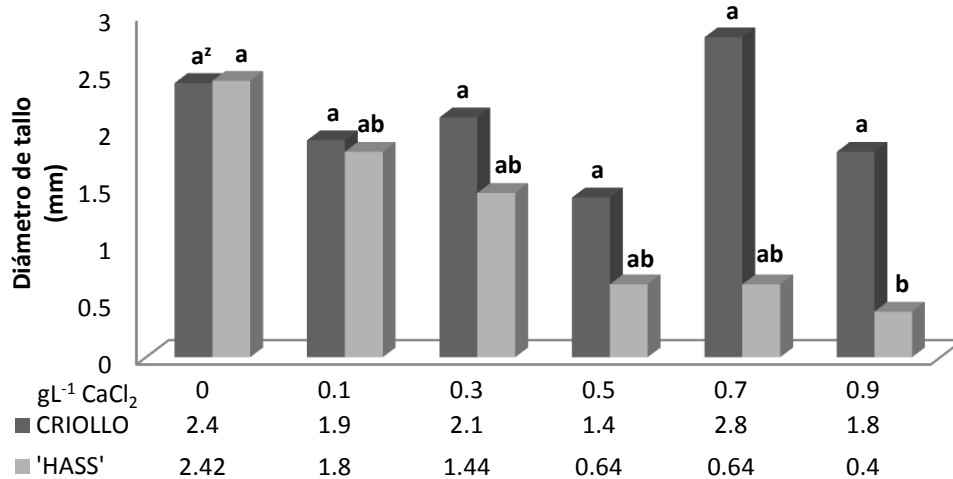


Figura 20. Diámetro de tallo en plántulas de aguacate criollo y 'Hass' obtenidas de ejes embrionarios a los 65 días de cultivo *in vitro* en diferentes concentraciones de CaCl₂ (g^L⁻¹).

²Promedios con la misma letra son iguales estadísticamente según la prueba de Tukey (P≤0.05).

Número de hojas. El efecto de CaCl₂ fue diferente únicamente en 'Hass'. En el testigo, ambos materiales formaron tres hojas. En 'Hass', el efecto de CaCl₂ fue negativamente significativo, pues la formación de hojas fue escasa y no formó hojas en la mayoría de

las concentraciones (Figura 21); en criollo, la respuesta fue positiva al favorecer la formación de hojas en todas las concentraciones de CaCl_2 ; aunque, en algunas concentraciones en mayor y otras en menor número de hojas que en el testigo. En promedio, criollo formó más hojas que 'Hass' en una proporción 3:1. Resultados que se pueden explicar de acuerdo a que Casierra-Posada y Rodríguez (2006) consideran cuando la concentración de sales en la solución externa de las células de la planta se incrementa, los potenciales osmótico e hídrico disminuyen limitando al sistema radical la absorción de agua y nutrientes y su distribución a la parte aérea. Lo anterior sugiere que criollo formó mayor número de hojas, debido a que tanto el diámetro de tallo como de raíz fueron mayores y por ende, pudo haber sido mejor la conexión entre estos órganos y favorecer a la parte aérea, el flujo de agua y nutrientes que son las sustancias esenciales para el crecimiento foliar.

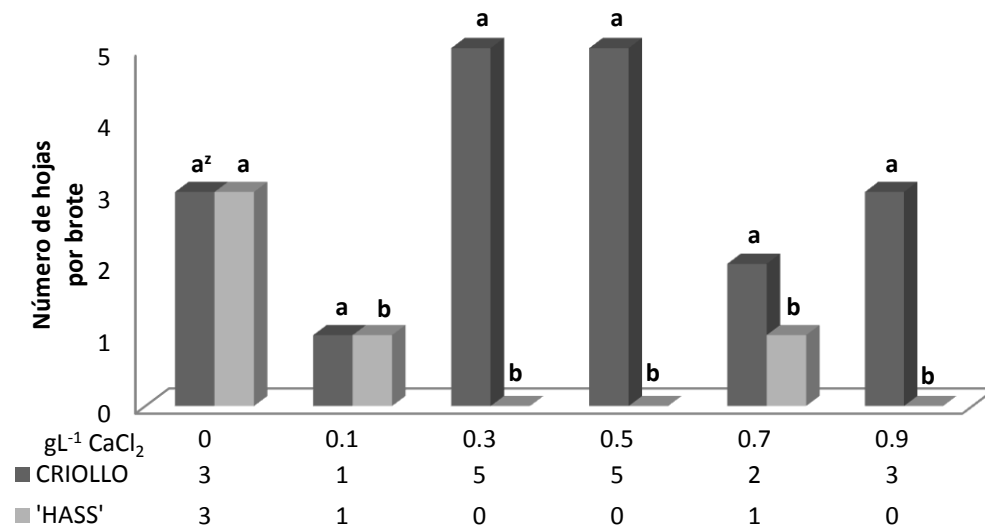


Figura 21. Número de hojas por plántula de aguacate criollo y 'Hass' obtenidos de ejes embrionarios a los 65 días de cultivo *in vitro* en diferentes concentraciones de CaCl_2 (g L^{-1}).
²Promedios con la misma letra son iguales estadísticamente según la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$).

Aunque no se encontró interacción significativa entre 'Hass' y criollo crecidos en CaCl_2 , en la mayoría de las variables evaluadas, entre estos materiales si se observaron diferencias de crecimiento, razón por la cual, y de acuerdo con Flowers *et al.* (1988) y Castro *et al.* (2009), las plantas que muestran mayor vigor, el cual puede

ser calificado con parámetros de crecimiento como diámetro de tallo, volumen radical y longitud de tallo, puede ser una evidencia de tolerancia a salinidad. Cualidades que el criollo mostró en este estudio, por lo que se puede considerar que mediante la técnica *in vitro* es posible identificar, a los 65 días de cultivo, materiales tolerantes a salinidad que puedan ser útiles como portainjerto.

Supervivencia. En los dos materiales de aguacate, la supervivencia fue mayor con la adición de CaCl_2 con respecto a la obtenida con NaCl . En promedio, la supervivencia y la obtención de plántulas en criollo fue 20 % mayor que 'Hass' (Cuadro 6). En el testigo de criollo y 'Hass', la supervivencia fue 100 %; sin embargo, en 'Hass' se produjeron 20 % más plántulas que en criollo. En los dos materiales, la producción de plántulas se afectó con la adición de CaCl_2 en el medio de crecimiento; en 'Hass' se apreció que la producción de plántulas disminuyó al observarse con mayor frecuencia ejes embrionarios crecidos en volumen (Figura 11B) y en criollo debido a que se formaron brotes sin raíz (Figura 11G). Los ejes embrionarios crecidos en volumen mostraron una tonalidad verde. Algunos investigadores indican que la detención del crecimiento de las plantas en condiciones salinas es ocasionado por el transporte reducido de agua, y de nutrimentos y hormonas de las raíces a las hojas (Azoos *et al.*, 2004; Musyimi, 2005), otros señalan que puede ser una respuesta adaptativa al estrés (Zhu, 2001) que les permite conservar energía y de ese modo desarrollar un mecanismo de defensa útil para minimizar el daño y poder sobrevivir (Jaleel *et al.*, 2007). Sin embargo, Hasegawa *et al.* (2000); Netondo *et al.* (2004a); Musyimi (2005) consideran que estos efectos están asociados a la capacidad de la salinidad de afectar el potencial hídrico externo, debido al efecto osmótico, con la toxicidad de un ion específico y el desbalance nutrimental.

Cuadro 6. Respuesta de crecimiento y porcentaje de sobrevivencia de aguacate criollo y 'Hass' cultivado *in vitro* en diferentes concentraciones de CaCl₂ (gL⁻¹).

| Trat. | gL ⁻¹ CaCl ₂ | Supervivencia (%) | | Plántulas (%) | | Ejes embrionarios crecidos en volumen (%) | | Brotos sin raíz (%) | Raíz sin plúmula (%) |
|---------------------|---------------------------------------|--------------------|-------|---------------|-------|---|------|---------------------|----------------------|
| | | Criollo | Hass | Criollo | Hass | Criollo | Hass | Criollo | Hass |
| 1 | 0.0:0.0 | 100 a ^z | 100 a | 80 b | 100 a | 0 b | 0 b | 20 b | 0 b |
| 2 | 0.1:0.1 | 100 a | 100 a | 80 b | 60 c | 0 b | 40 a | 20 b | 0 b |
| 3 | 0.3:0.3 | 100 a | 100 a | 80 b | 80 b | 0 b | 0 b | 20 b | 20 a |
| 4 | 0.5:0.5 | 100 a | 20 d | 60 c | 20 e | 0 b | 0 b | 40 a | 0 b |
| 5 | 0.7:0.7 | 80 b | 80 b | 80 b | 40 d | 0 b | 40 a | 0 c | 0 b |
| 6 | 0.9:0.9 | 100 a | 60 c | 60 c | 60 c | 40 a | 40 a | 0 c | 0 b |
| Promedio cultivares | | 97 | 77 | 73 | 53 | 7 | 20 | 17 | 3 |
| Promedio general | | 87 | | 63 | | 14 | | 8 | 2 |

^zPromedios con la misma letra dentro de cada columna son iguales según la prueba de Tukey (P≤0.05).

En 'Hass', la supervivencia fue reducida por CaCl₂, debido a la producción de brotes deshidratados y oxidados (Cuadro 7). Zekri (1993) menciona que la salinidad reduce significativamente la germinación, emergencia y supervivencia de las plantas al disminuir la absorción de agua y por la absorción excesiva de iones tóxicos, como en este caso, el cloro pudo haber sido para 'Hass', dado que algunas plántulas se deshidrataran a los 65 días de cultivo *in vitro*. Es posible que en concentraciones altas de CaCl₂, el Cl, por ser un ión de rápida movilidad, (Alcántar *et al.*, 2007) desplazara al Ca de las membranas celulares y espacios intracelulares como lo señala Dimassi-Theriou, (1998). La oxidación, causada por los compuestos fenólicos presentes en aguacate, pudo ser estimulada por la luz (Mohamed-Yasseen, 1993) o como una consecuencia del estrés salino por la excesiva generación de especies reactivas al oxígeno (ROS) (Jaleel *et al.*, 2007).

Cuadro 7. Promedios del porcentaje de brotes deshidratados y ejes embrionarios oxidados de aguacate criollo y 'Hass' cultivados *in vitro* en diferentes concentraciones de CaCl₂ (gL⁻¹).

| Trat. | gL ⁻¹ CaCl ₂ | Deshidratación (%) | | Oxidación (%) | |
|---------------------|---------------------------------------|--------------------|------|---------------|--------|
| | | Criollo | Hass | Criollo | 'Hass' |
| 1 | 0.0 | 0 c | 0 c | 0 b | 0 b |
| 2 | 0.1 | 0 c | 0 c | 0 b | 0 b |
| 3 | 0.3 | 0 c | 0 c | 0 b | 0 b |
| 4 | 0.5 | 0 c | 80 a | 0 b | 0 b |
| 5 | 0.7 | 20 b | 0 c | 0 b | 20 a |
| 6 | 0.9 | 0 c | 20 b | 0 b | 20 a |
| Promedio cultivares | | 3 | 17 | 0 | 7 |
| Promedio general | | 10 | | 3 | |

^zPromedios con la misma letra son iguales estadísticamente según la prueba de Tukey (P≤0.05)

Establecimiento de ejes embrionarios en NaCl:CaCl₂

El análisis de varianza reveló interacción altamente significativa en días a inicio de germinación, porcentaje de germinación, porcentaje de emergencia y porcentaje de supervivencia e interacción significativa en longitud de raíz (Cuadro 7A). En las variables: días a inicio de emergencia, longitud de tallo, diámetro de raíz y diámetro de tallo la interacción no fue significativa; por ello, los resultados se describen y discuten de acuerdo a los efectos simples de cada factor. El efecto simple de NaCl:CaCl₂ fue no significativo en el número de hojas entre criollo y 'Hass'. En este experimento, es posible que los procesos de germinación, emergencia y supervivencia fueron más afectados por la combinación de sales, que el crecimiento cuantificado por la longitud de tallo, diámetro de raíz, diámetro de tallo y número de hojas de las plántulas estresadas de criollo y 'Hass'.

Días a inicio de germinación y porcentaje de germinación. En el testigo de criollo, la germinación inició 27 días antes que en el testigo de 'Hass' (Figura 22); no obstante, en 'Hass', la germinación fue 20 % mayor que criollo (Figura 23). En los materiales considerados, la germinación fue directamente proporcional cuando la concentración de la relación NaCl:CaCl₂ aumentó de 0.1:0.1 a 0.3:0.3 gL⁻¹ e inversamente proporcional a medida que se incrementó la combinación de estas sales a niveles superiores de la última relación indicada. En 'Hass', 100 % de los ejes embrionarios germinaron en el testigo y en la concentración 0.3:0.3 gL⁻¹ de NaCl:CaCl₂; empero, la germinación inició 9 días antes con la adición de NaCl:CaCl₂ con respecto al testigo. En criollo, la germinación fue mejor con 0.3:0.3 gL⁻¹ de NaCl:CaCl₂; debido a que, la germinación inició 4 días antes que el testigo y lo superó con 12 %. Estos resultados indican que es posible que en aguacate, la germinación se acelere con la adición moderada de estas sales, al ocurrir que los tejidos embriogénicos maduren y la germinación suceda más rápido. En criollo y 'Hass, la germinación fue afectada con 0.7:0.7 y 0.9:0.9 gL⁻¹ de NaCl:CaCl₂; con estas concentraciones, en criollo, la germinación requirió menos días para iniciar pero el porcentaje fue menor comparado con las concentraciones ≤ 0.5:0.5 gL⁻¹ de NaCl:CaCl₂ y en 'Hass', los ejes embrionarios no germinaron (Figura 22).

Resultados que pueden ser asociados a la presencia excesiva de Na y Cl que inhibieron la absorción y transporte, además de agua, de iones que influyen en la germinación y crecimiento de las plantas como es el Ca (Akinci y Simsek, 2004). Por su parte, Zekri (1993) señala que en cítricos, la germinación se inhibe, debido a la disminución del potencial osmótico en el medio de desarrollo ocasionado por la salinidad, que trae como consecuencia un desbalance hídrico y un efecto tóxico para el embrión. Sin embargo, una parte de los embriones lograron germinar, y fue, posiblemente, porque la adición de Ca en el medio disminuyó el efecto tóxico de Na y Cl o a que el embrión tuvo la capacidad de absorber agua y mantener la turgencia requerida para llevar a cabo el proceso de germinación (Tester y Davenport, 2003).

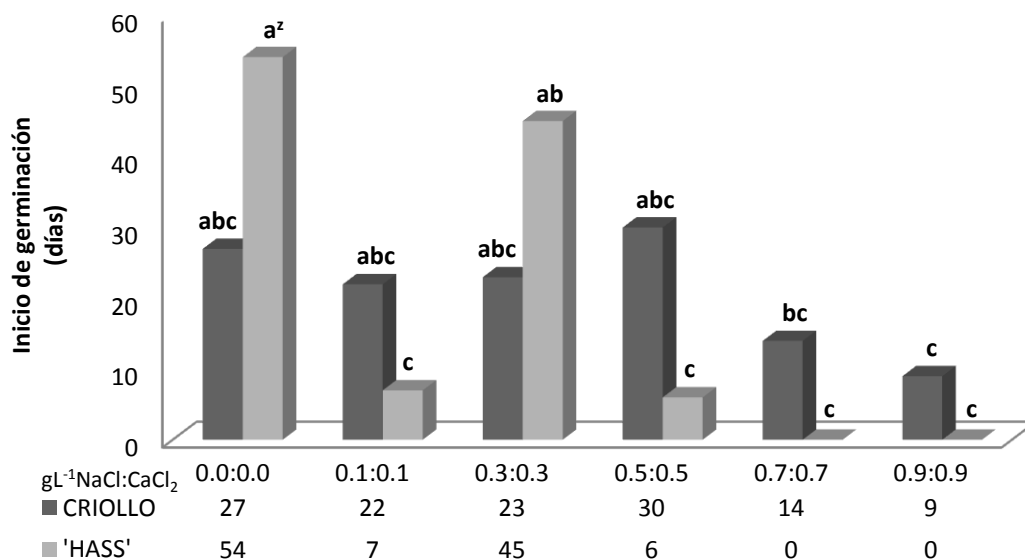


Figura 22. Días a inicio de germinación de ejes embrionarios de aguacate criollo y 'Hass' cultivados *in vitro* en diferentes concentraciones de NaCl:CaCl₂.

²Promedios con la misma letra son iguales estadísticamente según la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$).

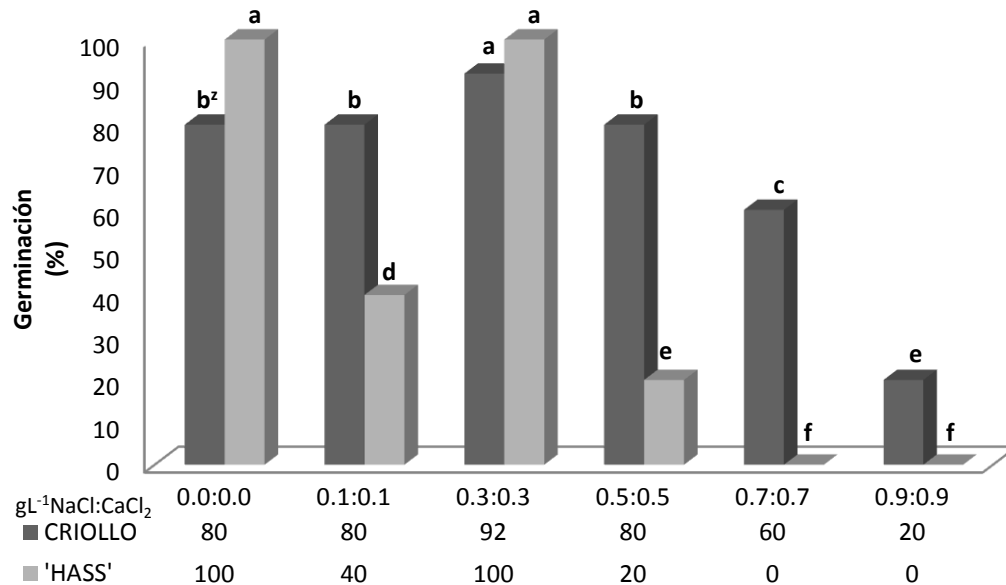


Figura 23. Porcentaje de germinación de ejes embrionarios de aguacate criollo y 'Hass' cultivados *in vitro* en diferentes concentraciones de NaCl:CaCl₂.

²Promedios con la misma letra son iguales estadísticamente según la prueba de Tukey (P≤0.05)

Días a inicio de emergencia y porcentaje de emergencia. En el testigo de los materiales considerados, la emergencia fue de 100 %; sólo que criollo emergió 12 días antes que 'Hass' (Figuras 24 y 25). En los dos materiales de aguacate, tanto los días a emergencia como el porcentaje de emergencia incrementaron al aumentar la concentración de 0.1:0.1 a 0.3:0.3 gL⁻¹ de NaCl:CaCl₂ y disminuyeron conforme la concentración incrementó hasta 0.9:0.9 gL⁻¹ de NaCl:CaCl₂. Lo que indica que la emergencia se retardó pero fue en mayor proporción. En 'Hass', la emergencia fue nula con 0.7:0.7 y con 0.9:0.9 gL⁻¹ de NaCl:CaCl₂. Es posible que, con 0.1:0.1, 0.3:0.3 y 0.5:0.5 gL⁻¹ de NaCl:CaCl₂, el Na y Cl no limitaron la efectividad del Ca en la absorción de agua y nutrientes a través de la membrana plasmática, ni en la elongación y división celular, ni en la estructura y permeabilidad de las membranas celulares y ni en la traslocación de carbohidratos, para que la emergencia se llevara a cabo pero con 0.7:0.7 y 0.9:0.9 gL⁻¹ de NaCl:CaCl₂, la concentración de Na y Cl fue mayor lo que pudo ocasionar que en criollo, la emergencia disminuyera y en 'Hass', se inhibiera (Gobinathan *et al.*, 2009).

Aun cuando los porcentajes de germinación y emergencia se redujeron en la mayoría de las concentraciones de NaCl:CaCl₂; con la adición de estas sales al medio, estos procesos se aceleraron, lo que sugiere, que la presencia de sales en el medio externo puede conseguir la maduración prematura de los tejidos. Los embriones que toleraron el estrés y consiguieron su crecimiento fue porque posiblemente tuvieron la capacidad de incluir los iones tóxicos como Cl y Na en la vacuola, excluirlos de *novo* al medio o secuestrarlos en alguna parte de sus tejidos.

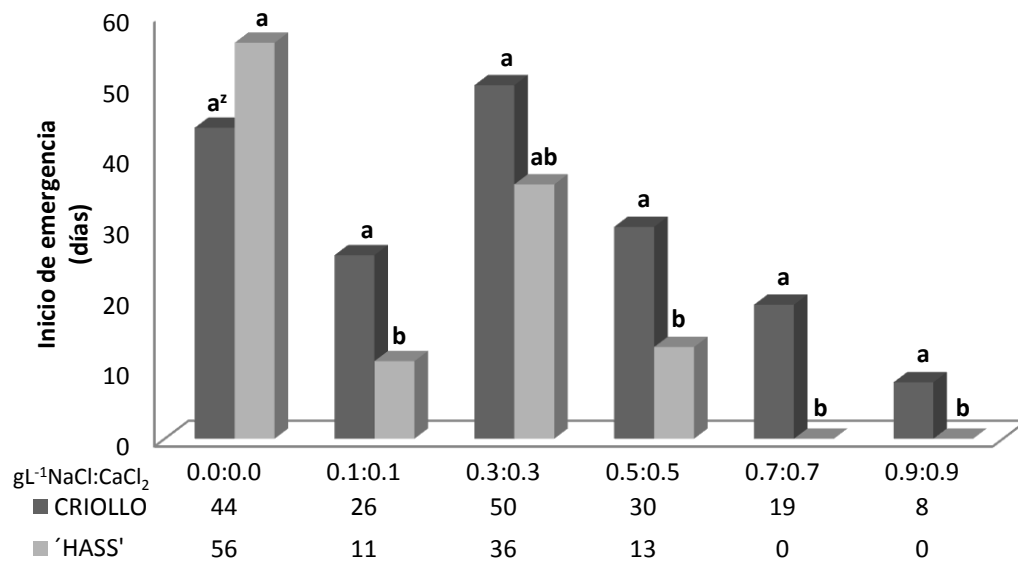


Figura 24. Días a inicio de emergencia de brotes de aguacate criollo y 'Hass' a partir de ejes embrionarios cultivados *in vitro* en diferentes concentraciones de NaCl:CaCl₂ (g^L⁻¹).

