(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 134 133**

(21) Número de solicitud: 9700700

(51) Int. Cl.[6]: A01H 4/00

(12) SOLICITUD DE PATENTE A1

(22) Fecha de presentación: **04.04.97**

(43) Fecha de publicación de la solicitud: **16.09.99**

(43) Fecha de publicación del folleto de la solicitud: **16.09.99**

(71) Solicitante/s: **Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA)**
José Abascal, 56
28003 Madrid, ES
Dirección General Investigación y Formación Agraria. Consejería de Agricultura y Pesca. Junta Andalucía y
Universidad de Málaga

(72) Inventor/es: **Berceló Muñoz, Araceli y Pliego Alfaro, Fernando**

(74) Agente: **González Vacas, Eleuterio**

(54) Título: **Método para la micropropagación de aguacate (persea americana mill.) adulto.**

(57) Resumen:
Método para la micropropagación de aguacate (persea americana mill.) adulto.
El método comprende la multiplicación del material vegetal adulto procedente de árboles de aguacate en un primer medio de multiplicación líquido, y posteriormente en un segundo medio de multiplicación de doble fase, y el enraizamiento del material vegetal procedente de la multiplicación en el medio de doble fase en un primer medio de enraizamiento líquido y posteriormente en un segundo medio de enraizamiento sólido. Este procedimiento es útil para micropropagar árboles adultos de aguacate de forma reproducible. De aplicación en Agricultura.

ES 2 134 133 A1

DESCRIPCION

Método para la micropropagación de aguacate (*Persea americana* mill.) adulto.

Campo de la invención

Esta invención se refiere a un método para la micropropagación de aguacate (*Persea americana* Mill.) adulto mediante la alternancia adecuada de los medios necesarios para la multiplicación y el enraizamiento *in vitro* del material vegetal qué se desea propagar.

Antecedentes de la invención

El aguacate (*Persea americana* Mill.), que rinde unos frutos muy apreciados por su valor nutritivo, es una especie altamente heterozigótica, y su propagación mediante semilla provoca una gran variabilidad en el comportamiento en el campo.

Actualmente sólo es posible propagar vegetativamente genotipos seleccionados utilizando la técnica de Frolich (Frolich y Platt, 1972), que es larga y costosa, y además, los resultados finales son variables y dependen del cultivar utilizado (Fernández Galván y Galán Sauco, 1987).

No se conocen métodos que permitan la micropropagación de material adulto de aguacate, a pesar de que con material juvenil se han conseguido unos resultados satisfactorios (Cooper, 1987; Pliego-Alfaro y Murashige, 1987; Schall, 1987; Barceló Muñoz y col., 1990) que no han podido ser extrapolados al material adulto debido a problemas tales como contaminación y alta mortandad en la fase de inicio de los cultivos (Nel y col., 1983; Cooper, 1987), y falta de crecimiento del material en la fase de multiplicación, oxidación y necrosis apical (Harty, 1985; Cooper, 1987; Schall, 1987).

Sigue existiendo, por tanto, la necesidad de disponer de un método que permita propagar árboles seleccionados de aguacate, por ejemplo, árboles tolerantes a patógenos y a condiciones adversas de suelo y clima, o muy productivos, que supere los inconvenientes previamente mencionados. Esta necesidad puede solucionarse mediante el método objeto de esta invención que comprende la micropropagación de material vegetal procedente de árboles adultos de aguacate mediante la aplicación de unos tratamientos que aumentan el vigor de la planta madre y la alternancia adecuada de los medios de cultivo necesarios para la multiplicación y el enraizamiento *in vitro* del material vegetal que se desea propagar. Dicho método de micropropagación de aguacate es económico, reproducible, se beneficia de las ventajas de los cultivos *in vitro* y es susceptible de mecanización y automatización.

Descripción detallada de la invención

La invención proporciona un método para la micropropagación de aguacate (*Persea americana* Mill.) adulto que se caracteriza por:

- la utilización alternada de medio líquido y medio de doble fase para la multiplicación del material vegetal a propagar; y
- la utilización alternada de medio líquido y medio sólido para el enraizamiento de los brotes.

En general, dicho método comprende:

- obtener brotes de aguacate a partir de material vegetal del árbol de aguacate que se desea propagar;
- multiplicar porciones de los brotes previamente obtenidos en un primer medio de cultivo constituido por un medio de multiplicación líquido, y posteriormente en un segundo medio de cultivo constituido por un medio de multiplicación de doble fase; y
- enraizar el material vegetal procedente de la multiplicación en el medio de doble fase mediante cultivo en un primer medio de cultivo constituido por un medio de enraizamiento líquido, y posteriormente en un segundo medio de cultivo constituido por un medio de enraizamiento sólido.