²Promedios con la misma letra son iguales estadísticamente según la prueba de Tukey (P≤0.05)

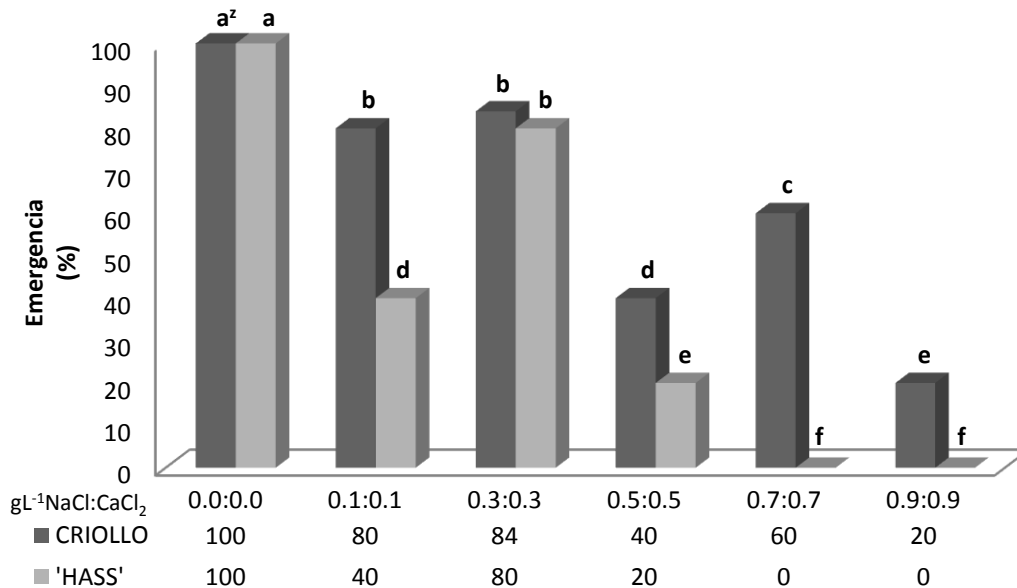


Figura 25. Porcentaje de emergencia de plúmula de aguacate criollo y 'Hass' a partir de ejes embrionarios cultivados *in vitro* en diferentes concentraciones de NaCl:CaCl₂ (g^L⁻¹).

²Promedios con la misma letra son iguales estadísticamente según la prueba de Tukey (P≤0.05).

Longitud de raíz. En el testigo, la longitud de raíz de 'Hass' fue 1.4 cm mayor que criollo. Aún cuando la longitud de raíz fue estadísticamente igual en 'Hass' con 0.3:0.3 g^L⁻¹ de NaCl:CaCl₂ y el testigo de criollo, la raíz de 'Hass' creció 0.6 cm más que la de criollo (Figura 26). De acuerdo con Goykovic y Saavedra (2007), la magnitud de las respuestas de las plantas se encuentra estrechamente relacionada a la concentración de las sales, a la duración del estrés a que están expuestas y a la especie o material vegetal de que se trate. En criollo, la longitud de raíz fue inversamente proporcional a la concentración de esta mezcla de sales; en 'Hass', la raíz consiguió crecer con 0.1:0.1 y 0.3:0.3 g^L⁻¹ de NaCl:CaCl₂, pero conforme la concentración de la combinación incrementó, el crecimiento radical fue escaso o nulo. Resultados que indican que en ambos, el sistema radical fue sensible a NaCl:CaCl₂; aunque en 'Hass', fue más acentuada. Al-Karaki (2000) y Goykovic y Saavedra (2007) determinan que en raíces de tomate, el aumento en la concentración de sales afecta adversamente el crecimiento radical, posiblemente porque, las sales alteran la absorción de agua al reducir el potencial hídrico del medio y provocan un desequilibrio iónico que produce toxicidad y desbalance nutrimental; hecho que puede afectar el crecimiento general de la planta. La

adición de CaCl_2 en el medio de cultivo a la misma proporción de NaCl mejoró el crecimiento radical de las plántulas de aguacate criollo y 'Hass' en comparación a los establecidos en NaCl . Epstein (1998) indica que el efecto benéfico de la adición de Ca al ambiente de la raíz en plantas estresadas con NaCl puede ser asociado con el mantenimiento de la integridad de la membrana celular, la cual reduce la absorción de Na por la raíz y contribuye a su reducción en el vástago.

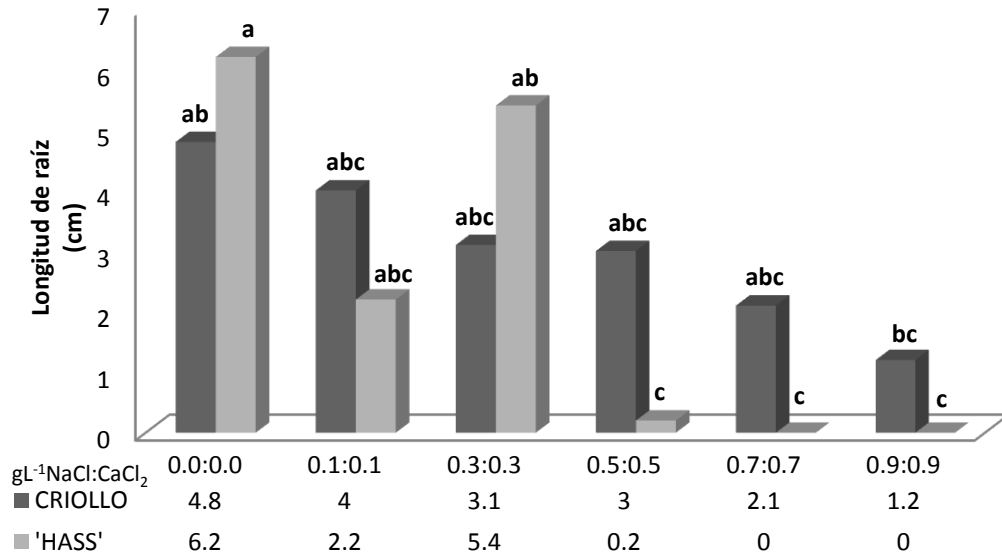


Figura 26. Longitud de raíz de plántulas de aguacate criollo y 'Hass' obtenidas de ejes embrionarios cultivados *in vitro* en diferentes concentraciones de $\text{NaCl}:\text{CaCl}_2$ (gL^{-1}).
²Promedios con la misma letra son iguales estadísticamente según la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$).

Longitud de tallo. El efecto de las concentraciones de $\text{NaCl}:\text{CaCl}_2$ en la longitud de tallo fue diferente únicamente en 'Hass'. En el testigo de 'Hass', las plántulas obtuvieron un tallo 4.0 cm más largo que las de criollo pero con la adición de $\text{NaCl}:\text{CaCl}_2$ el tallo de criollo creció más que el de 'Hass' (Figura 27). En 'Hass', cuando la concentración incrementó de 0.1:0.1 a 0.3:0.3 gL^{-1} de $\text{NaCl}:\text{CaCl}_2$, la longitud de tallo aumentó más del doble pero a medida que se acrecentó la concentración de $\text{NaCl}:\text{CaCl}_2$, el crecimiento de tallo decreció severamente posiblemente como una respuesta de toxicidad o a la síntesis limitada y distribución reducida de hormonas de las raíces a la parte aérea (Azooz *et al.*, 2004). En criollo, aún cuando la mezcla de $\text{NaCl}:\text{CaCl}_2$ no influyó estadísticamente en la longitud de tallo, numéricamente indica que la adición de $\text{NaCl}:\text{CaCl}_2$ a concentraciones 0.1:0.1 y 0.3:0.3 gL^{-1} reflejaron efecto positivo, debido a

que el tallo fue 0.9 cm y 2.4 cm (respectivamente) más largo que en el testigo; en el resto de las concentraciones, el efecto fue negativo al observar que la longitud de tallo disminuyó más de 50 %. Se puede considerar que, las concentraciones 0.1:0.1 y 0.3:0.3 gL⁻¹ de NaCl:CaCl₂ en el medio favorecieron el crecimiento de tallo, debido posiblemente a la participación de calcio, por ser un elemento que interviene en la acumulación de solutos orgánicos; sustancias que contribuyen en el ajuste osmótico en la raíz, manteniendo el balance hídrico y favoreciendo el crecimiento de la planta como lo señalan Silva *et al.* (2003).

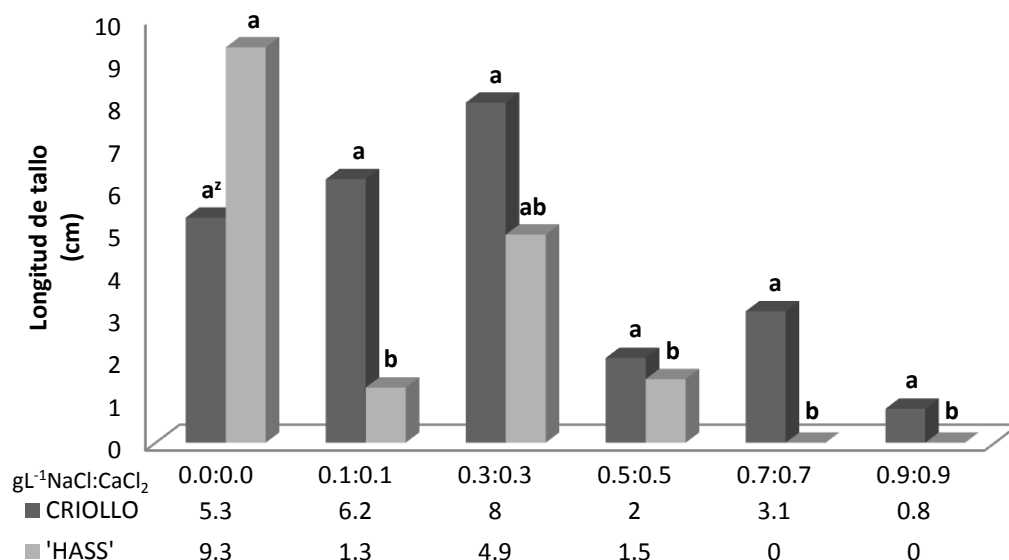


Figura 27. Longitud de tallo de brotes de aguacate criollo y 'Hass' obtenidas de ejes embrionarios cultivados *in vitro* en diferentes concentraciones de NaCl:CaCl₂ (gL⁻¹).

²Promedios con la misma letra son iguales estadísticamente según la prueba de Tukey (P≤0.05).

Diámetro de raíz. En 'Hass', el diámetro de raíz varió entre las concentraciones de NaCl:CaCl₂ (Figura 28). Aún cuando en el testigo de ambos materiales no mostró diferencia estadística en el diámetro de raíz, en criollo, la raíz fue 0.22 mm más gruesa. En 'Hass', el diámetro de raíz fue directamente proporcional de 0.1:0.1 a 0.3:0.3 gL⁻¹ de NaCl:CaCl₂ e inversamente proporcional en el resto de las concentraciones al ser mayores. Pese a que en criollo, el diámetro de raíz no existió efecto significativo entre tratamientos, numéricamente se observaron diferencias. Por ejemplo, en la concentración 0.5:0.5 gL⁻¹ de NaCl:CaCl₂, el diámetro de raíz fue escasamente menor al testigo y en 0.9:0.9 gL⁻¹ de NaCl:CaCl₂, fue disminuido severamente. Una disminución

del diámetro de raíz puede ser debido a un decline irreversible en el alargamiento de la pared celular provocado por la salinidad; en una relación alta Na:Ca, el Na puede desplazar el Ca de la membrana plasmática e inmediatamente, la fisiología y función de la membrana podría cambiar y afectar la homeostasis del Ca en la célula como una primera respuesta al estrés (Rengel, 1992).

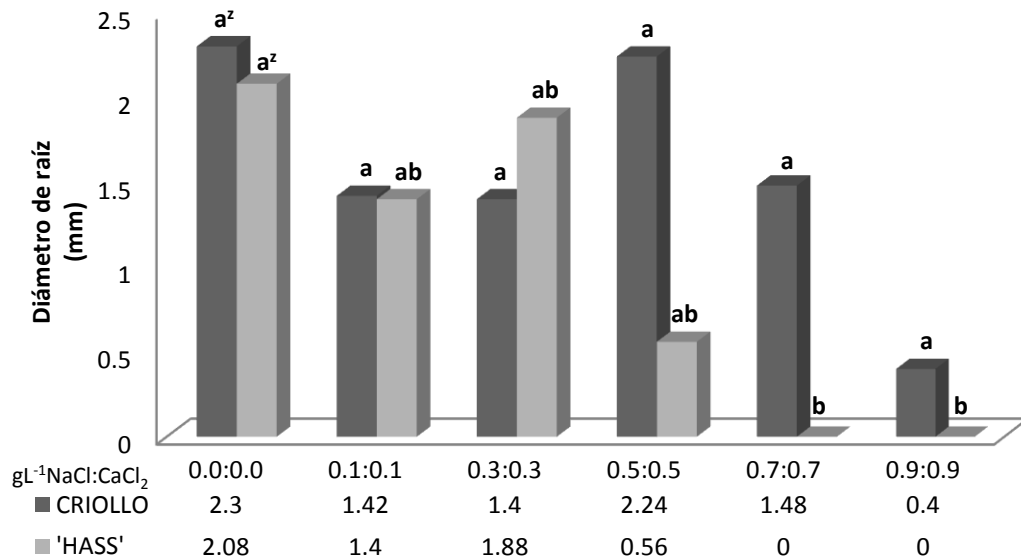


Figura 28. Diámetro de raíz de plántulas de aguacate criollo y ‘Hass’ obtenidas de ejes embrionarios a los 65 días de cultivo *in vitro* en diferentes concentraciones de NaCl:CaCl₂ (gL⁻¹). ²Promedios con la misma letra son iguales estadísticamente según la prueba de Tukey (P≤0.05).

Diámetro de tallo. En ‘Hass’ fue diferente el efecto de los tratamientos en el diámetro de tallo. En el testigo de los dos materiales, el diámetro de tallo fue 2.4 mm. En criollo, el tallo fue ligeramente más grueso en 0.3:0.3 gL⁻¹ de NaCl:CaCl₂ con respecto al testigo (Figura 29); en el resto de las concentraciones no se observó una tendencia. En ‘Hass’, el diámetro de tallo fue significativamente más afectado que en criollo por la adición de NaCl:CaCl₂; pues entre las concentraciones 0.1:0.1 a 0.5:0.5 gL⁻¹ de NaCl:CaCl₂, el diámetro se redujo cerca del 50 % con respecto a criollo. Además en ‘Hass’, el diámetro de tallo se redujo significativamente en casi todas las concentraciones de sales probadas en comparación con la no aplicación (testigo). Este resultado posiblemente esté asociados con el déficit hídrico causado por un incremento del potencial osmótico en el medio ocasionado por la presencia de NaCl:CaCl₂,

provocando que las raíces no extrajeran agua del medio limitando con ello su crecimiento (Song *et al.*, 2006). De igual forma se observó, que en las plántulas de criollo cultivadas en NaCl:CaCl₂, se supone que el Ca ejerció un efecto más significativo en los vástagos que en las raíces, al encontrar que en promedio, el tallo creció más que la raíz. En promedio, en criollo se cuantificó una proporción en la longitud tallo:raíz 1.4:1 y el diámetro tallo:raíz 1.22:1. En este mismo sentido, 'Hass' obtuvo una proporción 1.22:1 y 1:1.04 respectivamente. En relación a la comparación criollo:'Hass', la longitud de tallo fue 1.5:1, la longitud de raíz 1.22:1, el diámetro de tallo 1.66:1 y el diámetro de raíz 1.32:1. En base a estas cualidades y a los resultados ya discutidos, criollo puede ser más tolerante a este tipo de sales y 'Hass' más sensible en cada etapa de desarrollo.

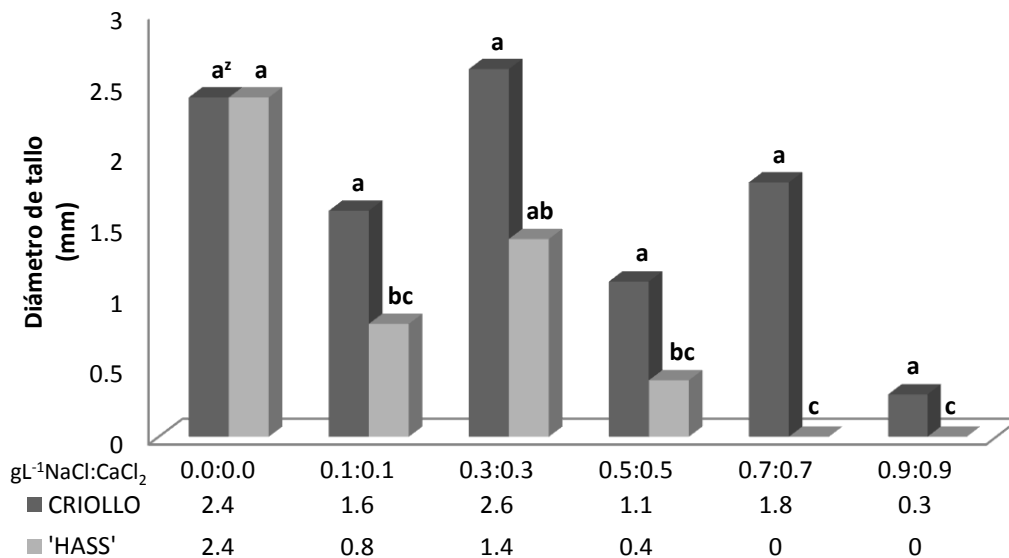


Figura 29. Diámetro de tallo en plántulas de aguacate criollo y 'Hass' obtenidas de ejes embrionarios a los 65 días de cultivo *in vitro* en diferentes concentraciones de NaCl:CaCl₂ (g^L⁻¹). ²Promedios con la misma letra son iguales estadísticamente según la prueba de Tukey (P≤0.05)

Número de hojas. Aún cuando en los dos materiales de aguacate, el efecto de los tratamientos fue no significativo en el número de hojas, numéricamente las diferencias existieron (Figura 30). En el testigo y en la concentración 0.1:0.1 g^L⁻¹ de NaCl:CaCl₂, criollo y 'Hass' formaron el mismo número de hojas; aunque, con 0.1:0.1 g^L⁻¹ de NaCl:CaCl₂ en menor número que el testigo. En el resto de las concentraciones de

NaCl:CaCl₂, criollo tuvo la capacidad de formar más hojas que 'Hass'. En criollo, la concentración 0.3:0.3 gL⁻¹ de NaCl:CaCl₂ sobresalió al formar el mismo número de hojas que el testigo. La formación y el número de hojas por rama es un factor de importancia, debido a que compone el área foliar de la planta y, esta, además de ser disminuida por salinidad, puede afectar la absorción de agua y nutrientes lo que conlleva a limitar el crecimiento y productividad en aguacate (Musyimi *et al.*, 2007). La proporción alta de Na:Ca puede traer como consecuencia una absorción y transporte limitadas tanto de agua como de Ca al vástago y un síntoma por deficiencia de Ca puede estar asociada a la inhibición del crecimiento foliar, especialmente en materiales sensibles al estrés por sales (Rengel, 1992).

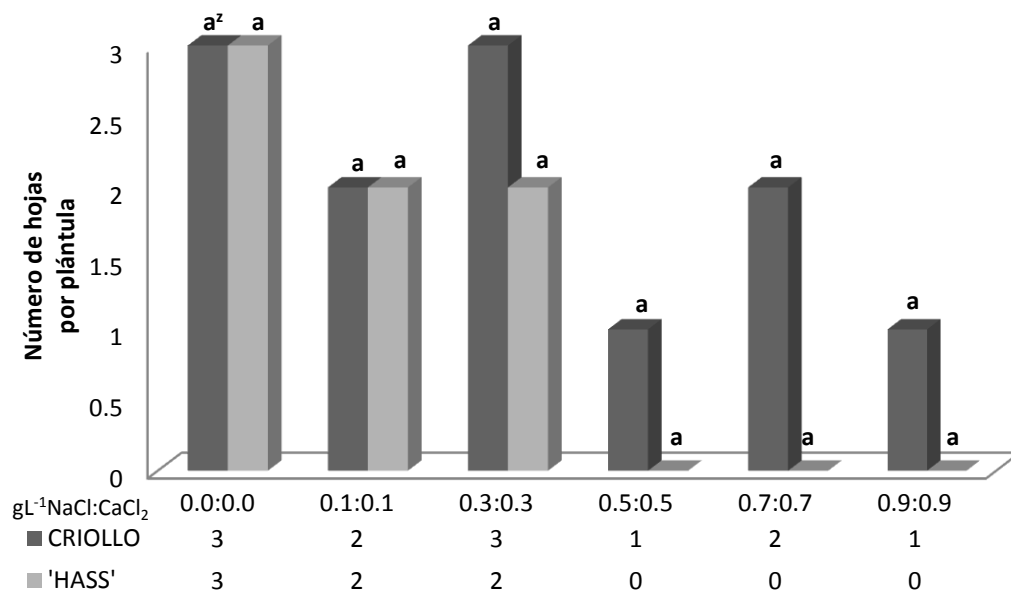


Figura 30. Número de hojas por plántula de aguacate criollo y 'Hass' obtenidos de ejes embrionarios a los 65 días de cultivo *in vitro* en diferentes concentraciones de NaCl:CaCl₂ (gL⁻¹). ²Promedios con la misma letra son iguales estadísticamente según la prueba de Tukey (P≤0.05).

Supervivencia. La supervivencia de criollo y 'Hass' varió entre las concentraciones de NaCl:CaCl₂. Del total de ejes embrionarios de aguacate establecidos, en criollo, la supervivencia fue 20 % mayor que 'Hass' (Cuadro 8). La supervivencia cuantificada en la respuesta de los ejes embrionarios con o sin crecimiento pero que permanecieron vivos, como: plántulas completas (Figura 11F), ejes embrionarios crecidos en volumen (Figura 11C), ejes embrionarios sólo germinados (Figura 11H) y brotes sin raíz

(Figura11G). En los dos materiales de aguacate, la supervivencia fue mayor en estado de plántulas completas, no obstante, en criollo sobrevivieron 23 % más plántulas que en 'Hass'. Uno de los efectos adversos ocasionado por NaCl:CaCl₂, fue la obtención limitada de plántulas completas pero que en cierta forma los ejes embrionarios se observaron vivos. En promedio en 'Hass', la obtención de plántulas se redujo debido a que el 27 % de los ejes embrionarios mostraron un crecimiento únicamente en volumen con tonalidad verde, específicamente con 0.7:0.7 y 0.9:0.9 gL⁻¹ de NaCl:CaCl₂ y el 3 % sólo germinaron, es decir no emitieron plúmula. En criollo, la obtención de plántulas disminuyó porque se formaron ejes embrionarios crecidos en volumen y brotes sin raíz en igual proporción (13 %). Es posible que las concentraciones excesivas de Na y Cl limitaron el crecimiento y supervivencia de las plántulas, sobretodo de 'Hass' y, el suplemento de Ca al medio mitigó los síntomas ocasionados por el estrés salino en las plántulas de ambos materiales, que lograron crecer y sobrevivir (Maathuis y Amtman, 1999; Jaleel *et al.*, 2007).

Cuadro 8. Respuesta de crecimiento y porcentaje de supervivencia de aguacate criollo y 'Hass' cultivado *in vitro* en diferentes concentraciones de NaCl:CaCl₂.

| Trat. | gL ⁻¹ NaCl:CaCl ₂ | Supervivencia (%) | | Plántulas (%) | | Ejes embrionarios crecidos en volumen (%) | | Brotes sin raíz (%) | | Raíz sin plúmula (%) | |
|---------------------|--|-------------------|-------|---------------|-------|---|------|---------------------|------|----------------------|------|
| | | Criollo | Hass | Criollo | Hass | Criollo | Hass | Criollo | Hass | Criollo | Hass |
| 1 | 0.0:0.0 | 100 a | 100 a | 80 b | 100 a | 0 c | 0 c | 20 b | 0 c | 0 c | 0 c |
| 2 | 0.1:0.1 | 80 b | 40 d | 80 b | 40 d | 0 c | 0 c | 0 c | 0 c | 0 c | 0 c |
| 3 | 0.3:0.3 | 100 a | 100 a | 60 c | 80 b | 0 c | 0 c | 40 a | 20 b | 20 b | 0 c |
| 4 | 0.5:0.5 | 100 a | 60 c | 80 b | 20 e | 0 c | 40 b | 20 b | 0 c | 0 c | 0 c |
| 5 | 0.7:0.7 | 100 a | 40 d | 60 c | 0 f | 40 b | 40 b | 0 c | 0 c | 0 c | 0 c |
| 6 | 0.9:0.9 | 60 c | 80 b | 20 e | 0 f | 40 b | 80 a | 0 c | 0 c | 0 c | 0 c |
| Promedio cultivares | | 90 | 70 | 63 | 40 | 13 | 27 | 13 | 3 | 3 | 3 |
| Promedio general | | 80 | | 52 | | 20 | | 7 | | 2 | |

²Promedios con la misma letra dentro de cada columna son iguales según la prueba de Tukey (P≤0.05).

En este estudio, la adición de NaCl:CaCl₂ afectó negativamente la supervivencia de las plántulas de criollo y 'Hass'. Por ejemplo en 'Hass', la deshidratación de las plántulas se presentó en mayor proporción y en menor la oxidación de plántulas (Cuadro 9). En criollo, fue frecuente la oxidación de plántulas con 0.1:0.1 y 0.9:0.9 gL⁻¹ de NaCl:CaCl₂ pero nunca se presentó deshidratación. De acuerdo con Hasegawa *et al.* (2000), la salinidad ocasiona efectos hiperiónicos e hiperosmóticos en las plantas, entre los que destacan la desorganización de las membranas celulares, incrementos en los

niveles de las especies reactivas al oxígeno (ROS) y toxicidad metabólica. Estos investigadores consideran que los daños resultantes por la salinidad están asociados con la deshidratación del protoplasma celular. La salida de agua del citoplasma provoca un aumento de solutos y una reducción del volumen del protoplasma con serias consecuencias estructurales y metabólicas. La integridad de la membrana es una estructura afectada por la deshidratación y toxicidad de los solutos que ocasiona alteraciones en el metabolismo.

Cuadro 9. Porcentaje de plántulas deshidratadas y oxidadas de aguacate criollo y 'Hass' cultivadas *in vitro* en diferentes concentraciones de NaCl:CaCl₂ (gL⁻¹).

| Tratamiento | gL ⁻¹ NaCl:CaCl ₂ | Plántulas deshidratadas (%) | | Plántulas oxidadas (%) | |
|---------------------|--|-----------------------------|--------|------------------------|--------|
| | | Criollo | 'Hass' | Criollo | 'Hass' |
| 1 | 0.0:0.0 | 0 d ² | 0 d | 0 c | 0 c |
| 2 | 0.1:0.1 | 0 d | 60 a | 20 b | 0 c |
| 3 | 0.3:0.3 | 0 d | 0 d | 0 c | 0 c |
| 4 | 0.5:0.5 | 0 d | 40 b | 0 c | 0 c |
| 5 | 0.7:0.7 | 0 d | 20 c | 0 c | 40 a |
| 6 | 0.9:0.9 | 0 d | 20 c | 40 a | 0 c |
| Promedio cultivares | | 0 d | 23 | 10 | 7 |
| Promedio general | | 12 | | 8 | |

²Promedios con la misma letra dentro de cada columna son iguales según la prueba de Tukey (P≤0.05).

Fase III. Evaluación de parámetros de tolerancia a salinidad en aguacate en cultivo *in vitro*

Parámetros de crecimiento

El crecimiento de las plantas medido con base en la producción de materia fresca y seca de vástago y raíz fue afectado significativamente por los tratamientos (Cuadro 8A). Los resultados revelaron que en las plántulas tratadas con NaCl y CaCl₂, la materia fresca y seca de vástago y raíz decrecieron; con NaCl:CaCl₂, la producción tanto de materia fresca y seca se incrementó; la velocidad de pérdida o ganancia de materia fresca y seca fue inversa o directamente proporcional a la concentración de la

sal (Figuras 31 y 32). Aún cuando se ha manifestado que el aguacate es sensible a la salinidad (Bernstein *et al.*, 2004; Mickelbart *et al.*, 2007), en este trabajo se observó cierto nivel de tolerancia; debido a que en raíz y vástago, los tratamientos salinos fueron iguales estadísticamente al testigo (Figura 31 y 32)).

Materia fresca

Los resultados indican que aunque la salinidad afectó las plántulas de aguacate, el vástago produjo más materia fresca que la raíz (Figura 31). En el testigo de vástago y raíz, a pesar de que la materia fresca fue igual estadísticamente a los tratamientos salinos, en el testigo de vástago, la materia fresca producida con 0.1 gL^{-1} de NaCl, 0.1 gL^{-1} de CaCl_2 y $0.3:0.3 \text{ gL}^{-1}$ de NaCl: CaCl_2 , lo sobrepasaron aproximadamente 11 %, 36 % y 8 %, respectivamente; en la raíz, la producción de materia fresca incrementó 21 % con 0.1 gL^{-1} de NaCl con respecto al testigo. El mayor incremento de materia fresca se obtuvo con la concentración 0.1 gL^{-1} de CaCl_2 y para el caso de la raíz, el mismo resultado se observó en el tratamiento 0.1 gL^{-1} de NaCl y la máxima reducción de materia seca en ambas partes de las plántulas fue obtenida con 0.3 gL^{-1} de CaCl_2 . En vástago, la materia fresca disminuyó a medida que la concentración, de NaCl y con CaCl_2 , aumentó. Así se tiene que con la presencia de NaCl, se redujo 28 % y aproximadamente, también disminuyó 43 % con CaCl_2 ; con NaCl: CaCl_2 la materia fresca se incrementó cerca de 34 % conforme la concentración aumentó. Igualmente en raíz, la materia fresca bajó 17 y 35 % con NaCl y con CaCl_2 , respectivamente y, con NaCl: CaCl_2 , subió 52 %. El crecimiento vegetal se ve afectado positiva o negativamente como consecuencia del estrés osmótico, que depende de la capacidad de las plantas para incorporar las sales a su metabolismo y del tipo de sal que causa el estrés (Caseiro-Posada y García, 2005). Es posible que este material de aguacate tenga la capacidad de acumular mayor cantidad de materia fresca como se demostró en este trabajo, aún en condiciones de estrés salino. Una posible explicación pudiera ser que la raíz tuvo la capacidad de activar algún mecanismo de tolerancia que permitió un adecuado estado hídrico interno para evitar o minimizar el daño que Na y/o Cl provocan en las plantas de aguacate y de transportar los elementos esenciales a la parte aérea

de la plántula causando un crecimiento mayor de vástago tal y como lo afirman Singh y Chatrath (2001).

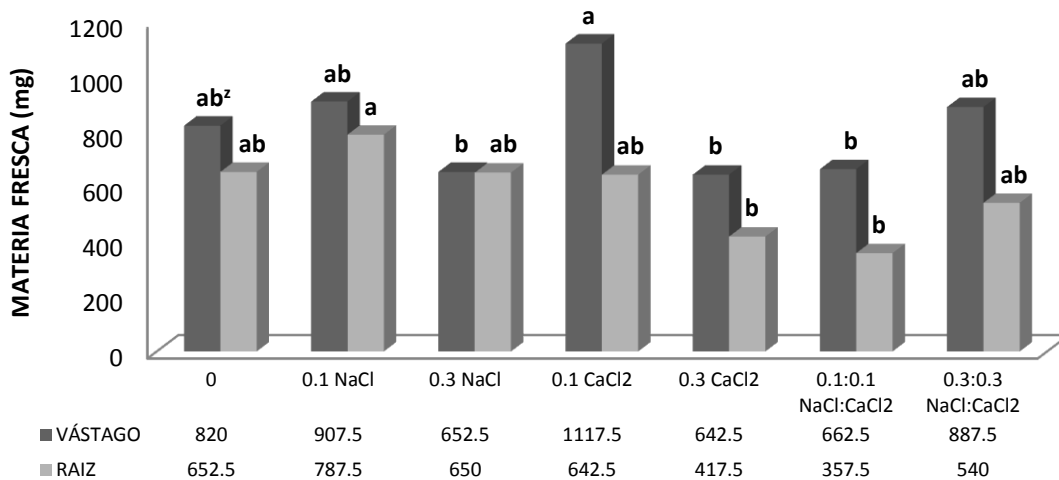


Figura 31. Producción de materia fresca de raíz y vástago de aguacate criollo crecido *in vitro* en diferentes tipos y concentraciones de sales (gL^{-1}).

²Promedios con la misma letra son iguales estadísticamente según la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$).

Materia seca

La concentración creciente de NaCl y CaCl₂ en el medio de cultivo, indujo una reducción en la materia seca de vástago y raíz; a pesar de ello, en el vástago se obtuvo mayor cantidad de materia seca (Figura 32). Pese a que en el testigo de vástago y raíz, la materia seca fue igual estadísticamente a los tratamientos salinos, numéricamente hubo diferencias. En algunos tratamientos salinos, la materia seca fue superior y menor en otros, con relación al testigo. Estadísticamente, la materia seca de vástago destacó con 0.1 gL^{-1} de CaCl₂ y con 0.3:0.3 gL^{-1} de NaCl:CaCl₂; pero, 0.1 gL^{-1} de CaCl₂ tuvo 18 % más materia seca que 0.3:0.3 gL^{-1} de NaCl:CaCl₂; disminución derivada posiblemente por la presencia adicional de Na y Cl que en cierta forma limitaron la funcionalidad de Ca. En raíz, la cantidad de materia seca fue sobresaliente con 0.3:0.3 gL^{-1} de NaCl:CaCl₂. Cuando la concentración de NaCl y CaCl₂ incrementó de 0.1 a 0.3 gL^{-1} , la materia seca de vástago y raíz fue afectada negativamente y con NaCl:CaCl₂ fue afectada positivamente; estos resultados u observaciones permitieron conocer que en vástago, la materia seca se redujo 11 % con NaCl y 24 % con CaCl₂ e incrementó 41 %

con NaCl:CaCl₂. En raíz, la materia seca disminuyó 14 % con NaCl y 16 % con CaCl₂; con NaCl:CaCl₂, la materia seca aumentó más del doble. Aún cuando en vástago, numéricamente la cantidad de materia seca fue mayor con CaCl₂, esta se redujo más con CaCl₂ que con NaCl a medida que la concentración aumentó; en raíz, la materia seca fue ligeramente menor con CaCl₂ que con NaCl; no obstante, esa diferencia no resultó significativa estadísticamente. El aumento de la relación NaCl:CaCl₂ en el medio de cultivo, incrementa más la acumulación de materia seca en raíz que en vástago (Figura 32). Se ha reportado que la salinidad reduce el crecimiento de los órganos de la planta; sin embargo, la afectación es distinta y puede depender de la especie, el cultivar y tipo de sal (Casierra-Posada y García, 2005). Se considera que el incremento de materia seca de la parte aérea de las plantas expuestas a la salinidad, es el resultado de la acumulación de solutos compatibles, necesarios para el ajuste osmótico, como una respuesta adaptativa de las células. La reducción del sistema radicular puede ser una consecuencia de las alteraciones fisiológicas desencadenadas por el estrés salino y la acumulación de Na y Cl en sus tejidos (Casierra-Posada y Rodríguez, 2006). Investigaciones realizadas en *Cucumis sativus* L. (Akinci y Simsek, 2004), *Fragaria* sp (Caseirra-Posada y García, 2005), *Linum usitatissimum* L. (Khan *et al.*, 2007) indican que la concentración creciente de sales afecta más el crecimiento de la parte aérea que de las raíces; sin embargo, en este trabajo se detectó que las raíces de aguacate criollo pueden ser más sensibles a la salinidad que los vástagos, al observarse disminuido su crecimiento (Figura 32). Estas observaciones concuerdan con las obtenidas por Bernstein *et al.* (2004) con esta especie.

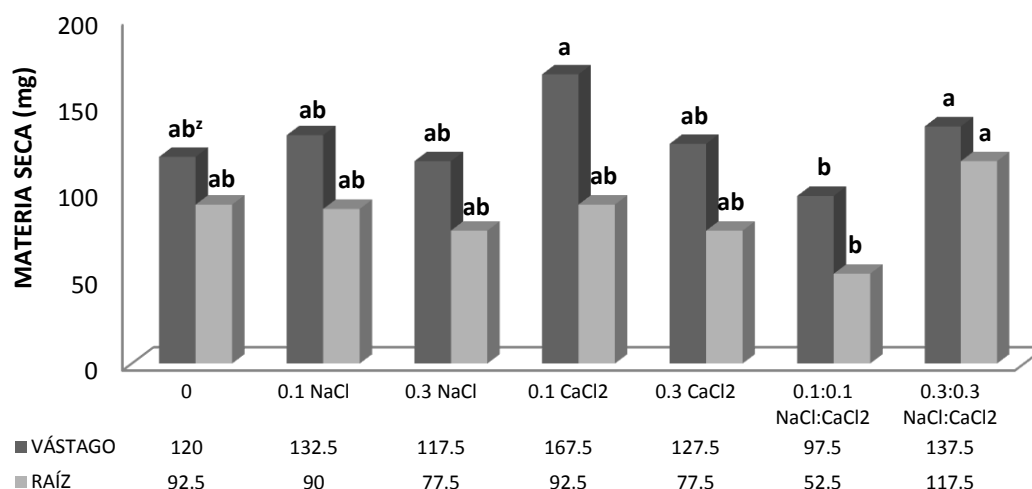


Figura 32. Producción de materia seca de raíz y vástago de aguacate criollo crecido *in vitro* en diferentes tipos y concentraciones de sales (gL^{-1}).

^zPromedios con la misma letra son iguales estadísticamente según la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$).

Parámetros fisiológicos y bioquímicos

Contenido de agua

En las plántulas de aguacate el agua comprendió de 75 % a 89 % la biomasa de los tejidos de la raíz y de 80 % a 85 % los de vástago (Figura 33). El estado hídrico de la planta puede fundarse mediante la estimación del contenido de agua (Chaman, 2007). Estado que se modifica en situaciones salinas y que puede afectar adversamente el crecimiento de las plantas (Buchanan *et al.*, 2000). En este estudio se encontró que en el vástago, el estado hídrico se modificó significativamente entre tratamientos (Cuadro 8A); en raíz, el contenido de agua fue inversamente proporcional a la concentración de las sales, pero la reducción no fue suficiente para que se presentara diferencia significativa entre los tratamientos (Figura 33); es posible que la raíz respondiera mejor que el vástago al déficit de agua ocasionado por las sales. El contenido de agua en el vástago del testigo, fue estadísticamente igual a la mayoría de los tratamientos salinos, excepto con 0.3 gL^{-1} de CaCl_2 . El estado hídrico de vástago decreció cuando incrementó la concentración de NaCl, CaCl_2 y NaCl:CaCl₂; de acuerdo

con Chaman (2007), la variación en el contenido de agua que puede ser suficiente para que los tejidos pierdan turgencia cuando no se tiene la eficiencia del uso del agua.

En la raíz, aún cuando no hubo diferencias entre tratamientos en el contenido de agua (Cuadro 8A), el testigo fue rebasado numéricamente por los dos tratamientos con NaCl y con 0.1 gL⁻¹ de CaCl₂, pero el contenido de agua fue mayor en el testigo en comparación al conseguido tanto con 0.3 gL⁻¹ de CaCl₂ como al obtenido en los tratamientos con NaCl:CaCl₂ (Figura 33). El efecto osmótico en la planta está relacionado con la concentración total de sales presentes en la solución del suelo, independientemente de la especie cultivada. Los potenciales osmótico e hídrico disminuyen, al aumentar la concentración de sales en la solución del sustrato, lo que representa serias complicaciones para las raíces en la absorción de agua. En este estudio, el contenido de agua fue mayor en raíz que en vástago (excepto en la relación más alta de NaCl:CaCl₂; Figura 33); por ello, es posible que las raíces de este material de aguacate consiguieran mantener un potencial hídrico más negativo que el del medio externo para asegurar la absorción y retención de agua (Bárceñas-Abogado *et al.*, 2002); lo que posiblemente contribuyó a alcanzar un crecimiento mejor de vástago.

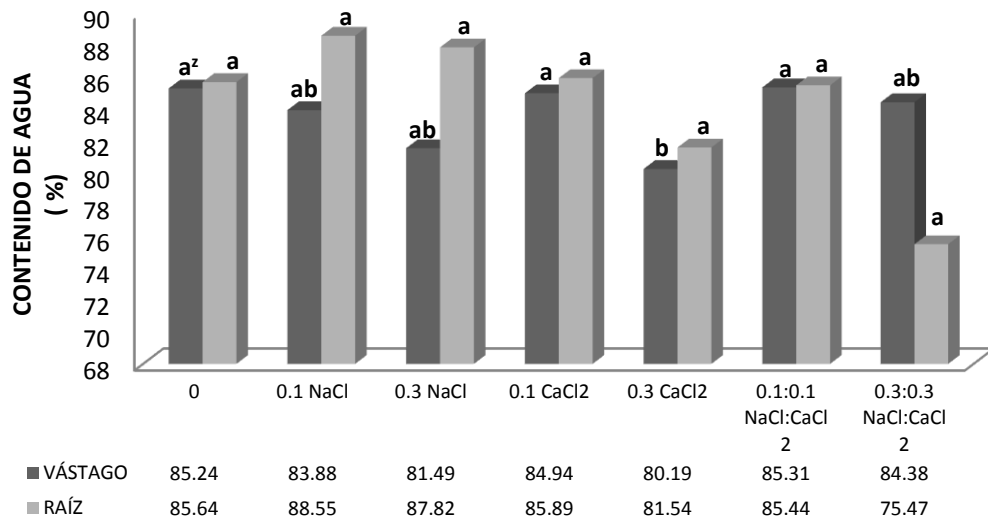


Figura 33. Porcentaje de agua en raíz y vástago de aguacate criollo crecido *in vitro* en diferentes tipos y concentraciones de sales (gL⁻¹).

²Promedios con la misma letra son iguales estadísticamente según la prueba de Tukey (P≤0.05).

Potencial hídrico

El potencial hídrico manifestó diferencia significativa entre tratamientos en vástago y no significativa en raíz (Cuadro 8A); de acuerdo con Silva-Robledo *et al.* (2007), cambios en el potencial hídrico de la planta son una respuesta a los cambios extracelulares del potencial de solutos. En raíz, el déficit hídrico fue mayor que en vástago, en casi todas las combinaciones de sales, excepto con 0.1 gL^{-1} de CaCl_2 (Figura 34), lo que sugiere que el vástago tuvo mayor capacidad de ajuste osmótico en respuesta a déficit hídrico o a que activó un mecanismo para ser más eficiente en el uso del agua (Medrano *et al.*, 2007), lo cual le permitió reducir el potencial osmótico, posiblemente por la acumulación de solutos compatibles en sus tejidos y conseguir un mejor crecimiento. Mientras que en vástago, el potencial hídrico decreció al máximo en 0.1 gL^{-1} de CaCl_2 , en raíz fue con 0.1 gL^{-1} de NaCl siguiéndole en orden de reducción, el testigo. En raíz y vástago, el potencial hídrico sobresalió en los tratamientos con 0.3 y 0.1 gL^{-1} de CaCl_2 respectivamente; posiblemente porque la función del Ca es mantener una relación alta K/Na y de proteger la absorción y evitar la pérdida de K; el cual es el principal regulador del estado hídrico de la célula (Mathews y Van Holde, 1999). En promedio, el potencial hídrico disminuyó más con NaCl en los órganos considerados, pero la raíz fue la más estresada por el déficit hídrico ocasionado por esta sal. Es posible que en aguacate, la situación hídrica en la raíz se agravó aún más, debido a que el sistema radical es muy superficial y la ramificación es poca, lo que ocasionó una reducción en la capacidad de absorción de agua (Whiley *et al.*, 2002) y en condiciones de estrés salino, uno de los efectos más evidentes es la limitada disponibilidad de agua en el medio. Sin embargo, se puede considerar que la raíz puede tener un papel importante en la tolerancia a la salinidad debido a que logró crecer y sobrevivir en estas condiciones, absorbió y distribuyó las sustancias elementales para el crecimiento del sistema aéreo y evitó que este fuera afectado por las sales tóxicas encontradas en el medio.

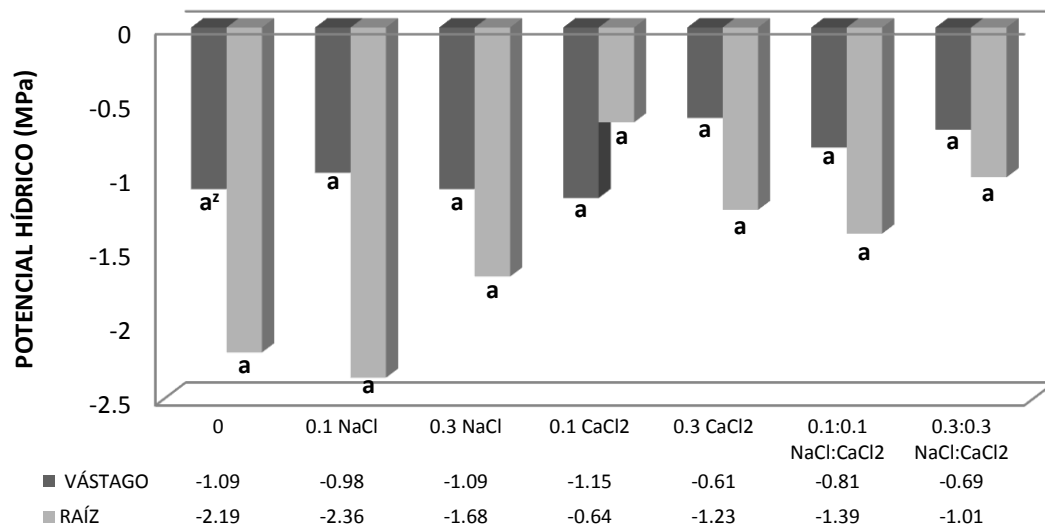


Figura 34. Potencial hídrico en raíz y vástago de aguacate criollo crecido *in vitro* en diferentes tipos y concentraciones de sales (gL^{-1}).