El método proporcionado por esta invención comprende la realización de las tres etapas siguientes: inicio, multiplicación y enraizamiento que se describirán de forma más detallada a continuación.

1. *Inicio*

Los cultivos se inician a partir de material vegetal adulto del árbol de aguacate que se quiere propagar, por ejemplo, a partir de yemas o brotes basales en crecimiento activo del árbol a propagar. Tras eliminar las hojas, los brotes, de unos 20-25 cm de longitud, se desinfectan, se lavan y se dividen en secciones nodales de 1,5 cm aproximadamente, con una yema lateral. Dependiendo del tamaño de la yema se elimina un número variable de las hojas que la cubren, tras lo cual, las secciones nodales se vuelven a desinfectar y posteriormente, de forma aséptica, se lavan con agua estéril, se eliminan los extremos dañados por el desinfectante y se cultivan individualmente y en posición horizontal en tubos de ensayo (25 a 150 mm) con un medio de inicio tal como el descrito por Pliego-Alfaro y col., (Pliego-Alfaro y cols., 1987), bajo condiciones adecuadas y durante el periodo de tiempo apropiado para la generación de brotes.

2. *Multiplicación*

Finalizada la etapa de inicio, los brotes procedentes del material vegetal de partida se cortan en porciones pequeñas, de aproximadamente 1 - 1,5 cm, que se pasan a la etapa de multiplicación. La sección nodal inicial se puede volver a cultivar en medio fresco con el fin de obtener nuevas cosechas de brotes.

Esta etapa de multiplicación se realiza alternando dos tipos distintos de medios de multiplicación, concretamente:

- un primer medio de cultivo líquido, que se utiliza para reactivar y elongar el material que se desea multiplicar, y
- un segundo medio de cultivo de doble fase, al que pasan los brotes previamente elongados en el medio líquido anterior con el fin de completar la multiplicación.

Para la realización de esta etapa, los brotes se cultivan, en primer lugar, en el medio líquido, con agitación, por ejemplo, con un rotor, durante

un periodo de tiempo comprendido entre 1 y 4 semanas, normalmente unas 2 semanas, y a continuación, en el medio de doble fase, durante un periodo de tiempo comprendido entre 4 y 8 semanas, normalmente unas 6 semanas. Las condiciones de incubación pueden ser iguales a las descritas para la etapa de inicio. La composición de los medios de multiplicación es la siguiente:

Composición I

Medio de multiplicación líquido

Macro y microelementos de la formulación de Gamborg Fe-EDTA MS	
sacarosa	30 g/L
i-inositol	100 mg/L
tiamina-HCl	100 mg/L
piridoxina-HCl	50 mg/L
ácido nicotínico	50 mg/L
glicina	200 mg/L
benciladenina	0,3 mg/L

[MS: Formulación de Murashige y Skoog (véase el Ejemplo)]

[EDTA: Acido etilendiaminotetraacético]

Composición II

Medio de multiplicación de doble fase

Macro y microelementos de la formulación de Gamborg Fe-EDTA MS	
sacarosa	30 g/L
i-inositol	100 mg/L
tiamina-HCl	100 mg/L
piridoxina-HCl	50 mg/L
ácido nicotínico	50 mg/L
glicina	200 mg/L
agar (en el medio sólido)	6 g/L
benciladenina:	
en el medio sólido	0,65 mg/L
en el medio líquido	0,1 mg/L

[MS: Formulación de Murashige y Skoog (véase el Ejemplo)]

[EDTA: Acido etilendiaminotetraacético]

La formulación de Gamborg (Gamborg, 1966) es la siguiente:

Formulación de Gamborg

KNO_3	1.000 mg/L
$CaCl_2.2H_2O$	150 mg/L
$MgSO_4.7H_2O$	250 mg/L
$(NH_4)_2SO_4$	200 mg/L
KCl	300 mg/L
$Na_2HPO_4.2H_2O$	37,6 mg/L
$NaH_2PO_4.H_2O$	90 mg/L
Microelementos:	
$MnSO_4.4H_2O$	13,2 mg/L
$ZnSO_4.7H_2O$	3 mg/L
$CuSO_4.5H_2O$	0,25 mg/L
KI	0,75 mg/L
$CoCl_2.6H_2O$	0,25 mg/L
H_3BO_3	3 mg/L
$Na_2MoO_4.2H_2O$	0,25 mg/L

Finalizada la permanencia en el medio de doble fase se procede al enraizamiento de parte de los brotes y, si se desea, al sub-cultivo del resto del material que, en porciones de 1-1,5 cm, pasa al medio de multiplicación líquido para continuar la etapa de multiplicación.