²Promedios con la misma letra son iguales estadísticamente según la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$).

Potencial osmótico

El NaCl, CaCl₂ y NaCl:CaCl₂ redujeron significativamente el potencial osmótico del medio de cultivo y vástago; en raíz, el efecto no fue significativo (Cuadro 8A). Independientemente del tratamiento, el potencial osmótico mostró ser menos negativo en el medio de cultivo en comparación al encontrado en raíz y vástago (Figura 35). En los órganos considerados, el efecto fue ligeramente más pronunciado con CaCl₂ que con NaCl y en el medio de cultivo se observó con NaCl. Pese a que el potencial osmótico fue más negativo en vástago que en raíz, ambos órganos fueron capaces de reducir su potencial osmótico, lo que posiblemente les permitió mantener potenciales casi similares al testigo. Lo que sugiere que las plántulas de aguacate al ser sometidas a estrés salino pasaron por un proceso de adaptación y reorganización fisiológica que incluso igualaron o superaron el crecimiento de las plántulas no sometidas a este estrés (testigo. Figuras 31 y 32). En la raíz, el potencial osmótico fue menos negativo que en vástago, lo que pudo ser debido a que algunos solutos del medio fueron absorbidos y/o metabolizados (Heyser y Nabors, 1981) y/o retenidos entre sus tejidos para evitar su distribución y acumulación en la parte aérea de las plántulas. Es posible que en la raíz, la salinidad no provocara un choque osmótico drástico, lo que permitió el ajuste

osmótico, aunque en menor grado que en vástago, que tuvo un potencial osmótico similar al testigo. Koyro (2006) explica que un potencial osmótico menos negativo puede deberse a que las plantas incluyen en sus tejidos los solutos principales como K (en todos los órganos), Ca (principalmente en las hojas), Mg (todos los órganos), NO₃ (principalmente en las hojas), Na (en todos los órganos), Cl (todos los órganos), sorbitol (principalmente en la raíz) y sustancias no identificadas. Cuando la planta es capaz de soportar concentraciones altas de sales, en la zona radical, puede ser un indicador de tolerancia útil para seleccionar materiales tolerantes (Shannon, 1979; Ashraf, 2004; Maathuis, 2006).

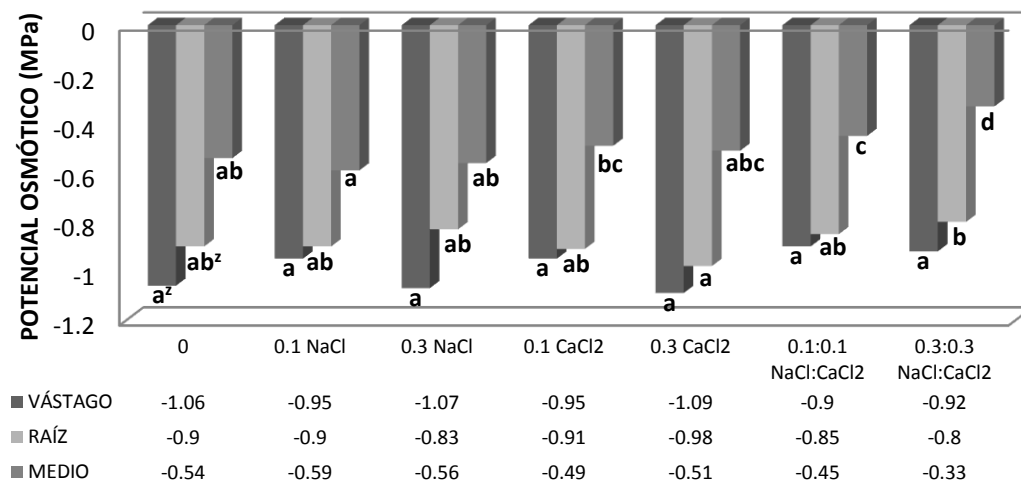


Figura 35. Potencial osmótico en raíz y vástago de aguacate criollo crecido *in vitro* en diferentes tipos y concentraciones de sales (gL⁻¹).

^zPromedios con la misma letra son iguales estadísticamente según la prueba de Tukey (P≤0.05)

Contenido de prolina

En aguacate criollo se encontró que, la raíz y el vástago tuvieron la capacidad de sintetizar prolina en condiciones salinas, posiblemente como una respuesta de adaptación al estrés ocasionado por este factor (Hasegawa, *et al.*, 2000; Chaman, 2007). A pesar de que la acumulación de prolina varió significativamente entre tratamientos y entre los órganos considerados, este aminoácido se sintetizó más en vástago que en raíz (Figura 36); lo que puede ser un indicador de que la prolina tuvo mayor actividad en el sistema aéreo que en el sistema radicular durante el estrés y

quizás por ello, en el vástago, el potencial osmótico fue más disminuido que en la raíz (Figura 35). En vástago se identificó que, la prolina se acumuló más en la concentración máxima de NaCl:CaCl₂. Esta acumulación elevada de prolina podría ser ocasionada por un efecto tendiente a deshidratación, debido a la excesiva acumulación de Na y/o Cl en el apoplasto celular (Flowers *et al.*, 1991), o bien, a un efecto directo de toxicidad por la retención de estos iones en sus tejidos. En raíz, el contenido de prolina fue mayor con 0.3 gL⁻¹ de CaCl₂, posiblemente debido a la participación que tiene el Ca en la síntesis de este tipo de solutos compatibles, en respuesta al estrés (Rengel, 1992). Una mayor acumulación de prolina se ha relacionado con una mayor tolerancia al estrés por sales; sin embargo, García y Medina (2003) sugieren que la respuesta en cuanto a la acumulación de prolina es compleja y en algunos casos, más que una causa de tolerancia a sales podría ser un sensor del grado de estrés al que está sometida la planta. Razón que puede fundamentar, la tendencia que mostró la acumulación significativa de prolina en tallo y raíz entre tratamientos (Cuadro 8A). Por su parte, Prado (1997) considera, que la acumulación de prolina en condiciones de estrés, es un mecanismo de tolerancia que ha llevado a la expresión de ajuste osmótico, con el único objetivo de aumentar la retención hídrica; empero, se han encontrado otras funciones, como: la creación de una reserva de N en la etapa de recuperación del estrés y la fuente principal de energía para tolerar la salinidad durante el crecimiento y sobrevivencia (Requelme *et al.*, 1997; Rhan *et al.*, 2007).

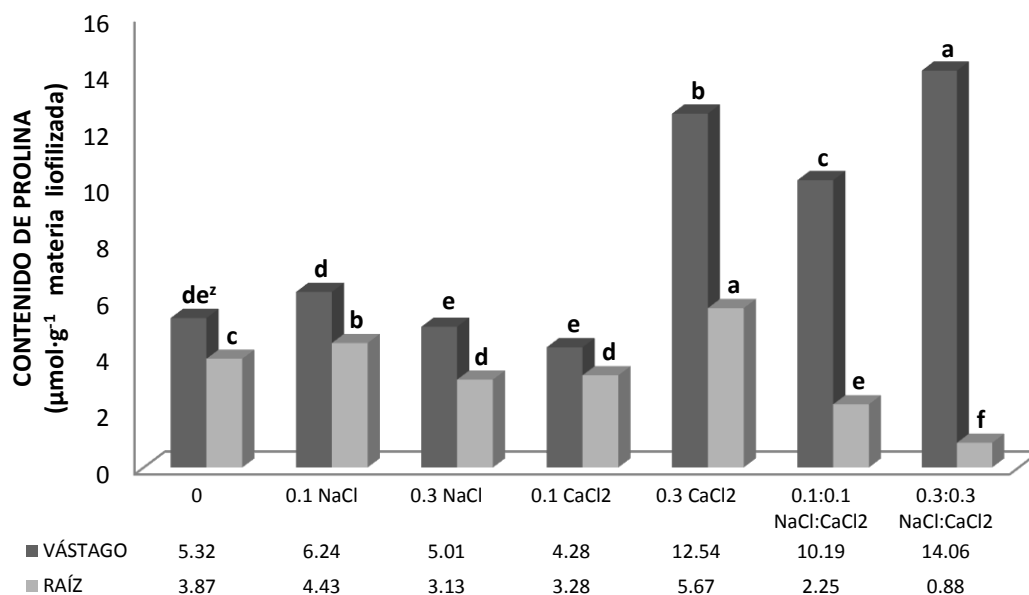


Figura 36. Contenido de prolina ($\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ materia liofilizada) en raíz y vástago de aguacate criollo crecido *in vitro* en diferentes tipos y concentraciones de sales ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$).

^zPromedios con la misma letra son iguales estadísticamente según la prueba de Tukey ($P\leq 0.05$).

Contenido de Ca. Independientemente de la concentración de sales en el medio, las plántulas de aguacate mostraron una acumulación significativa de Ca en vástago y raíz (Cuadro 8A), siendo en vástago más alta que en raíz (Figura 37). Lo que sugiere, que la presencia de Na y el Cl en el medio no afectaron la adquisición y el transporte de Ca de la raíz a los vástagos, como sucede en otras especies (Maathuis, 2006). En el testigo de raíz, la acumulación de Ca fue superada únicamente con $0.3:0.3 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de NaCl:CaCl₂; en vástago solamente con $0.1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de NaCl; aunque, en estos tratamientos la acumulación de Ca fue menor numéricamente que en el testigo porque estadísticamente fueron iguales. Los resultados indican que las plántulas mostraron la capacidad de retener Ca, lo que puede ser un indicador de su tolerancia a la salinidad; debido a que cantidades razonables de Ca son necesarias para mantener la integridad y funcionalidad de las membranas celulares (Ashraf, 2004). Pese a que en la raíz y el vástago, la acumulación de Ca se incrementó a medida que aumentó la concentración de cada sal, los niveles de Ca fueron mayores en los tratamientos con NaCl:CaCl₂. Lo que indica que es posible que la presencia extracelular de Na pudo ser capaz de activar el flujo de Ca en el citosol, atravesar la membrana plasmática y del tonoplasto (Kiegle *et*

al., 2000) y de esta manera no afectar negativamente la relación de Ca en las plántulas (Maathuis, 2006). De acuerdo con Zyalalov (2004) y Chinnusamy *et al.* (2005), en condiciones de estrés, un incremento de Ca en el citosol de las células guarda, parece estar regulado por la acumulación de ABA, al activar un canal de entrada de Ca. A pesar de que los cambios en la concentración de Ca aún son confusos, una forma que el Na induce un incremento en los niveles de Ca podría ser detectada por la proteína calcineurina (CBL4) originalmente identificada como SOS3 (Zhu, 2002).

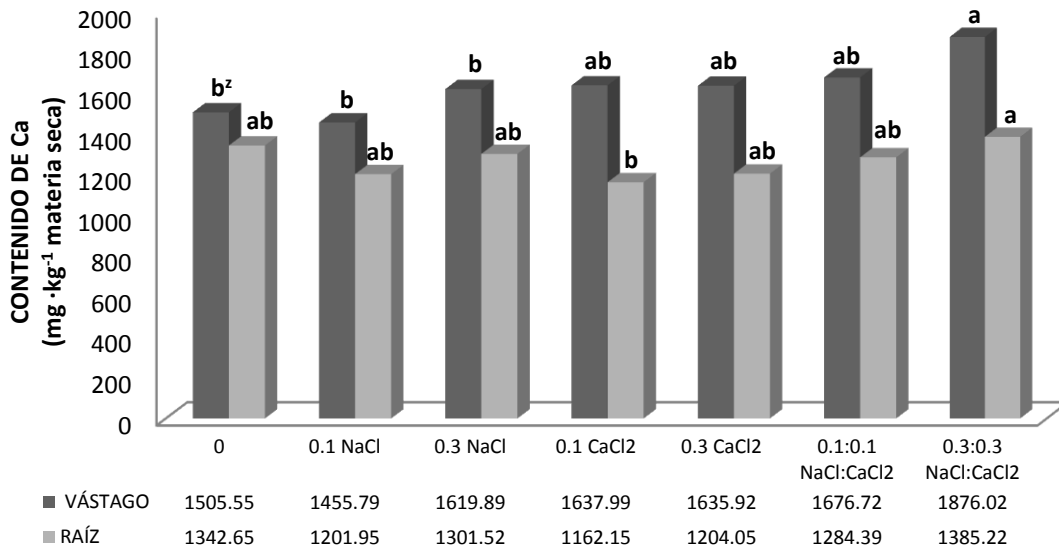


Figura 37. Contenido de calcio ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ materia seca) en raíz y vástago de aguacate criollo crecido *in vitro* en diferentes tipos y concentraciones de sales ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$).

²Promedios con la misma letra son iguales estadísticamente según la prueba de Tukey ($P\leq 0.05$)

Contenido de Na. Las plantas varían su habilidad para absorber y transportar Na al vástago (Shone *et al.*, 1969). En aguacate, la salinidad del medio influyó significativamente en la acumulación de Na en la raíz (Cuadro 8A); en vástago, la acumulación de Na no fue diferente entre tratamientos (Figura 38). Las plántulas mostraron niveles superiores de Na en la raíz que en la parte aérea. El hecho de que el Na se acumulara en mayor medida en la raíz que en vástago, es posible explicarlo en términos de que el sistema radicular del aguacate criollo lo secuestre o lo incluya en la

vacuola y limite su distribución al vástago, lo que puede ser interpretado como un mecanismo de tolerancia a la salinidad (Renault *et al.*, 2001; Netondo *et al.*, 2004a; Morales *et al.*, 2008). Encontrar Na en el testigo de raíz y vástago, pudo ser debido a que los ejes embrionarios lo atraparon entre sus tejidos durante el proceso de desinfestación con hipoclorito de sodio y del medio de cultivo desde su establecimiento hasta su crecimiento, ya que el Na es un componente tanto del medio como del reactivo empleado para ajustar el pH del mismo (NaOH). En vástago, aun cuando no hubo diferencias en la concentración de Na; el Na retenido en el testigo únicamente superó al encontrado en 0.1 gL^{-1} de CaCl_2 . Lo que permite suponer que en cierta forma la estabilidad de la membrana celular de la raíz conseguida por el Ca, limitó el paso de Na al vástago. En el testigo de raíz, la acumulación de Na fue rebasada solamente por los tratamientos con $\text{NaCl}:\text{CaCl}_2$. Con la adición de sales, tanto en raíz como en vástago, la concentración de Na incrementó a medida que aumentó la concentración de las sales en el medio. Subbarao *et al.* (2003) suponen que la tolerancia de las plantas a la presencia Na, es que ellas compartimentalizan el Na absorbido en la vacuola y lo utilizan como un osmolito inorgánico en lugar o junto con el K. En las dos partes de las plántulas consideradas, la menor concentración encontrada de Na fue en 0.1 gL^{-1} de CaCl_2 y la máxima acumulación observada fue con $0.3:0.3 \text{ gL}^{-1}$ de $\text{NaCl}:\text{CaCl}_2$. Según Subbarao *et al.* (2003), si las plantas tienen la capacidad de absorber Na, traslocarlo al vástago y secuestrarlo en sus vacuolas es posible que el Na puede cubrir las funciones del K o ser más efectivo en la prevención del estrés hídrico asociado a la salinidad (Morales *et al.*, 2008). Generalmente las especies que absorben Na y lo transportan al vástago son llamadas “natrofilicas” (Smith *et al.*, 1980); las que no son capaces de absorberlo fácilmente son denominadas “natrofóbicas” (Shone *et al.*, 1969) pero cuando lo adquieren usualmente lo retienen en la raíz con relativamente poca traslocación a los vástagos; aunque normalmente lo trasladan a la parte superior, cuando son expuestas a concentraciones altas ($\geq 100 \text{ mM}$) en la zona radical y cuando esto sucede el resultado principal es la reducción del crecimiento y/o muerte de las plantas debido a la toxicidad específica de Na (Cheeseman, 1988). En este sentido, pese a que en aguacate, el patrón de crecimiento mostró modificaciones entre los diferentes tipos y concentraciones de sales, se observó que tiene la capacidad de activar mecanismos de

tolerancia como el ajuste osmótico posiblemente por la acumulación de solutos (González *et al.*, 2003) u otras sustancias no identificadas como lo señala Koyro (2006), la inclusión de las sales en la vacuola y una mayor eficiencia del uso del agua que le permitieron tolerar estas condiciones.

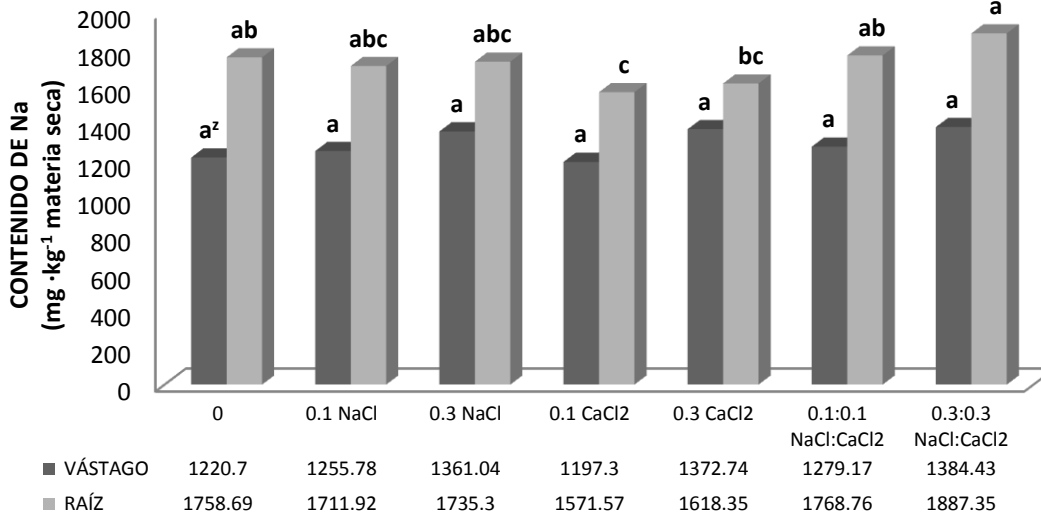


Figura 38. Contenido de sodio ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ materia seca) en raíz y vástago de aguacate criollo crecido *in vitro* en diferentes tipos y concentraciones de sales ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$).

²Promedios con la misma letra son iguales estadísticamente según la prueba de Tukey ($P\leq 0.05$)

Fase IV. Cambios anatómicos en la raíz inducidos por salinidad

Una característica común de las glicófitas, cuando son expuestas a condiciones salinas, es la reducción del crecimiento y la producción; la raíz, por ser la parte de la planta que está en contacto directo con el suelo, es la principalmente afectada a los cambios adversos en su ambiente de crecimiento. En especies tolerantes al estrés, numerosas investigaciones han mostrado que la salinidad promueve alteraciones en la morfología y en la estructura de la raíz como una reacción de adaptación que les permite un mejor crecimiento ante esas condiciones desfavorables (Ayala *et al.*, 1996;

Schreiber *et al.*, 1999; Degenhart y Gimmier, 2000; López-Pérez *et al.*, 2007). En este estudio, la estructura anatómica de las raíces sometidas a estrés salino de aguacate criollo y 'Hass' mostró claras diferencias entre tratamientos (Cuadros 10 y 11; Figuras 39 a 43).

Diámetro de raíz

En el caso del testigo de criollo, el diámetro de raíz fue superado por la mayoría de los tratamientos salinos, excepto por 0.1 gL^{-1} de CaCl_2 (Cuadro 10; Figuras 39, 40 y 41). La diferencia de superioridad que alcanzó el diámetro de raíz en el resto de las sales con respecto al testigo, osciló entre 7 % obtenido con $0.1:0.1 \text{ gL}^{-1}$ de $\text{NaCl}:\text{CaCl}_2$ y 26 % con 0.3 gL^{-1} de NaCl . El diámetro de raíz conseguido en el testigo sobrepasó con 19 % al alcanzado en 0.1 gL^{-1} de CaCl_2 (Cuadro 10). Con la presencia de sales, el diámetro de raíz aumentó directamente proporcional a la concentración de cada combinación de las sales. Por ejemplo, de 0.1 a 0.3 gL^{-1} de NaCl , el diámetro de raíz aumentó aproximadamente 5 %; algo similar se observó con CaCl_2 , la raíz se extendió 53 % y con $\text{NaCl}:\text{CaCl}_2$, el diámetro se incrementó 17 %. El diámetro de raíz, tanto a concentraciones bajas como a altas manifestó una tendencia $\text{NaCl} > \text{NaCl}:\text{CaCl}_2 > \text{CaCl}_2$. En resumen, el diámetro de la raíz fue mayor con NaCl con respecto al conseguido con CaCl_2 y $\text{NaCl}:\text{CaCl}_2$; además, el diámetro se incrementó a medida que la concentración de las sales aumentó (Figura 40). Con $\text{NaCl}:\text{CaCl}_2$, el diámetro de raíz expresó valores intermedios entre los obtenidos con NaCl y con CaCl_2 , Es posible que en aguacate criollo, la adición de NaCl al medio rápidamente pudiera estimular el crecimiento radical pero conforme se acumuló en los tejidos el crecimiento se detiene; debido posiblemente, al cambio repentino de las relaciones hídricas en la célula. En tanto que, con la adición de CaCl_2 la reducción del crecimiento es regulado por señales hormonales que vienen de la raíz, en las cuales el Ca tiene participación (Munns, 2000).

Cuadro 10. Diámetro total de raíz, grosor del cortex y diámetro de cilindro vascular de plántulas de aguacate criollo crecidas *in vitro* en condiciones salinas.

| Salinidad (gL ⁻¹) | Diámetro de raíz (mm) | Grosor del Cortex (mm) | Diámetro Cilindro Vascular (mm) |
|--------------------------------|-----------------------|------------------------|---------------------------------|
| Testigo | 1.44 | 0.360 | 0.680 |
| 0.1 NaCl | 1.74 | 0.300 | 1.140 |
| 0.3 NaCl | 1.82 | 0.580 | 0.660 |
| 0.1 CaCl ₂ | 1.16 | 0.150 | 0.860 |
| 0.3 CaCl ₂ | 1.78 | 0.300 | 1.100 |
| 0.1:0.1 NaCl:CaCl ₂ | 1.54 | 0.380 | 0.780 |
| 0.3:0.3 NaCl:CaCl ₂ | 1.80 | 0.340 | 1.120 |

En las raíces de 'Hass' se encontró que, en el testigo, el diámetro de la raíz fue menor con respecto al obtenido con la adición de sales (Cuadro 11; Figuras 42 y 43). Entre tratamientos, el diámetro de raíz mostró una tendencia CaCl₂>NaCl>NaCl:CaCl₂>Testigo; directriz que permitió identificar que, el diámetro de raíz fue 37 % mayor con CaCl₂, 25 % con NaCl y con NaCl:CaCl₂ fue 19 % superior que el alcanzado en el testigo. An *et al.* (2003), señalan que de acuerdo a la especie o variedad de una misma especie, el nivel de salinidad y la composición de la solución externa, el crecimiento radical puede ser estimulado, inhibido o no afectado. En los dos materiales de aguacate, el diámetro de raíz fue diferente con la adición de las sales; aunque, 'Hass' fue más afectado que criollo.

Cuadro 11. Diámetro total de raíz, grosor del cortex y diámetro de cilindro vascular de plántulas de aguacate 'Hass' crecidas *in vitro* en condiciones salinas.

| Salinidad (gL ⁻¹) | Diámetro total (mm) | Grosor del Cortex (mm) | Diámetro Cilindro Vascular (mm) |
|--------------------------------|---------------------|------------------------|---------------------------------|
| Testigo | 1.34 | 0.340 | 0.660 |
| 0.7 NaCl | 1.68 | 0.540 | 0.600 |
| 0.1 CaCl ₂ | 1.84 | 0.580 | 0.680 |
| 0.3:0.3 NaCl:CaCl ₂ | 1.60 | 0.500 | 0.600 |

Grosor del cortex

En el testigo de criollo, el grosor del cortex fue inferior al obtenido con 0.3 mgL^{-1} de NaCl y $0.1:0.1 \text{ gL}^{-1}$ de NaCl:CaCl₂, con 61 % y cerca de 6 %, respectivamente. En el resto de las sales, el grosor del cortex fue menor con respecto al testigo; la reducción fluctuó entre 6 % obtenida en $0.3:0.3 \text{ gL}^{-1}$ de NaCl:CaCl₂ y 58 % en 0.1 gL^{-1} de CaCl₂. El grosor del cortex fue directamente proporcional a la concentración de NaCl y CaCl₂ e inversamente proporcional con NaCl:CaCl₂. De esta manera, se determinó que conforme la concentración de las sales de NaCl se incrementaba, el grosor del cortex también hasta en un 93 %, con CaCl₂ aumentó el 100 % y con NaCl:CaCl₂ disminuyó un 11 %. En tanto que a concentraciones bajas, el grosor del cortex indicó una disposición NaCl:CaCl₂>NaCl>CaCl₂; a concentraciones altas la tendencia reveló NaCl>NaCl:CaCl₂>CaCl₂. El testigo de 'Hass', el grosor del cortex alcanzado lo sobrepasaron todos los tratamientos salinos (Cuadro 11). Por lo que, la tendencia fue CaCl₂>NaCl>NaCl:CaCl₂>Testigo. Con CaCl₂ el grosor del cortex fue 71 % mayor que el testigo, con NaCl, 59 % y con NaCl:CaCl₂ el 47 %. La participación del Ca en la respuesta de las plantas a la salinidad resulta esencial; sin embargo, en la actualidad se sabe que su papel es complejo, ya que actúa como intermediario en la cascada de señales que conducen a la transcripción de numerosos genes involucrado en la respuesta adaptativa (Marschner, 1995; Kiegle *et al.*, 2000).

Diámetro del cilindro vascular

En el caso del testigo de criollo, el diámetro del cilindro vascular únicamente superó con 3 % al obtenido en 0.3 gL^{-1} de NaCl. Con la adición de sales, el diámetro del cilindro vascular manifestó un desarrollo inversamente proporcional a la concentración con NaCl y directamente proporcional con CaCl₂ y NaCl:CaCl₂. Conforme la concentración de la sal aumentó, con NaCl, el diámetro del cilindro vascular disminuyó 42 %; con CaCl₂ incrementó 28 % y con NaCl:CaCl₂ fue aproximadamente de 44 %. El diámetro del cilindro vascular exhibió a concentraciones bajas NaCl>CaCl₂>NaCl:CaCl₂>Testigo y a concentraciones altas una tendencia

NaCl:CaCl₂>CaCl₂>Testigo>NaCl. En el testigo de 'Hass', el diámetro del cilindro vascular fue superado únicamente por el tratamiento de 0.1 gL⁻¹ de CaCl₂ con 3 %. Entre tratamientos, el diámetro del cilindro vascular tomó una tendencia CaCl₂>Testigo=NaCl=NaCl:CaCl₂.

Al comparar la respuesta de los materiales de aguacate, se observó en el testigo que, en el criollo los valores de diámetro de raíz, grosor de cortex y diámetro de cilindro vascular fueron ligeramente mayores que los de 'Hass' (Cuadros 10 y 11; Figuras 39, 40, 41, 42 y 43). En 'Hass', el diámetro total fue 59 % mayor en los tratamientos con NaCl y 11 % menor con NaCl:CaCl₂ que en criollo; en tanto que la proporción criollo:'Hass' en el grosor del cortex fue cerca de 1:3.9 en CaCl₂ y de 1:1.5 en NaCl:CaCl₂, la proporción para el diámetro del cilindro vascular fue aproximadamente 1.3:1 con CaCl₂ y 1.9:1 con NaCl:CaCl₂. Lo que indica que en situaciones salinas, el grosor del cortex en criollo fue menor y el diámetro del cilindro vascular fue mayor que en 'Hass'. Una de las funciones de la raíz es absorber agua y nutrimentos esenciales para el crecimiento (Marschner, 1995). Los cuales, pasivamente pasan de la solución del suelo a través de las paredes celulares del cortex a la endodermis, atraviesan el protoplasma de las células de la endodermis y consiguen el acceso al cilindro central de la raíz (Schreiber *et al.*, 1999). Una reducción del grosor del cortex y un aumento en el diámetro del cilindro vascular, como se observó en criollo, puede ser como una estrategia para reducir el recorrido radial del agua y elementos nutrimentales a la estela y favorecer su movimiento en la raíz (Ramos *et al.*, 2004). Es posible que el crecimiento del cilindro vascular haya disminuido con NaCl:CaCl₂ debido a que en esta combinación de sales, predominó la concentración de Na y Cl que limitó el efecto benéfico del Ca en las células. Un crecimiento reducido del cilindro vascular es el cambio estructural más significativo, inducido en raíces expuestas a salinidad (Rashid *et al.*, 2004), por lo que en este estudio 'Hass' fue más afectado que criollo y es posible que criollo fue favorecido por la presencia de sales, debido a que el diámetro del cilindro vascular fue mayor en la mayoría de los tratamientos salinos que en el testigo.

Los cortes transversales de las raíces observadas de aguacate criollo presentaron una estructura anatómica diferente entre tratamientos; en 'Hass' mostraron una organización anatómica similar. Mientras que en 'Hass' se distinguieron básicamente la epidermis, el cortex y el cilindro vascular (Figuras 42 y 43); en criollo se diferenciaron otras estructuras que se marcan de acuerdo al tratamiento (Figuras 39, 40 y 41). Aún cuando la raíz es el sensor principal al estrés salino, la participación de la epidermis, cortex, endodermis y periciclo es menos comprendida (Davis y Zhang, 1991). Con base en las figuras 39, 40 y 41, se puede suponer que las sales aceleraron la madurez de la raíz de criollo, debido a que las estructuras claramente identificadas en la mayoría de los tratamientos salinos son: la exodermis, el parénquima cortical, la médula, numerosos vasos de floema y xilema; en algunos de ellos se observaron vasos del xilema con las paredes celulares lignificadas; en general, las características estructurales en condición salina fueron muy diferentes al testigo. Ramos *et al.* (2004) señalan que en *P. philippianum*, la salinidad promovió los procesos de endurecimiento de la pared celular, principalmente en la exodermis como una barrera de protección entre su masa viva y el factor ambiental. Además, encontraron mayor número de células pero de menor tamaño; respuesta que posiblemente contribuya en aumentar la supervivencia de la planta, puesto que las células pequeñas pueden resistir mejor las presiones negativas que las grandes.

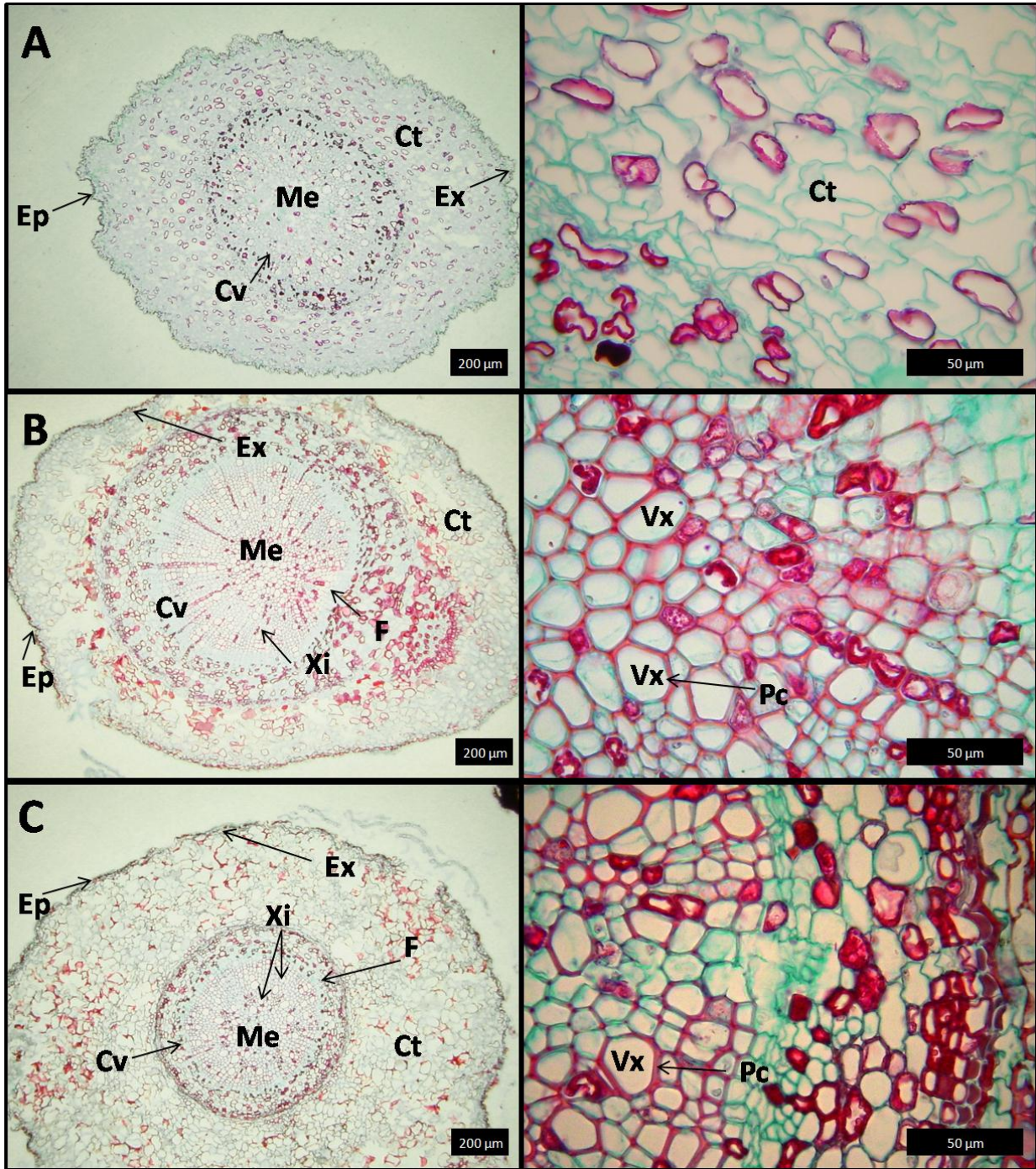


Figura 39. Cortes transversales de raíces de aguacate criollo a los 65 días después de su cultivo *in vitro* en condiciones salinas. A= Testigo; B= 0.1 gL⁻¹ de NaCl; C= 0.3 gL⁻¹ de NaCl. Ct:cortex, Cv:cilindro vascular, Ep:epidermis, Ex:exodermis, F:floema, Me:médula, Pc:pared celular lignificada, Vx:vasos de xilema, Xi:xilema.

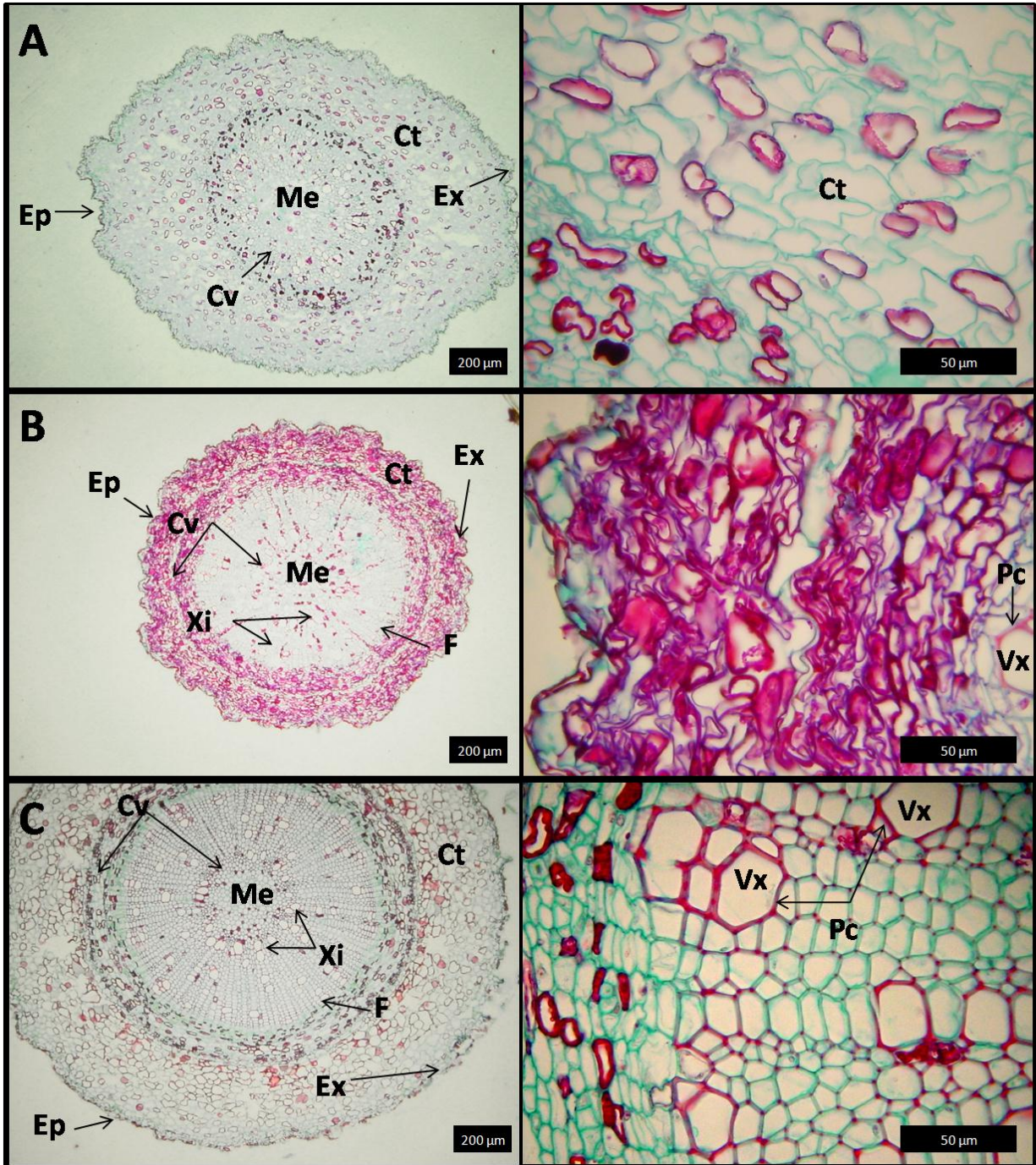


Figura 40. Cortes transversales de raíces de aguacate criollo a los 65 días después de su cultivo *in vitro* en condiciones salinas. A= Testigo; B= 0.1 gL^{-1} de CaCl_2 ; C= 0.3 gL^{-1} de CaCl_2 . Ct:cortex, Cv:cilindro vascular, Ep:epidermis, Ex:exodermis, F:floema, Me:médula, Pc:pared celular lignificada, Vx:vasos de xilema, Xi:xilema.

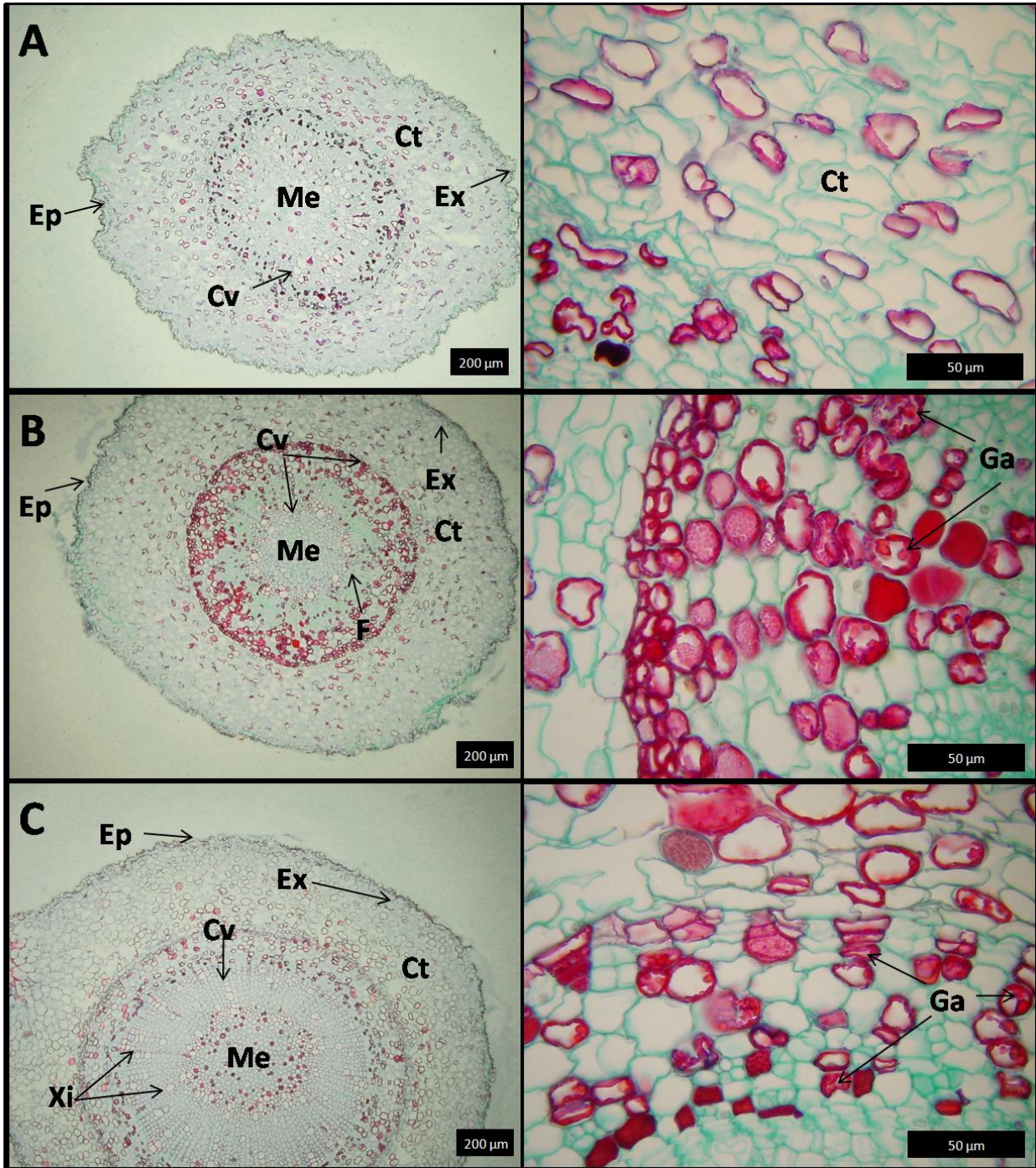


Figura 41. Cortes transversales de raíces de aguacate criollo a los 65 días después de su cultivo *in vitro* en condiciones salinas. A= Testigo; B= 0.1:0.1 gL⁻¹ de NaCl:CaCl₂; C=0.3:0.3 gL⁻¹ de NaCl:CaCl₂. Ct:cortex, Cv:cilindro vascular Ep:epidermis, Ex:exodermis, F:floema, Ga:gránulos de almidón, Me:médula, Pc:pared celular, Xi:xilema.

En 'Hass', las figuras 42 y 43 muestran que en el cilindro vascular se observaron numerosos vasos de xilema y floema; en el centro de la estela, el núcleo parenquimático llamado médula (Esau, 1975) no está claramente definido.

En ambos materiales de aguacate se observaron abundantes gránulos de almidón (Figuras 39, 40, 41, 42 y 43); en criollo, estas sustancias se apreciaron en toda área transversal de la raíz, es decir, tanto en el parénquima cortical como en el cilindro vascular. En 'Hass', fueron más frecuentes entre las capas corticales; en el tratamiento con CaCl_2 fue más notorio (Figura 42C). Es posible que ambos materiales tuvieron la capacidad de sintetizar sustancias orgánicas en sus células como la prolina, que es un soluto que participa en la osmorregulación; según An *et al.* (2003), los materiales tolerantes al estrés salino sintetizan más solutos que los sensibles, en este caso es posible que criollo sea más tolerante que 'Hass'. De acuerdo con Ramos *et al.* (2004) y Lux *et al.* (2004), la respuesta más común a la salinidad se relaciona con alteraciones en la pared celular y cambios en los tejidos radicales; el sistema vascular de la planta es el principalmente afectado. Los tejidos corticales son los encargados de regular el movimiento del agua y solutos orgánicos en el interior de la raíz, son los sitios de almacenamiento de sustancias de reserva, principalmente de almidón y en condiciones de estrés son conocidos como "zona buffer". La primera barrera cortical es la exodermis; además, es la primer parte de esta zona buffer que desarrolla lentamente en el ápice de raíces estresadas. La endodermis representa una barrera apoplástica que controla la absorción y transporte radial de agua y solutos por la raíz; además, mecánicamente protege a la estela contra patógenos y parásitos. Naito *et al.* (1994) reportan que en plantas de arroz, un mecanismo de tolerancia a la salinidad fue la exclusión de Na en la exodermis y endodermis de la raíz. Yuan-Hsun y Shuh-Chun (1995) indican que, los cambios en estas estructuras son signos de daño y disturbios en los procesos evolutivos de las plantas, como un resultado por la acumulación de Na y Cl en los tejidos. Para los mejoradores de plantas es importante conocer tanto los mecanismos fisiológicos de adaptación o tolerancia a la salinidad como los cambios anatómicos en la estructura de la planta estresada, debido a que pueden ser indicadores útiles para producir variedades tolerantes a este factor (Rashid *et al.*, 2004).