3. *Enraizamiento*

Del material procedente de multiplicación en doble fase se escogen unos brotes de una longitud aproximada de 1,5-2 cm, que presenten, preferentemente, entrenudos largos y una buena superficie foliar.

Los brotes se mantienen, en primer lugar, en un medio de enraizamiento líquido con agitación, por ejemplo en un rotor, durante un corto periodo de tiempo, inferior a una semana, con el fin de inducir la formación de raíces o la elongación de las mismas, y después pasan a un medio de enraizamiento sólido en el que permanecen hasta haber enraizado. Las condiciones de incubación pueden ser las mismas que las descritas para la etapa de inicio. La composición de los medios de enraizamiento es la siguiente:

Composición III

Medio de enraizamiento líquido

Macroelementos de la formulación MS a un tercio de su concentración Fe-EDTA Microelementos MS	
sacarosa	30 g/L
i-inositol	100 mg/L
tiamina-HCl	100 mg/L
piridoxina-HCl	50 mg/L
ácido nicotínico	50 mg/L
glicina	200 mg/L
ácido indolbutírico	1 mg/L

[MS: Formulación de Murashige y Skoog (véase el Ejemplo)]

[EDTA: Acido etilendiaminotetraacético]

Composición IV

Medio de enraizamiento sólido

Macroelementos de la formulación MS a un tercio de su concentración Fe-EDTA Microelementos MS	
sacarosa	30 g/L
i-inositol	100 mg/L
tiamina-HCl	100 mg/L
piridoxina-HCl	50 mg/L
ácido nicotínico	50 mg/L
glicina	200 mg/L
carbón activado	1 g/L
agar	6 g/L

[MS: Formulación de Murashige y Skoog (véase el Ejemplo)]

[EDTA: Acido etilendiaminotetraacético]

El procedimiento para la micropropagación del aguacate adulto proporcionado por esta invención, se diferencia de los métodos de propagación vegetativa tradicional, representados por el método de Frolich (Frolich y Platt, 1972), y presenta todas las ventajas que caracterizan a los sistemas de propagación de plantas mediante cultivo *in vitro*: el proceso se inicia a partir de porciones muy pequeñas de material vegetal, y tiene capacidad para producir un gran número de plantas en un corto periodo de tiempo, necesitando para ello un espacio muy reducido y sin problemas de estacionalidad, entre otras ventajas.

Además de lo expuesto anteriormente, es importante señalar que la reducción de costes necesaria para que los sistemas de propagación mediante cultivo *in vitro* sean rentables comercialmente, incluye la mecanización y automatización de los sistemas de producción, y éstos van unidos a la utilización de medios líquidos y de doble fase (George, 1996), ya que suponen un incremento de las tasas de crecimiento y multiplicación, los medios pueden ser cambiados más fácilmente y, en consecuencia, son más fácilmente mecanizables. El método para la micropropagación de aguacate objeto de esta invención es un modelo que fácilmente podría modificarse para su automatización, y además existe la posibilidad de aplicarlo a otras especies leñosas que, como sucedía en el caso del aguacate, no han podido ser micropropagadas con éxito.

Por otra parte, actualmente, la única forma existente para atender la demanda de portainjertos seleccionados de aguacate (tolerantes a patógenos, a condiciones adversas de clima o suelo, o altamente productivos), es cara y no todos los portainjertos pueden ser propagados con éxito. Sin embargo, el procedimiento de micropropagación objeto de esta invención podría competir con los métodos de propagación vegetativa tradicionales, y, al igual que ya ocurre con otros portainjertos frutales, tales como el híbrido melocotonero-almendro GF677, la micropropagación de portainjertos de aguacate podría ser de interés para viveristas productores de planta. Por tanto, el método para la micropropagación de aguacate adulto objeto de esta invención puede ser una alternativa válida para la propagación de árboles seleccionados de aguacate.

El siguiente Ejemplo sirve para ilustrar una forma particular de realizar el procedimiento objeto de esta invención sin que deba ser considerado como limitativo del alcance de la misma.

Ejemplo

Micropropagación de aguacate

1. *Inicio*

Los cultivos se inician a partir de los brotes basales en crecimiento activo que se obtienen tras la poda a ras de suelo del árbol de aguacate (*Persea americana* Mill.) que se quiere propagar.