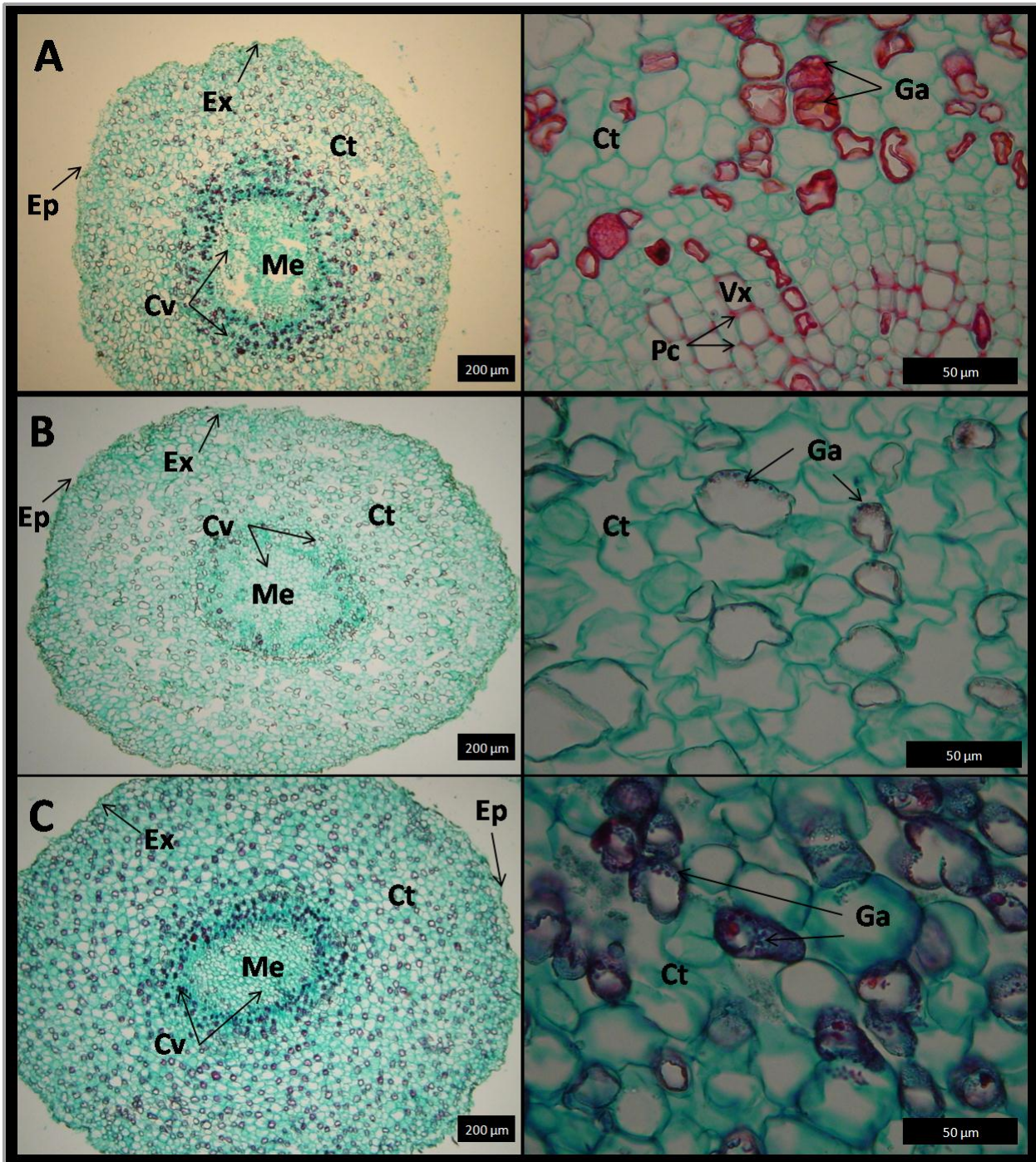


Figura 42. Cortes transversales de raíces de aguacate 'Hass' a los 65 días después de su cultivo *in vitro* en condiciones salinas. A= Testigo; B= 0.7 gL^{-1} de NaCl; C= 0.1 gL^{-1} de CaCl_2 . Ct:cortex, Cv:cilindro vascular, Ep:epidermis, Ex:exodermis, Ga:gránulos de almidón, Me:médula, Xi:xilema.

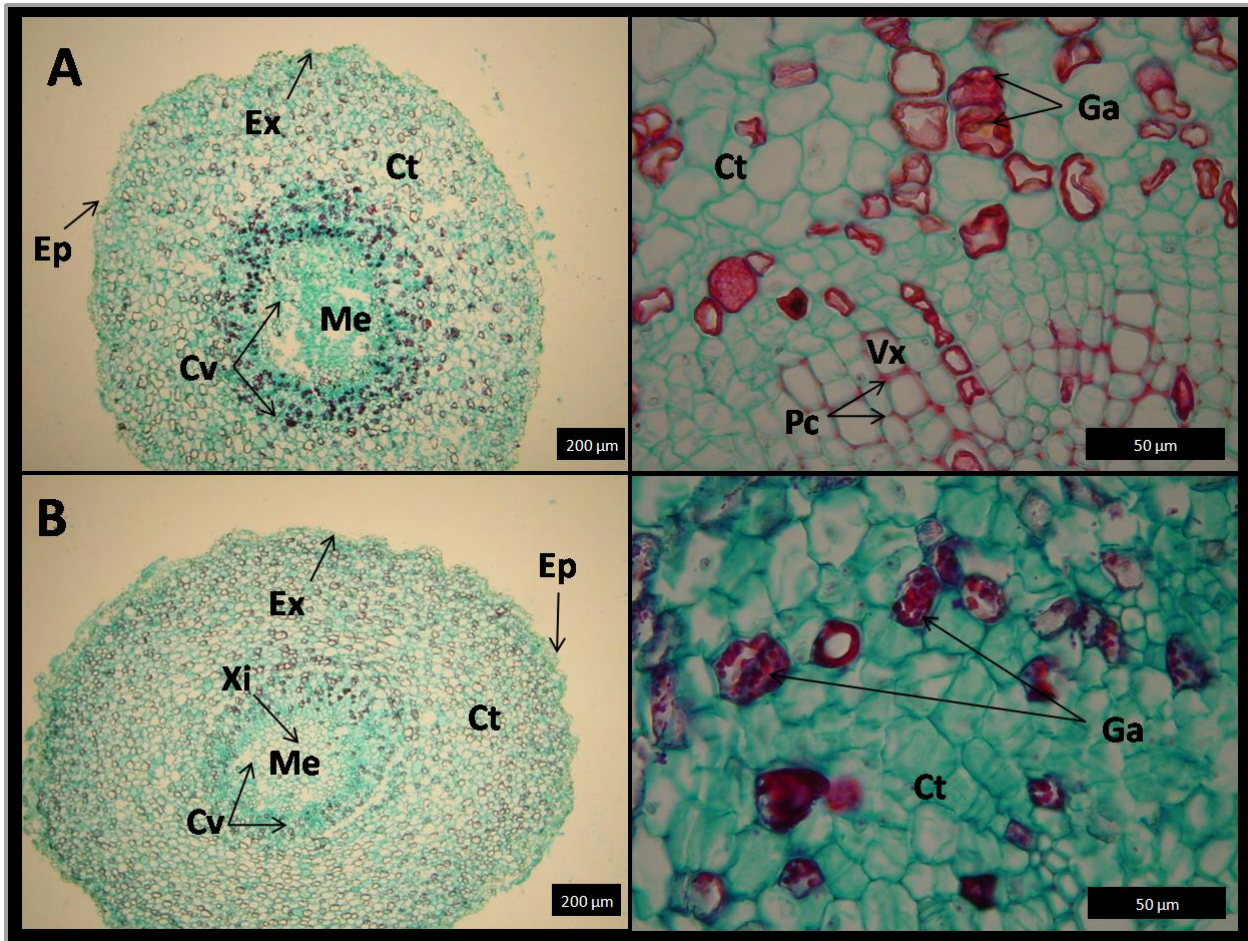


Figura 43. Cortes transversales de raíces de aguacate 'Hass' a los 65 días después de su cultivo *in vitro* en condiciones salinas. A= Testigo; B= 0.3:0.3 gL⁻¹ de NaCl:CaCl₂. Ct:cortex, Cv:cilindro vascular, Ep:epidermis, Ex:exodermis, Ga:gránulos de almidón, Me:médula, Pc:pared celular lignificada Vx:vaso de xilema, Xi:xilema.

V. CONCLUSIONES

El aguacate criollo fue más tolerante al estrés por sales con respecto a 'Hass'.

La adición del NaCl al medio de cultivo MS (1962) al 100% de su composición mineral en comparación al CaCl_2 , tuvo un efecto negativo mayor en los procesos de germinación y emergencia de los ejes embrionarios, el desarrollo y supervivencia de las plántulas especialmente de 'Hass'.

Con relación a la respuesta en los diferentes tratamientos de salinidad, el criollo manifestó mejor crecimiento que 'Hass', lo que sugiere que tiene mayor capacidad de adaptación.

La adición de Ca en el medio de cultivo estimuló los procesos de germinación, emergencia y aceleró la germinación en relación directamente proporcional a la concentración de la sal.

La mayor germinación y emergencia se dio en los tratamientos con CaCl_2 y $\text{NaCl}:\text{CaCl}_2$ que en presencia de NaCl. Lo cual sugiere que el Ca es importante para reducir el daño causado por el NaCl.

El crecimiento tanto del vástago como de la raíz se vio afectado positiva o negativamente. Esta respuesta se puede deber a la capacidad de los tejidos para incorporar las sales a su metabolismo, o bien al tipo de sal que ocasiona el estrés.

Los resultados obtenidos tanto en 'Hass' como en criollo indican que el criollo tiene mayor capacidad de ajuste osmótico al exceso de cloruros.

El vástago acumuló mayor concentración de prolina y su crecimiento fue menos afectado por la restricción hídrica que la raíz, lo cual sugiere que parte aérea es más tolerante al efecto hídrico.

Se identificó que la prolina en tallo y raíz es un indicador de tolerancia a estrés por salinidad dado que se encontró en mayor cantidad en plántulas de tratamientos con las concentraciones altas de sales.

El hecho de que la raíz presentó un déficit de potencial hídrico mayor que el del vástago, sugiere que este tuvo mayor capacidad de ajuste osmótico como respuesta al déficit hídrico, o bien que se activó algún mecanismo para ser más eficiente en el uso del agua.

El cultivo *in vitro* de ejes embrionarios maduros de aguacate permitió determinar que es posible identificar materiales tolerantes y sensibles al estrés salino a los 65 días después de su establecimiento.

Los resultados logrados en esta investigación abren la posibilidad de emplear esta metodología para la selección de portainjertos tolerantes a salinidad.

La adición de NaCl, CaCl₂ y la combinación de ambas sales al medio de cultivo, permitió la activación de mecanismos naturales en las plántulas que mostraron tolerancia a salinidad.

En situaciones salinas, el grosor de cortex en criollo fue menor y el diámetro del cilindro vascular fue mayor que en 'Hass'.

Los cortes anatómicos de las raíces de aguacate criollo presentaron una estructura anatómica diferente entre tratamientos; en 'Hass' mostraron una organización anatómica similar. Mientras que en 'Hass' se distinguieron básicamente la epidermis, el cortex y el cilindro vascular; en criollo se diferenciaron otras estructuras como epidermis, exodermis, floema, médula, pared celular, vasos de xilema y xilema. Por lo permite suponer que las sales aceleraron la madurez de la raíz de criollo

VI. LITERATURA CITADA

- Abel, G.H. and A.J. Mackenzie, 1964. Salt tolerance of soybean varieties (*Glycine max* L.) during germination and later growth. *Crop. Sci.* 4:157-161.
- Akhtar, S., A. Wahid, M. Zkram and E. Rasul. 2001. Some growth, photosynthetic and anatomical attributes of sugarcane genotypes under NaCl salinity. *International Journal of Agriculture and Biology* 3:439-443.
- Akhtar, N. 2006. Callogenesis and organogénesis response of wheat cultivars under sodium chloride salt stress. *Pakistan Journal of Biological Sciences* 9:2092-2096
- Akinci, I.E. and M. Simsek. 2004. Ameliorative effects of Potassium and Calcium on the salinity stress in embryo culture of Cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Journal of Biological Sciences*, 4:361-365.
- Aktas, H., K. Abad e I. Cakmak. 2006. Genotypic variation in the response of pepper to salinity. *Scientia Horticulturae*. 110:260-266.
- Alcántar, G.G. y M. Sandoval. 1999. Manual de Análisis Químico de Tejido Vegetal. Publicación especial 10. Sociedad Mexicana de la Ciencia del Suelo, A.C. Chapingo, México. 60 p
- Alcántar-González, G., L.I. Trejo-Tellez, L. Fernández-Pavia y M. N. Rodríguez-Mendoza. 2007. Nutrición de cultivos. Mundi Prensa México, S.A. de C.V. Colegio de Postgraduados. 440 p.
- Al-Karaki, G.N. 2001. Germination, sodium, and potassium concentration of barley seeds as influenced by salinity. *Journal of Plant Nutrition*, 24:511-522.
- Allan, P. 1981. Plant propagation through tissue culture. *South African Avocado Growers' Association Yearbook* 4:22-26.
- An, P., S. Inanaga, X. Li, H. Shimizu and E. Tanimoto. 2003. Root characteristics in salt tolerance. *Root Research*, 12:125-132.
- SIAP-SAGARPA. 2010. Anuario Estadístico de la Producción Agrícola. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA). Sistema de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). Situación Nacional hasta abril de 2010. En www.siap.gob.mx. Consultado en mayo de 2010.
- Amor, N.B., K.B. Hamed, A. Debez, C. Grignon, and Crabbedly. 2005. Physiological and antioxidant responses of perennial halophyte *Crithmum maritimum* to salinity. *Plant Science*, 4:889-899.
- Ashraf, M. 1994. Breeding for salinity tolerance in plants. *Plant Science*, 13:17-42.

- Askraf, M. and T. McNeilly. 2004. Salinity tolerance in Brassica oilseeds. *Plant Science*, 23:157-174.
- Ashraf, M., T. McNeilly, and A.D. Bradshaw. 1986a. The potential for evolution of salt (NaCl) tolerance in seven grass species. *New Phytology*, 103:299-309.
- Ayers, A.D. and H.E. Hayward. 1948. A method for measuring the effects of soil salinity on seed germination with observations on several crop plants. *Proc. of the Soil Science Society of American*, 13:224-226.
- Ayer, A.D., D.G. Aldrich and J.J. Coony. 1951. Sodium and chloride injury of Fuerte avocado leaves. *California Avocado Society Yearbook*, 36:174-178.
- Azooz, M.M., M.A. Shaddad and A.A. Abdel-Latef. 2004. The accumulation and compartmentation of proline in relation to salt tolerance of three sorghum cultivars. *Indian Journal Plant Physiology*, 9:1-8.
- Bárcenas, O.A.E.; E.J. Molina and M.F. Huanosto. 2003. Contenido de macro y microelementos en hojas, flor y fruto de aguacate "Hass" en la región de Uruapan, Michoacán. *Proc. V. World Avocado Congresso. (Actas V Congreso Mundial del Aguacate)*. 365-371.
- Barkla, B.J. and O. Pantoja. 1996. Physiology of ion transport across the tonoplast of higher plants. *Annual Review of Plant Physiology and Molecular Biology*, 47:159-184.
- Barkla, B.J., R.V. Estrella, E. Balderas y O. Pantoja. 2007. Mecanismos de tolerancia a la salinidad. *Bioteología* 14:263-272.
- Bates, L.S., R.P. Waldern, I.D. Teare. 1973. Rapid determination of free proline for water stress studies. *Plant Soil* 39:205-207.
- Ben-Ya'acov, A., E. Michelsol, and I. Sela. 1979. Field research for selection of avocado rootstocks and scions in commercial plantations: report on the first decade of the research, 1968-1978 (in Hebrew). Agricultural research Organization Bet-Dagan, Israel.
- Ben-Ya'acov. 1986. Avocado rootstocks selection in Israel. In *Congreso de Horticultura ASHS-Región Tropical. Resúmenes*. San José, Costa Rica. pp 455.
- Ben-Ya'acov, A.E. and E. Michelson. 1995. Avocado rootstocks *Horticultural Review*, 17:381-429.
- Ben-Ya'acov, A. M. Zilberstaine. 1999a. The possible use of avocado (*Persea americana* Mill) germoplasm material as rootstocks for soil stress conditions. *Revista Chapingo. Serie Horticultura*, 5:25-28.

- Berlyn, G.P. 1976. Botanical microtenchique and citochemistry. Iowa State University Press. Ames, IA. 79 p
- Bernstein, L. 1975. Effects of salinity and sodicity on plant growth. Purchased by Agricultural Research Service, US Department of Agriculture, for official use 295-312.
- Bernstein, L. 1981. Effects of salinity and soil water regime on crop yield. En: Yarom D. (ed.). Salinity in irrigation and water resources. 47-64 p.
- Bernstein, N., M. Ioffe and M. Zilberstaine. 2001. Salt stress effects on avocado rootstock growth. I. Establishing criteria for determination of shoot growth sensitivity to the stress. Plant and Soil 233:1-11.
- Bernstein, N., M. Zilberstaine, M. Ioffe, and A. Meiri. 2003. Effects of salt-stress on root and shoot growth in avocado. In Arpaia, M.L. and Hofshi (eds.) Proceedings of Avocado Brainstorming. Session II. Salinity management. October 31-November 1. Ventura, California, USA.
- Bernstein, N., M. Meiri and M. Zilberstaine. 2004. Root growth of avocado is more sensitive to salinity than shoot growth. Journal Amer. Soc. Hort. Sci. 129:188-192.
- Bezerra, M.A., F. de L. Claudivan, E.G. Filho, C.E.B. de Abreu, and J.T. Prisco. 2007. Physilogy of cashew plants grown under adverse conditions. Brazilian Journal Plant Physilogy, 19:449-461.
- Bhandal, I.S. C.P. Malik. 1988. Potassium estimation, uptake, and its role in the physiology and metabolism of flowering plants. International Review of Cytology 110:205-254.
- Bliss, R. D., K. A. Plant-Aloia and W. W. Thompson. 1984. Changes in plasmalemma organization in cowpea radicle during imbibition in water and NaCl solutions. Plant Cell Environ. 7: 606.
- Bliss, R.D., K.A. Platt-Aloia and W.W. Thomson. 1986. Osmotic sensitivity in relation to salt sensitivity in germinating barley seeds. Plant, Cell and Environmental, 94:721-725.
- Blumenthal-Goldschmidt S. and A. Poljakoff-Mayber. 1968. Effect of substrate salinity on growth and on submicroscopic structure of leaf cells of *Atriples halimus* L. Austr. J. Bot. 16:469-478.
- Bracci, A., A. Minnocci and L. Sebastiani. 2008. *In vitro* olive (*Olea europaea* L.) cvs Frantoio and Moraiolo microshoot tolerance to NaCl. Plant Biosystems, 142:563-571.

- Brugiere, N., F. Dubois, A.M. Limami, M. Lelandais, Y. Roux, R.S. Sangwan and B. Hirel. 1999. Glutamine synthesis in the Phloem plays a major role in controlling proline production. *Plant Cell*, 11:1995-2011.
- Cabalceta, G. y A. Cordero. Efecto de salinidad en arroz bajo riego en Guanacastle, Costa Rica. *Agronomía Costarricense* 15:167-172.
- Casierra-Posada, F. y S.Y. Rodríguez. 2006. Tolerance of pineapple guava plants (*Acca sellowiana* [Berg Burret] to NaCl salinity. *Agronomía Colombiana* 24:258-265.
- Castro, V.M.; E.R. Iturrieta, O.C. Fassio. 2009. Rootstock effect on the tolerance of avocado plants cv Hass to NaCl stress. *Chilean Journal of Agricultural Research*, 69:316-324.
- Chalermpol K., S. Cha-um and R. Wanussakul. 1998. Morphological and physiological comparisons of plantlets *in vitro*: responses to salinity. *Acta Hort.* 457:181-186.
- Chang, C.W. 1961. Effects of saline irrigation water and exchangeable sodium on soil properties and growth of alfalfa. *Soil Science*, 91:29-37.
- Cheeseman, J.M. 1988. Mechanisms of salinity tolerance in plants. *Plant Physiology*, 87:547-550.
- Chen, T. and N. Murata. 2002. Enhancement of tolerance of abiotic stress by metabolic engineering of betaine and other compatible solutes. *Plant Biol.* 5:250-257.
- Chinnusamy, V., A. Jagendorf and J.K. Zhu. 2005. Understanding and improving salt tolerance in plants. *Crop Sc.*, 45:437-448.
- Chirachint, W. and D.W. Turner. 1988. Shade reduces the foliar symptoms of 'Fuerte' avocado affected by salt, without significantly changing the concentration of Na, K or Cl in the leaves. *Scientia Horticulturae* 36:1-15.
- Churchil, K.A. and H. Sze. 1984. Anion-sensitive, H⁺ pumping ATPase of root tips. Direct effects of Cl⁻, NO₃⁻ and a disulfonic stilbene. *Plant Physiology*, 76:490-497.
- Cooper, W.C. 1951. Salt tolerance of avocado on various rootstocks. *Tex., Avocado Society Yearbook*, 24-28.
- Cramer G.R., A. Läuchli and E. Epstein. 1986. Effects of NaCl and CaCl₂ on ion activities in complex nutrient solutions and root growth of cotton. *Plant Physiol.* 81:792-797.
- Crowley, D. 2008. Salinity management in avocado orchards. *California Avocado Society. Yearbook* 91:83-104.

- Dalsaso, L. y E. Guevara. 1988. Multiplicación clonal *in vitro* del aguacate (*Persea americana*) cv 'Fuerte'. *Agronomía Costarricense*, 13:61-71.
- Davies, W.P. and J.H. Zhang. 1991. Root signals and the regulation of growth and development of plants in drying soil. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol* 42:55-76.
- Davis, J.G., R.W. Waskom, T.A. Bauder and G.E. Cardon. 2004. Managing sodic soils. Colorado State University Cooperative extension. No. 0.504.
- Delane R., H. Greenway, R. Munns and J. Gibbs. 1982. Ion concentration and carbohydrate status of the elongating leaf tissue of *Hordeum vulgare* growing at high external NaCl. I. Relation-ship between concentrarion and growth. *Journal Experimental Botanical*, 33:557-573.
- Delauney, A.J. and D.P.S. Verma. 1993. Proline biosynthesis and osmo-regulation in plants. *Plant Journal*, 4:215-223.
- Delesalle, V.A. and S. Blum, S. 1994. Variation germination and survival among families of *Sagittaria latifolia* in response to salinity and temperature. *International Journal of Plant Sciences* 155:187-195.
- Dimassi-Theriou, K. 1998. Response of increasing rates of NaCl or CaCl₂ and proline on "Mr.S 2/5" (*Prunus cerasifera*) peach rootstock cultured in vitro. *Adv. Hort. Sci.* 12:169-171.
- Dix P.J. 1993. The role of mutant cell lines in studies on environmental stress tolerance: an assessment. *Plant Journal*, 3.309-313.
- Ehsanpour, A.A. and N. Fatahian. 2003. Effects of salt and proline on *Medicago sativa* callus. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 73:53-56, 2003.
- Embleton, T.W., M. Mitsuo, W.B. Storey and M.J. Garber. 1962. Chorine and others elements in avocado leaves as influenced by rootstock. *Proceeding of the American Society for Horticultural Science*, 80:231-236.
- Engvild, K.C. 1986. Chloride-containing natural compounds in higher plants. *Phytochem* 25:781-791.
- Epstein, E. 1961. The essential role of calcium in selective cation transport by plant cells. *Plant Physiology*, 437:444.
- Epstein E. 1972. Mineral nutrition of plants: Principles and perspectives. John Wiley and Sons. New York.
- Epstein, E. and D.W. Rains. 1987. Advances in salt tolerance. *Plant and Soil*, 99:17-29.

- Epstein, E. 1998. How calcium enhances plant salt tolerance. *Science*, 40:1906-1907.
- Espinar, J.L., L.V. García, and L. Clemente. 2005. Seed storage conditions change the germination pattern of clonal growth plants in Mediterranean salt marshes. *American Journal of Botany*, 92:1094-1101.
- Essah, P.A., R. Davenport and M. Tester. 2003. Sodium influx and accumulation in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 133:307-318.
- Esau, K. 1975. La raíz. Anatomía Vegetal. Traducido del inglés por el Dr. José Pons Rosell. Tercera edición. Ediciones Omega, S.A. Barcelona, 513-571 pp.
- Fernández R., E.J. y F.C. Ferre. 2005. Conceptos y aplicaciones prácticas en horticultura y semilleros. Eficiencia del uso del agua. *Revista Viveros* 3:86-89.
- Flowers, T.J. 2004. Improving crop salt tolerance. *Journal of Experimental Botany* 55:307-319.
- Flowers T.J. and A. Läuchli. 1983. Sodium versus potassium: substitution and compartmentation. In A. Läuchli, R.L. Bielecki, eds. *Inorganic Plant Nutrition. Encyclopedia of Plant Physiology*. N.S. 15B. Springer-Verlag, Berlin.650-681 pp.
- Flowers, T., J. Salama, and A.R. Yeo. 1988. Water-use efficiency in rice (*Oryza sativa* L.) in relation to resistance to salinity. *Plant, Cell and Environmental*, 11:453-459.
- Flowers, T.J., P.F. Troke and A.R. Yeo. 1977. The mechanism of salt tolerance in halophytes. *Annu. Rev. Plant Physiology* 28:89-121.
- Fuentes, J.L., N.N. Rodríguez, L. Santiago, Y. Valdés, I.M. Ramírez and J.A. Rodríguez. 2004. Zygotic embryo culture in avocado (*Persea Americana* Mill). *Cultivos Tropicales*, 25:73-76.
- Fukuda, A., A. Nakamura, A. Tagiri, H. Tanaka, A. Miyao, H. Hirochika and Y. Tanaka. 2004. Function, intracellular localization and the importance in salt tolerance of a vacuolar Na⁺/H⁺ antiporter from rice. *Plant Cell Physiology*, 45:147-159.
- García, M. y E. Medina. 2003. Crecimiento y acumulación de prolina en dos genotipos de caña de azúcar sometidos a salinización con cloruro de sodio. *Agronomía Colombiana*, 20:168-179.
- Gerard C.J. 1971. Influence of osmotic potential, temperature and calcium on growth of plant roots. *Agron. J.* 63:555-558.
- Giel, P. y K. Bojarczuk. 2002. The effect of high concentration of selected calcium salts on development of microcuttings of *Rhododendrom* R. 'Catawbiense grandiflorum' in *in vitro* cultures. *Dendrobiology* 48:23-29.

- Ghoulam, C., A. Foursy y K. Fares. 2002. Effects of salt stress on growth, inorganic ions and proline accumulation in relation to osmotic adjustment in five sugar beet cultivars. *Environ. Exp. Bot.* 47:39-50.
- Girija, C., B.N. Smith, P.M. Swamy. 2002. Interactive effects of sodium chloride and calcium chloride on the accumulation of proline and glycinebetaine in peanut (*Arachis Hypogaea* L.). *Environmental Experimental Botany*, 47:1-10.
- Glenn, E.P., J.J. Brown and E. Blumwald. 1999. Salt tolerance and crop potential of halophytes. *Critical Reviews. Plant Science* 18:227-255.
- Gobinathan, P., B. Sankar, P.V. Murali and R. Panneerselvam. 2009. Interactive effects of calcium chloride on salinity-induced oxidative stress in *Pennisetum tipoides*. *Botany Research International*, 2:143-148.
- Gómez-Cadena, A. 2001. Alteraciones en la fisiología de los cítricos inducidas por salinidad. *Levante agrícola* 356:187-193.
- González, L.M., M.C. González y R. Ramírez. 2002. Aspectos generales sobre la tolerancia a la salinidad en las plantas cultivadas. *Cultivos tropicales*. 4:27-37.
- González-Rosas, H; Salazar-García, S.; Ramírez-Reyes, G.; Rodríguez-Ontiveros, J.L.; Ramos-Villaseñor, A.C. 2003. Preliminary results on *in vitro* selection for tolerant to chloride excess in avocado. *Revista Chapingo. Serie Horticultura* 9:39-43.
- Gustafson, D.C. 1962. The salinity problem in growing avocado. *California Avocado Society Yearbook*, 46:100-105.
- Hartmann, H., E. Kester y F. Davis. 1993. *Plant Propagation. Principles and Practices*. Prentice-Hall, New Delhi. pp 647.
- Hasegawa, M.P., R.A. Bressan, J.K. Zhu y H.J. Bohnert. 2000. Plant cellular and molecular responses. *Ann. Rev. of Plant Phys. And Plant Molec. Biol.* 51:463-49
- Hassaneim, A.M. 2004. Effect of relatively high concentrations of mannitol and sodium chloride on regeneration and gene expression of stress tolerant (*Alhagi graecorum*) and stress sensitive (*Lycopersicon esculentum* L.) plant species. *Bulg J. Plant Physiol.* 30:19-36.
- Hewitt, E.J. 1983. A perspective of mineral nutrition: essential and functional metals in plants. pp 227-323. In: D.A. Robb and W.S. Pierpoint (eds.). *Metals and micronutrients: Uptake and utilization by plants*. Academic Press, New York.
- Hu, Y. y U. Schmidhalter, 2005. Drought and salinity: A comparison of their effects on mineral nutrition of plants. *Jour. Plant Nutr. Soil Sc.* 168:541-549.

- Iyer, S. and A. Caplan. 1998. Products of proline catabolism can induce osmotically regulated genes. *Plant Physiology* 116:203-211.
- Jaleel, CH. A., R. Gopi, P. Manivannan and R. Panneerselvam. 2007. Antioxidative potentials as a protective mechanism in *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. plants under salinity stress. *Turk Journal Botanic* 31:245-251.
- Jaleel, CH.A., B. Sankar, R. Sridharan and R. Ranneerselvam. 2008. Soil salinity alters growth, chlorophyll content, and secondary metabolite accumulation in *Catharanthus roseus*. *Turk Journal Biology* 32:1-5.
- Jamil, M. and E.S. Rha. 2004. The effect of salinity (NaCl) on the germination and seedling of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) and cabbage (*Brassica oleracea capitata* L.). *Korean Journal Plant Research*. 7:226-232.
- Jamil, M., D.B. Lee, K.Y. Jung, A. Muhammad, S.CH. Lee, E.S. Rha. 2006. Effect of salt (NaCl) stress on germination and early seedling growth of four vegetables species. *Journal Central European Agriculture* 7(2):273-282.
- Janick, J. 1992. Seasonal regeneration of avocado fruit tissue *in vitro*. *Journal American Society Horticultural Sc.* 83:287-290.
- Johnston, M., C.P. Grof, and P.F. Brownell. 1988. The effect of sodium nutrition on the pool sizes of intermediates of the C4 photosynthetic pathway. *Australian Journal Plant Physiology*, 15:749-760. Habla de Na
- Kadman, A. 1968. Selection of avocado rootstock suitable for use with saline irrigation water. *California Avocado Soc. Yearbook*, 40:132-134.
- Katembe, W.J. I.A. Ungar and J.P. Mitchell. 1998. Effect of salinity on germination and seedling growth of two *Atriplex* species (Chenopodiaceae). *Annals of Botany*, 82:167-175.
- Kessel, A. 2008. Aplicación de técnicas biotecnológicas en frutales, una vía valiosa para el rescate y la conservación de estas especies. *Cultivos Tropicales* 29:27.37.
- Krikorian, A.D. 1991. Propagation clonal *in vitro*. En cultivo de tejidos en la agricultura. *Fundamentos y Aplicaciones. CECI:CIAT*. pp 107.
- Kurth E., G.R. Cramer, A. Läuchli and E. Epstein. 1986. Effects of NaCl and CaCl₂ on cell enlargement and cell production in Cotton roots. 1986. *Plant Physiology*, 82:1102-1106.
- Kuiper, P.J.C.1968. Lipids in grape roots in relation to chloride transport. *Plant Physiology*, 43:1367-1371.

- Kuiper, D., J. Schuit and P.J.C. Kuiper. 1990. Actual cytokinin concentrations in plant tissue as an indicator for salt resistance in cereals. *Plant and Soil*, 123:243-250.
- Lahav. E. 2003. The response of avocado to salinity and waterfertilizer management. In: M.L. Arpaia and R. Horshi (eds.), *Proceedings of Avocado Brainstorming. Session II. Salinity Management*. Oct. 31-Nov. 1. Ventura CA. 6p.
- LaHaye P.A. and E. Epstein. 1971. Calcium and salt toleration by bean plants. *Physiol Plant*, 25:213-218.
- Layne-Garsaball, J.A., J.R. Méndez y J. Mayz-Figueroa. 2007. Efecto de la salinidad del suelo sobre la germinación de semillas de maíz de diferentes pesos en el Oriente Venezolano. *Temas Agrarios*, 12:62-73.
- Lazof, D.B. and N. Bernstein. 1998. The NaCl-induced inhibition of shoot growth: The case for disturbed nutrition with special consideration of calcium nutrition. *Botany Research*, 29:115-190.
- Leopold A.C. and R.P. Willing. 1984. Evidence for toxicity effects of salt on membranes. In R.C. Staples, G.H. Toenniessen, eds. *Salinity tolerance in plants; strategies for crop improvement*. John Wiley & Sons, New York. 67-75 pp.
- Litz, R.E., Witjaksono, S. Raharjo, D. Efendi, F. Pliego-Alfaro and A. Barceló-Muñoz. 2005. *Persea americana* avocado. In: Litz, R.E. (Ed.) *Biotechnology of fruit and nut crops*. Wallingford, UK, CAB International. pp 326-347.
- Llano-Agudelo, B.E.; H. González-Rosas; S. Salazar-García. 1995. *In vitro* culture of mature avocado embryos. *Fruits*, 50:59-64.
- Lux, A., M. Luxová, J. Abe, S. Morita. 2004. Root cortex: structural and functional variability and responses to environmental stress. *Root Research*, 13:117-131.
- Maathuis, F.J.M. and A. Amtmann. 1999. K⁺ nutrition and Na⁺ toxicity: The basis of cellular K⁺/Na⁺ ratios. *Annals of Botany*, 84:123-133.
- Maathuis, F.J.M. 2006. The role monovalent cation transports in plant responses to salinity. *Journal of Experimental Botany*, 57:1137-1147.
- Mahajan, S. and N. Tuteja. 2005. Cold, salinity and drought stresses: An overview. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 444:139-158.
- Marschner, H. 1995. *Mineral nutrition of higher plants*. Second edition. Academic Press Ltd., London. pp 889.
- Marschner, H. 2002. *Mineral nutrition of higher plants*. Second Edition. Academic Press. London, U.K. 889 p.

- Martínez, J.P., S. Lutts, A. Schanck, M. Bajji and J.M. Kinet. 2004. Is osmotic adjustment required in the Mediterranean shrub *Atriplex halimus* L? *Journal of Plant Physiology* 161:1041-1051.
- Mathews, H. and K.E. Van Holde. 1999. *Bioquímica* 2ª ed. McGraw-Hill Interamericana de España. 346 p.
- Maurel, C. and M.J. Chrispeels. 2001. Aquaporins. A molecular entry into plant water relations. *Plant Physiology* 125:135-138.
- Medrano, H., J. Bota, J. Cifre, J. Flexas, M.R. Carbó y J. Gulías. 2007. Eficiencia del uso del agua por las plantas. Instituto Universitario de Geografía. Universidad de Alicante. *Investigaciones Geográficas*, 43:63-84.
- Mickerlbart, M.V. and M.L. Arpaia. 2002. Rootstock influences changes in ion concentration, growth and photosynthesis of 'Hass' avocado trees in response to salinity. *Journal American Society Horticultural Science*, 127:649-655.
- Mickelbart, M.V., S. Melser and M.L. Arpaia. 2007. Salinity-induced changes in ion concentration of 'Hass' avocado trees on three rootstocks. *Journal of Plant Nutrition*, 30:105-122.
- Mohamed-Yasseen, Y. 1993. Morphogenesis of avocado *in vitro*. A review. *California Avocado Society Yearbook*, 77:101-105.
- Mohamed-Yasseen, Y. 1993. *In vitro* propagation of avocado (*Persea Americana* Mill). *California Avocado Society Yearbook*, 77:107-111.
- Mohamed-Yasseen, Y., R.J. Schenel, R.J. Knight and T.L. Davenport. 1992. *In vitro* plant regeneration from avocado (*Persea Americana* Mill) *Horticultural Science*, 27:696.
- Morales, D., M. del C. Bolarín y E. Cayuela. 2008. Respuesta de plantas de arroz (*Oryza sativa* L.) de la variedad LP-7 a la aplicación de diferentes niveles de NaCl. II. Iones inorgánicos y orgánicos. *Cultivos Tropicales* 29:59-62.
- Munns, R. 1993. Physiological processes limiting plant growth in saline soil: some dogmas and hypotheses. *Plant Cell Environmental*, 16:15-24.
- Munns, R. 2002. Comparative physiology of salt and water stress. *Plant Cell Environmental*, 28:239-250.
- Munns, R., H. Greenway, R. Delane and R. Gibbs. 1982. Ion concentration and carbohydrate status of the elongating leaf tissue of *Hordeum vulgare* growing at high external NaCl. II. Causes of the growth reduction. *Journal Experimental Botany*, 33:574-583.

- Munns, R. H. and M. Tester. 2008. Mechanisms of salinity tolerance. Annual Review Plant. Biology. 59:651-681.
- Murashige, T.; F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiology Plant. 15:473-497.
- Musyimi, D.M. 2005. Evaluation of young avocado plants (*Persea americana* Mill) for tolerance to soil salinity by physiological parameters. MS. Thesis, Maseno University. Maseno, Kenya. 186 p.
- Musyimi, D.M., G.W. Netondo and G. Ouma. 2007. Effects of salinity on gas exchange nutrients uptake in avocados. Journal of Biological Sciences, 7:496-505.
- Musyimi, D.M., G.W. Netondo, and G. Ouma. 2007a. Growth of avocado plants under saline conditions. International Journal of Fruit Science, 7:59-75.
- Naito, H., M. Tsuchiya and S. Kumano. 1994. Physiological response to salinity in rice plant. II. Effect of transpiration and root respiration on sodium uptake in NaCl-treated rice plant. Japan Journal Crop Science, 63:320-325.
- Nayyar, H. 2003. Variation in osmoregulation in differentially drought-sensitive wheat genotypes involves calcium. Biología Plantarum, 47:541-547.
- Netondo, G.W., J.C. Onyango and E. Beck. 2004. Sorghum and salinity: I. Response of growth, water relations, and ion accumulation to NaCl salinity. Crop Science Society of American, 44:797-805.
- Netondo, G.W., J.C. Onyango, and E. Beck. 2004a. Sorghum and salinity: I. Response of growth, water relations, and ion accumulation to NaCl salinity. Crop Science, 44:797-805.
- Niknam, S.R. and J. Mc Comb. 2000. Salt tolerance of selected Australian woody species a review. Forest Ecology and Manage, 139:1-19.
- Norman, T. and L.J. Waldron. 1984. Salinity, photosynthesis and leaf growth. California Agricultural, 38:38-39.
- Norlyn, J.D., and E. Epstein. 1984. Variability in salt tolerance of four Triticale lines at germination and emergence. Crop Science, 24:1090-1092.
- Nuccio, M.L., D. Rhodes, S. Mc Neil, and A. Hanson. 1999. Metabolic engineering of plants for osmotic stress resistance. Curr. Opin. Plant Biology 2:128-134.
- Oppenheimer, C. 1947. The acclimation of new tropical and subtropical fruit trees in Palestine. Bulletin Agricultural Research Sta. Rehovot, 44:110-115.

- Oster, J.D., M.L. Arpaia. 1992. 'Hass' Avocado response to salinity as influenced by clonal rootstocks. Proc. 2nd World Avocado Congress. 209-214.
- Pahlich, E., R. Kerres and h.J. Jager. 1983. Influence of water stress on the vacuole/extravacuole distribution of proline protoplasts of *Nicotiana rustica*. Plant Physiology 72:590-591.
- Parida, A.K. and A.B. Das. 2005. Salt tolerance and salinity effects on plants: a review. Ecotoxicology Environmental Safety, 60:324-349.
- Passera, C. and A. Albuzio. 1997. Effect of salinity on photosynthesis and photorespiration of two wheat species (*Triticum durum* cv PEPE 2122 and *Triticum aestivum* cv Marxotto). Canadian Journal Botany, 56:121-126.
- Patel, P.M., A. Wallace and R.T. Muller. 1975-76. Salt tolerance of Huntalas compared with other avocado rootstocks. California Avocado Society Yearbook, 59:78-81.
- Pessarakli, M. 1999. Handbook of Plant and Crop Stress. Second Edition. USA. 1254 p.
- Pierik, R.L.M. 1990. Cultivo *in vitro* de las plantas superiores. Ediciones Mundi-Prensa.
- Pire, R., A. Pereira, J. Diez, and E. Fereres. 2007. Evaluación de la tolerancia a la sequía de un portainjerto venezolano de vid y posibles mecanismos condicionantes. Agrociencia, 41:435-446.
- Pliego-Alfaro, F. and T. Murashige. 1988. Somatic embryogenesis in avocado (*Persea americana* Mill) *in vitro*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 12:61-66.
- Pliego-Alfaro, F. and R.E. Litz. 2007. Biotechnology and avocado improvement. California Avocado Society, 90:149-167.
- Poljakoff-Mayber, A. and H.R. Lerner. 1999. Plants in saline environments. In: Pessarakli M. (ed): Handbook of plant and crop physiology. Marcel Dekker, New York, 125-154.
- Prisco, J.T. and J.W. O'Leary. 1970. Osmotic and "toxic" effects of salinity on germination of *Phaseolus vulgaris* L. seeds. Turrialba, 20:177-184.
- Prisco J.T., J.F. Enéas and E.F. Gomes. 1981. Effect of NaCl salinity on cotyledon starch mobilization during germination of *Vigna unguiculata* (L.) Walp. Seeds. Revista Brasileira de Botânica, 4:63-71.
- Prisco, J.T. 1987. Contribuicao ao estudo da germinacao e estabelecimento da plântula de uma glicófita (*Vigna unguiculata* (L.) Walpl.). Fortaleza, Universidade Federal do Ceará 65 p Tese de Professor Titular.

- Qui, Q., Y. Guo, F. Quintero, J. Pardo, K. Schumaker and J. Zhu. 2004. Regulation of vacuolar Na⁺/H⁺ exchange in *Arabidopsis thaliana* by the salt-overly-sensitive (sos) pathway. *Journal Biology Chemistry*, 279:207-215.
- Ramanjulu, S. and C. Sudhakar. 2000. Proline metabolism during dehydration in two mulberry genotypes with contrasting drought tolerance. *Journal of Plant Physiology*, 157:81-85.
- Ramos, J.C., M.G. Perreta, J.C. Tivamo y A.C. Vegetti. 2004. Variaciones anatómicas en la raíz de *Pappophorum philippianum* inducidas por salinidad. *Revista internacional de Botánica Experimental*, 53:103-109.
- Rashid, P., J.L. Karmoker, S. Chakroborty and C. Sarker. 2004. The effect of salinity on ion accumulation and anatomical attributes in Mungbean (*Phaseolus radiates* L. cv Bari-3) seedlings. *International Journal of Agriculture and Biology*, 6:495-498.
- Ray, V. 2002. Role of amino acids in plants responses to stress. *Biología Plantarum*, 45:481-487.
- Reisenauer. H.M., L.M. Walsh and R.G. Hoefft. 1973. Testing soils for sulphur, boron, molybdenum and chlorine. In: L.M. Walsh and J.D. Beaton. 1973. *Soil testing and plant analysis*. Soil Sci. Soc. Of America Inc. Madison/Wisconsin, 173-200 p.
- Renault,S., C. Croser, A.J. Franklin and J.J. Zwiazek. 2001. Effects of NaCl and Na₂So₄ on red-osier dogwood (*Cornus stolonifera* Michx) seedlings. *Plant and Soil*, 233:261-268.
- Rengel, Z. 1992. The role of calcium in salt toxicity. *Plant, Cell and Environment*, 15:625-632.
- Rodríguez N.N.; M. Capote; V. Zamora. 1999. Cultivo *in vitro* del Aguacatero (*Persea americana* Mill). *Rev. Chap. Serie Horticultura*, número especial:231-237.
- Roger, M.E. and C.L. Nobles. 1991. The effect of NaCl on the establishment and growth of balance clover (*Trifolium michelianum* savi var *Balansae* Buiss) *Australian Journal of Agricultural Research*, 42:847-857.
- Rognes, S.E. 1980. Anion regulation of lupine asparagine synthetase: Chloride activation of the glutamine-utilizing reactions. *Phytochemistry*, 19:2287-2293.
- Rodríguez, N.N., G. González, A. Simón, O. Mas y M. Morenza. 1999. Recursos genéticos del aguacatero (*Persea americana* Mill) en Cuba. I. Prospección, colecta, establecimiento de la colección, selección y caracterización de cultivares. *CitriFrut*, 17:27-32.
- Rodríguez-Pérez, L. 2006. Physiological implications of osmoregulation in plants. *Agronomía Colombiana*, 24:28-37.

- Salazar G., S., J.I.F. Cortés., S.B. Alcalde y G. P. Zárate. 1987. Daños por salinidad en árboles de aguacate 'Fuerte' en Atlixco, Puebla. *Agrociencia*, 68:115-134.
- Salazar-García S. and Cortés-Flores, J.I. 1988. Leaf scorch and mineral nutrition of avocado trees irrigated with saline water. California. *Avocado Society Yearbook*, 72:229-235.
- Salazar, G., S., J. de J. V. Cárdenas, R. M. Torres y J.R.G. Aguilar. 2004. Selecciones de aguacate con potencial de uso como portainjertos. II Respuesta al enraizamiento mediante acodos. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 27:183-190.
- Salisbury, F.B. y C.W. Ross. 1994. *Fisiología Vegetal*. Cuarta edición. Grupo editorial Iberoamericana, S.A. de C.V. México.
- Sánchez, B.E.I. 2003. Emergencia de brotes de tubérculos y acumulación de biomasa de plantas de papa (*Solanum tuberosum* L.) cv Alpha, en condiciones de estrés inducido por diversas soluciones salinas. Tesis doctoral. Colegio de Postgraduados, Montecillo. pp 109.
- Sánchez-Colín S., P. Mijares-Oviedo, L. López-López, A.F. Barrientos-Priego. 1992. Historia del aguacate en México. Fundación Sánchez Colín. CICTAMEX, S.C., 171-185.
- Sancho M.A., S.M. de Forchetti, F. Pliego, V. Valpuesta and M.A. Quesada. 1996. Peroxidase activity and isoenzymes ins the culture medium of NaCl adapted tomato suspension cells. *Plan Cell Tissue and Organ Culture*, 44:161-167.
- Saunders, M.J. 1990. Calcium and plant hormone action. *Symposia of the Society for Experimental Botany*, 4:271-283.
- SEMARNAT. 2002. Base de datos del Sistema Nacional de Información y Recursos Naturales (SNIARN) dimensión ambiental. Degradación de suelos: área de influencia de los procesos, tipos y niveles de degradación (Consulta: 2007). http://dgeiawf.semarnat.gob.mx:8080/ibi_apps/WFServlet?IBIF_ex=D3_SUELO03_01&IBIC_user=dgeia&IBIC_pass=Dgeiasrv1001.
- Shall, S. 1987. La multiplication of avocado (*Persea americana* Mill cv Fuerte) for microbouturage *in vitro*. *Fruits* 42:171-176.
- Shani U., A. Ben-Gal and L.M. Dudley. 2005. Environmental implications of adopting a dominant factor approach to salinity management. *Journal of Environmental Quality*, 34:1455-1460.
- Shannon, M.C. 1985. Principles and strategies in breeding for higher salt tolerance. *Plant and Soil*, 89:227-241.

- Shannon, M.C. 1992. The effects of salinity on cellular and biochemical processes associated with salt tolerance in tropical plants. *Proceeding Plant Stress in Tropical Environment*, 5:56-63.
- Shone, M.G.T., D.T. Clarkson and J. Sanderson. 1969. The absorption and translocation of sodium by maize seedlings. *Planta (Berlin)*, 86:301.
- Silva-Robledo, H., M. Ortíz-Lizana y E. Acevedo-Hinojosa. 2007. Relaciones hídricas y ajuste osmótico en trigo. *Agrociencia*, 41:23-34.
- Silva, V.J., C.F. de Lacerda, P.H.A. da Costa, J.E. Filho, E.G. Filho and J.T. Prisco. 2003. Physiological responses of NaCl stressed cowpea plants grown in nutrient solution supplement with CaCl₂. *Brazilian Journal Plant Physiology*, 15:99-105.
- Singh, K.N. and R. Chatrath. 2001. Salinity tolerance. In: *Application of Physiology in wheat breeding*. Chapter 8. Reynolds, M.P., J.I. Ortíz-Monaterio and A. McNAB (eds.). CIMMYT. México, D.F. pp 101-110.
- Sing A., M.L. Saini and R.K. Behl. 2003. Screening of citrus rootstocks for salt tolerance in semi-arid climates-a review. *Topics*, 13:53-66.
- Sinha, B.K. and N.T. 1976. Salt distribution around roots of wheat under different transpiration rates. *Plant and Soil*, 44:141.
- Skeme, K.M. and M. Barlass. 1983. *In vitro* culture of abscised immature avocado embryos. *Annual Botany*, 52:667-672.
- Smith, G.S., K.R. Middleton and A.S. Edmonds. 1980. Sodium nutrition of pasture plants. 1. Translocation of sodium and potassium in relation to transpiration rates. *New Phytologist*, 84:603-612.
- Song, J.Q., X.R. Mei and H. Fujiyama. 2006. Adequate internal water status of NaCl-salinized rice shoots enhanced selective calcium and potassium absorption. *Soil Science and Plant Nutrition*, 52:300-304.
- Sotiropoulos, T.E. and K.N. Dimassi. 2004. Response to increasing rates of boron and NaCl on shoot proliferation and chemical composition of *in vitro* kiwifruit shoot cultures. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 79:285-289.
- Steward, G. and J. Lee. 1974. The role of proline accumulation in halophytes. *Planta*, 120:279-289.
- Storey, R. and R.R. Walker. 1999. Citrus and salinity. *Scientia Horticulturae*, 78:39-81.
- Suárez, I.E., R.E. Litz and J.D. Jaraba. 2004. Embriogénesis somática en tres cultivares de aguacate (*Persea americana* Mill). *Temas agrarios*, 9:32-40.

- Subbarao, G.V. and C. Johansen. 2002. Physiological mechanisms relevant to genetic improvement of salinity tolerance in crop plants. In: Handbook of Plant and Crop Physiology. Pp 857-880. Pessarakli, M., ed., Mercel Dekker Inc., New York.
- Subbarao, G.V. O.Ito, W.L. Berry and R.M. Wheeler. 2003. Sodium-A functional plant nutrient. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 22:391-416.
- Tajdoost, S., T. Farboodnia and R. Heidari. 2007. Salt pretreatment enhance salt tolerance in *Zea mays* L. seedlings. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 10:2086-2090.
- Tarakcioglu, C. and A. Inal. 2002. Changes induced by salinity demarcating specific ion ratio (Na/Cl) on osmolality in ion and proline accumulation, nitrate reductase activity, and growth performance of lettuce. *Journal of Plant Nutrition*, 25:27-41.
- Tawfik, A.A. 1997. *In vitro* selection for salt tolerance in Rosemary *Rosmarinus officinalis* L. *Assiut Journal of Agricultural Science*, 28:67-78.
- Tester, M. and R. Davenport. 2003. Na⁺ tolerance and Na⁺ transport in Higher Plants. *Annual of Botany*, 91:503-527.
- Ungar, I.A. 1996. Effect of salinity on seed germination, growth and ion accumulation of *Atriplex patula* (Chenopodiaceae). *Botanical Society of America*, 83:604-607
- United States Salinity Laboratory Staff. 1954. Diagnosis and improvement of saline and alkali soils. Riverside, CA. Agricultural Handbook. 60. 160 pp.
- Villa-Castoreña, M., E.A. Catalán-Valencia, M.A. Inzunza-Ibarra, A.L. Ulery. 2006. Absorción y traslocación de sodio y cloro en plantas de Chile fertilizadas con nitrógeno y crecidas con estrés salino. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 29:79-88.
- Vijayan, K. 2009. Approaches for enhancing salt tolerance in mulberry (*Morus* L.) –A review. *Plant Omics Journal*, 2:41-59.
- Vinocur, B. and A. Altman. 2005. Recent advances in engineering plant tolerance to abiotic stress: achievements and limitations. *Biotechnology*, 16:123-132.
- Volkow, V., B. Wang, P.J. Cominy, W. Fricke and A. Amtmann. 2003. *Thellungiella halophila*, a salt-tolerant relative of *Arabidopsis thaliana*, possesses effective mechanisms to discriminate between potassium and sodium. *Plant, Cell and Environmental*, 27:1-14.
- Wang, Z., B. Quebedeaux y G.W. Stutte. 1995. Osmotic adjustment: Effect of water stress on carbohydrates in leaves, stems and roots of apple. *Aust. J. Plant Physiology*, 22:747-754.

- Wang, W., B. Vinocur and A. Altman. 2003. Plant responses to drought, salinity and extreme temperature: towards genetic engineering for stress tolerance. *Planta*, 218:1-14.
- Wang, W., B. Vinocur, and A. Altman. 2003. Plant responses to drought, salinity and extreme temperature: towards genetic engineering for stress tolerance. *Planta*, 218:1-14.
- West, D.W. 1986. Stress physiology in trees-salinity. *Acta Horticulturae. Physiology of tree fruits*, 175:321-331.
- Whiley, A.W., J.S. Köhne, M.L. Arpia and G.S. Bender. 1990. Future prospects with new avocado cultivars and elite rootstocks. *South African Avocado Growers' Assoc. Yearbook*, 13:16-20.
- Whiley, A. B. Schaffer and B. Wostenholme. 2002. *The avocado: Botany, Production and Uses*. Wallingford, Cabi Publishing. Pp 24-30.
- Xu, W.F. and W.M. Shi. 2007. Mechanisms of salt tolerance in transgenic *Arabidopsis thaliana* constitutively overexpressing the tomato 14-3-3 protein TFT7. *Plant Soil*, 301:17-28.
- Yamaguchi T. y E. Blumwald. 2005. Developing salt-tolerant crop plants: challenges and opportunities. *Plant Science*, 10:615-620.
- Ye, Y., T. Fung-Yee, L. Chang-Yi y W. Yuk-Shan. 2005. Effects of salinity on germination, seedlings growth and physiology of three salt-secreting mangrove species. *Aquatic Botany*, 83:193-205.
- Yeo, A.R. 1998. Molecular biology of salt tolerance in the context of whole-plant physiology. *Journal Experimental Botanic*, 49:915-929.
- Yuan-Hsun, H. and Ch. Shuh-Chun. 1995. Anatomical responses in *Kandelia candel* (L.) Druce seedlings growing in the presence of different concentration of NaCl. *Botanical Bulletin of Academia Sinica*, 36:181-188.
- Zamora, H.A. 1997. VI Curso de aprobación fitosanitaria en el manejo de aguacate. Facultad de Agrobiología Presidente Juárez. Uruapán, Michoacán. pp 8.
- Zekri M. and L.R. Parsons. 1992. Salinity tolerance of citrus rootstocks. Effects of salt on root and leaf mineral concentrations. *Plant Soil* 147:171-181.
- Zikri, M. 1993. Salinity and calcium effects on emergence, growth and mineral composition of seedlings of eight citrus rootstocks. *Journal of Horticultural Science*, 68:53-61.

- Zeng, I. and M.C. Shannon. 2000. Effect of salinity on grain yield and yield components of rice at different seedling densities. *Agronomy Journal*, 92:418-423.
- Zhang, Y. 1994. Development of *in vitro* bioassays for determination of salinity tolerance in potato (*Solanum* spp). Ph.D. Dissertation, Department of Plant Science. McGill University. Montreal, Canada. pp 137.
- Zhao, L., F. Zhang, J. Guo, Y. Yang, B. Li and L. Zhang. 2004. Nitric oxide functions as signal in salt resistance in the calluses from two ecotypes of reed. *Plant Physiology*, 134:849-857.
- Zhao, G.Q., B.L. Ma, and C.Z. Ren. 2007. Growth, gas exchange, chlorophyll fluorescence, and ion content of Naked Oat in response to salinity. *Crop Science*, 47:123-131.
- Zhu, J.K. 2000. Genetic analysis of plant salt tolerance using *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology* 124:941-948.
- Zhu, J.K. 2001. Plant salt tolerance. *Trends Plant Science*, 6:66-71.
- Zhu, J.K. 2002. Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annual Review Plant Biology*, 53:247-273.
- Zhu, J.K. 2003. Regulation of ion homeostasis under salt stress. *Plant Biology*, 6:441-445.
- Zikri, M. 1993. Salinity and calcium effects on emergence, growth and mineral composition of seedlings of eight citrus rootstocks. *Journal of Horticultural Science*, 68:53-61.
- Zimmermann, R.C. 1983. Seasonal patterns in the productivity of a giant kelp (*Macrocystis pyrifera*) forest: The effect of nutrient availability. Ph. D. thesis. University So. California. 182 p.
- Zyalalov, A. 2004. Water flows in higher plants: physiology, evolution, and system analysis. *Russian Journal Plant Physiology*, 51:547-555.

VII. APÉNDICE

Cuadro 1A. Concentración de macro y micronutrientos contenidos en el medio Murashige and Skoog¹ (1962).

| MACRONUTRIMENTOS | MS ¹ | mgL ⁻¹ |
|------------------------------------|--|-------------------|
| Nitrato de potasio | KNO ₃ | 1900 mg |
| Nitrato de amonio | NH ₄ NO ₃ | 1650 mg |
| Sulfato de magnesio heptahidratado | MgSO ₄ .7H ₂ O | 370 mg |
| Fosfato de potasio | KH ₂ PO ₄ | 170 mg |
| Cloruro de calcio dihidratado | CaCl ₂ .2H ₂ O | 440 mg |
| EDTA de sodio | Na ₂ EDTA | 37.2 mg |
| Sulfato ferroso heptahidratado | Fe SO ₄ .7 H ₂ O | 27.8 mg |
| MICRONUTRIMENTOS | | |
| Ácido bórico | H ₃ BO ₃ | 6.2 mg |
| Sulfato manganeso tetrahidratado | MnSO ₄ .4H ₂ O | 22.3 mg |
| Sulfato de Zinc heptahidratado | ZnSO ₄ . 7H ₂ O | 8.6 mg |
| Yoruro de potasio | KI | 0.83 mg |
| Molibdato de sodio dihidratado | Na ₂ Mo O.2H ₂ O | 0.25 mg |
| Sulfato cúprico | CuSO ₄ .5H ₂ O | 0.025 mg |
| Cloruro de cobalto sexahidratado | CoCl ₂ .6H ₂ O | 0.025 mg |

Cuadro 2A. Significancia estadística, R², C.V. y Media general entre tratamientos de las variables evaluadas durante el desarrollo y sobrevivencia in vitro de ejes embrionarios de aguacate criollo y 'Hass' establecidos en NaCl.

| VARIABLE | Pr>F | R ² | C.V. | \bar{x} |
|------------------------|--------|----------------|------|-----------|
| Germinación (días) | 0.0001 | 0.688 | 84 | 20 |
| Germinación (%) | 0.0001 | 1.0 | 0 | 43 |
| Emergencia (días) | 0.0001 | 0.703 | 74 | 24 |
| Emergencia (%) | 0.0001 | 1.0 | 0 | 47 |
| Longitud de raíz (cm) | 0.0001 | 0.581 | 92 | 2.22 |
| Longitud de tallo (cm) | 0.0001 | 0.613 | 96 | 2.82 |
| Diámetro de raíz (mm) | 0.0001 | 0.578 | 97 | 0.98 |
| Diámetro de tallo (mm) | 0.0001 | 0.662 | 75 | 1.08 |
| Número de hojas | 0.0002 | 0.498 | 153 | 1 |
| Supervivencia (%) | 0.0001 | 1.0 | 0 | 63 |

Cuadro 3A. Significancia estadística, R², C.V. y Media general entre tratamientos de las variables evaluadas durante el desarrollo y sobrevivencia *in vitro* de ejes embrionarios de aguacate criollo y 'Hass' establecidos en CaCl₂.

| VARIABLE | Pr>F | R ² | C.V. | \bar{x} |
|------------------------|--------|----------------|------|-----------|
| Germinación (días) | 0.0358 | 0.328 | 85 | 31 |
| Germinación (%) | 0.0001 | 0.881 | 17 | 62 |
| Emergencia (días) | 0.020 | 0.430 | 66 | 34 |
| Emergencia (%) | 0.0001 | 0.994 | 4 | 73 |
| Longitud de raíz (cm) | 0.0043 | 0.406 | 74 | 2.92 |
| Longitud de tallo (cm) | 0.0095 | 0.379 | 79 | 4.39 |
| Diámetro de raíz (mm) | 0.1265 | 0.269 | 79 | 1.54 |
| Diámetro de tallo (mm) | 0.0188 | 0.354 | 67 | 1.64 |
| Número de hojas | 0.0133 | 0.367 | 121 | 2 |
| Supervivencia (%) | 0.0001 | 1.0 | 3.18 | 87 |

Cuadro 4A. Significancia estadística, R², C.V. y Media general entre tratamientos de las variables evaluadas durante el desarrollo y sobrevivencia *in vitro* de ejes embrionarios de aguacate criollo y 'Hass' establecidos en NaCl:CaCl₂.

| VARIABLE | Pr>F | R ² | C.V. | \bar{x} |
|------------------------|--------|----------------|-------|-----------|
| Germinación (días) | 0.0001 | 0.557 | 84.09 | 20 |
| Germinación (%) | 0.0001 | 0.984 | 9.22 | 56 |
| Emergencia (días) | 0.0008 | 0.458 | 90.37 | 24 |
| Emergencia (%) | 0.0001 | 0.996 | 4.97 | 52 |
| Longitud de raíz (cm) | 0.0001 | 0.547 | 77 | 2.68 |
| Longitud de tallo (cm) | 0.0002 | 0.493 | 96 | 3.54 |
| Diámetro de raíz (mm) | 0.0150 | 0.362 | 93 | 1.26 |
| Diámetro de tallo (mm) | 0.0002 | 0.496 | 83 | 1.24 |
| Número de hojas | 0.2683 | 0.226 | 148 | 1.45 |
| Supervivencia (%) | 0.0001 | 1 | 0 | 80 |

Cuadro 5A. Significancia de la fuente de variación de las variables durante el desarrollo y sobrevivencia *in vitro* de ejes embrionarios de aguacate criollo y 'Hass' establecidos en NaCl.

| Fuente de variación | Germ (días) | Germ (%) | Emerg (días) | Emerg (%) | Long R (cm) | Long T (cm) | Diám R (mm) | Diám T (mm) | Núm Hojas | Superv (%) |
|---------------------|-------------|----------|--------------|-----------|-------------|-------------|-------------|-------------|-----------|------------|
| Materiales | 0.0001 | 0.0001 | 0.0001 | 0.0001 | 0.0001 | 0.0001 | 0.0001 | 0.0001 | 0.0007 | 0.0001 |
| Conc. | 0.4728 | 0.0001 | 0.9708 | 0.0001 | 0.4028 | 0.1214 | 0.2742 | 0.0134 | 0.0344 | 0.0001 |
| Mat*Conc | 0.0001 | 0.0001 | 0.0001 | 0.0001 | 0.0032 | 0.0004 | 0.0007 | 0.0005 | 0.0094 | 0.0001 |

Cuadro 6A. Significancia de la fuente de variación de las variables durante el desarrollo y sobrevivencia *in vitro* de ejes embrionarios de aguacate criollo y 'Hass' establecidos en CaCl₂.

| Fuente de variación | Germ (días) | Germ (%) | Emerg (días) | Emerg (%) | Long R (cm) | Long T (cm) | Diám R (mm) | Diám T (mm) | Núm Hojas | Superv (%) |
|---------------------|-------------|----------|--------------|-----------|-------------|-------------|-------------|-------------|-----------|------------|
| Materiales | 0.0157 | 0.0001 | 0.0138 | 0.0001 | 0.0010 | 0.0762 | 0.0527 | 0.0782 | 0.5361 | 0.0001 |
| Conc. | 0.3760 | 0.0002 | 0.6503 | 0.0001 | 0.0791 | 0.0246 | 0.0871 | 0.0056 | 0.0008 | 0.0001 |
| Mat*Conc | 0.2463 | 0.0001 | 0.0042 | 0.0001 | 0.4326 | 0.0349 | 0.7349 | 0.2256 | 0.0739 | 0.0001 |

Cuadro 7A. Significancia de la fuente de variación de las variables durante el desarrollo y sobrevivencia *in vitro* de ejes embrionarios de aguacate criollo y 'Hass' establecidos en NaCl:CaCl₂.

| Fuente de variación | Germ (días) | Germ (%) | Emerg (días) | Emerg (%) | Long R (cm) | Long T (cm) | Diám R (mm) | Diám T (mm) | Núm Hojas | Superv (%) |
|---------------------|-------------|----------|--------------|-----------|-------------|-------------|-------------|-------------|-----------|------------|
| Materiales | 0.0001 | 0.0001 | 0.0001 | 0.0001 | 0.0001 | 0.0001 | 0.0088 | 0.0001 | 0.0859 | 0.0001 |
| Concentrac | 0.6688 | 0.0001 | 0.0908 | 0.0001 | 0.2112 | 0.1181 | 0.0759 | 0.0045 | 0.1414 | 0.0001 |
| Mat*Conc | 0.0036 | 0.0001 | 0.6422 | 0.0001 | 0.0432 | 0.0847 | 0.2818 | 0.4391 | 0.9180 | 0.0001 |

Cuadro 8A. Significancia estadística, R², C.V. y media general entre tratamientos de los parámetros de tolerancia a salinidad evaluados a las plántulas producidas vía ejes embrionarios de aguacate criollo establecidos *in vitro* en NaCl, CaCl₂ y NaCl:CaCl₂.

| VARIABLE | Pr>F | | R ² | | C.V. | | \bar{x} | |
|--|--------|--------|----------------|-------|-------|-------|-----------|---------|
| | Tallo | Raíz | Tallo | Raíz | Tallo | Raíz | Tallo | Raíz |
| Materia fresca (g) | 0.0099 | 0.0020 | 0.522 | 0.599 | 22.08 | 22.65 | 812.86 | 578.21 |
| Materia seca (g) | 0.0407 | 0.0398 | 0.438 | 0.439 | 20.26 | 27.95 | 128.57 | 85.71 |
| Contenido de agua (%) | 0.0044 | 0.0876 | 0.562 | 0.383 | 2.26 | 7.25 | 83.63 | 84.33 |
| Potencial hídrico (Mpa) | 0.0204 | 0.0530 | 0.481 | 0.420 | 26.77 | 51.63 | - 0.896 | - 1.265 |
| Potencial osmótico (Mpa) | 0.0261 | 0.0626 | 0.466 | 0.407 | 8.89 | 8.87 | - 0.990 | - 0.882 |
| Concentración de Prolina $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ mat. liofilizada | 0.0001 | 0.0001 | 0.985 | 0.982 | 6.34 | 6.64 | 8.23 | 3.357 |
| Concentración de Ca $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ materia seca | 0.0014 | 0.0124 | 0.747 | 0.644 | 5.45 | 5.45 | 1629.7 | 1268.85 |
| Concentración de Na $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ materia seca | 0.1039 | 0.0011 | 0.487 | 0.757 | 6.89 | 3.87 | 1295.88 | 1721.71 |