Tras eliminar las hojas, los brotes (de 20-25 cm de longitud) se sumergen durante 10 minutos en una solución de hipoclorito sódico (0,5 %) con Tween® 20 (1 gota/100 mL), se lavan con abundante agua corriente y se dividen en secciones nodales de aproximadamente 1,5 cm con una yema lateral. Dependiendo del tamaño de la yema se eliminan entre 2 y 4 de las hojas que la cubren, tras lo cual, las secciones nodales se desinfectan de nuevo con hipoclorito sódico a la misma concentración anterior y durante el mismo periodo de tiempo. Seguidamente, de forma aséptica, en el interior de una cabina de flujo laminar, las secciones nodales se lavan tres veces con agua estéril y, tras eliminar los extremos dañados por la lejía, se cultivan individualmente y en posición horizontal en tubos de ensayo (25 a 150 mm) con el medio de inicio (Pliego-Alfaro, F., López-Encina, C. y Barceló-Muñoz, A., 1987) que se menciona a continuación:

Medio de inicio

Macroelementos de la formulación MS a la mitad de su concentración	
Fe-EDTA	
Microelementos MS	
sacarosa	30 g/L
i-inositol	100 mg/L
tiamina-HCl	100 mg/L
piridoxina-HCl	50 mg/L
ácido nicotínico	50 mg/L
glicina	200 mg/L
benciladenina	0,3 mg/L
A-1296 agar (Sigma Chemical)	6 g/L

[MS: Formulación de Murashige y Skoog]

[EDTA: Acido etilendiaminotetraacético]

Formulación de Murashige y Skoog

NH_4NO_3	1.650 mg/L
KNO_3	1.900 mg/L
$CaCl_2.2H_2O$	440 mg/L
$MgSO_4.7H_2O$	370 mg/L
KH_2PO_4	170 mg/L
$FeSO_4.7H_2O$	27,84 mg/L
NaEDTA	37,24 mg/L
Micronutrientes:	
$MnSO_4.H_2O$	16,9 mg/L
$ZnSO_4.7H_2O$	8,6 mg/L
$CuSO_4.5H_2O$	0,025 mg/L
KI	0,83 mg/L
$CoCl_2.6H_2O$	0,025 mg/L
H_3BO_3	6,2 mg/L
$Na_2MoO_4.2H_2O$	0,25 mg/L

Las secciones nodales se incuban en dicho medio de inicio a 25°C (± 1°C), con una irradiancia de 45 μmol/m^{2}s suministrada por lámparas Gro-Lux de Sylvania, con un fotoperiodo de 16 horas. Al cabo de 6-8 semanas, las yemas de partida han dado lugar a unos brotes que, divididos en porciones de 1-1,5 cm aproximadamente, pasan a la etapa de multiplicación. La sección nodal inicial

se recultiva en medio de inicio fresco para obtener, al cabo de unas 4-6 semanas, nuevas cosechas de brotes.

2. *Multiplicación*

Las porciones de los brotes obtenidos en la etapa de inicio se cultivan, primero, en un medio de multiplicación líquido con agitación en rotor durante dos semanas y, a continuación, en un medio de multiplicación de doble fase en el que permanecen seis semanas más. Las condiciones de incubación en ambos medios son las mismas que las descritas para la fase de inicio. La composición de los medios de multiplicación corresponde a las identificadas como composiciones I y II indicadas en la descripción. Un ejemplo de agar que puede utilizarse en el medio de multiplicación de doble fase es el comercializado con la denominación A-1296 (Sigma Chemical).

Al cabo de 6 semanas de permanencia en el medio de multiplicación de doble fase se procede al enraizamiento de una parte de los brotes y al subcultivo del resto del material que, en porciones de 1-1,5 cm, pasa al medio de multiplicación líquido con agitación en rotor para continuar la fase de multiplicación.

3. *Enraizamiento*

Del material procedente de la etapa de multiplicación en doble fase se escogen unos brotes con una longitud de 1,5-2 cm aproximadamente, que presentan unos entrenudos largos y buena superficie foliar.

Los brotes se mantienen en el medio de enraizamiento líquido con agitación en rotor durante 3 días, pasando a continuación al medio de enraizamiento sólido, en el que permanecen hasta haber enraizado. La incubación se lleva a cabo en las mismas condiciones que las descritas para la fase de inicio. La composición de los distintos medios de enraizamiento corresponde a las identificadas como composiciones III y IV indicadas en la descripción. Un ejemplo de agar que puede utilizarse en el medio de multiplicación de doble fase es el comercializado con la denominación A-1296 (Sigma Chemical).

Una vez finalizado el proceso se observa que la micropropagación del aguacate ha resultado un éxito.

Referencias bibliográficas

1. Barceló Muñoz, A., F. Pliego Alfaro y J.M. Barea, 1990. Micropropagación de aguacate (*Persea americana* Mill.) en fase juvenil. Actas de Horticultura Vol. 1: 503-506.

2. Cooper, P.A., 1987. Advances in the micropropagation of avocado (*Persea americana* Mill.). Acta Horticulturae, 212 (II): 571-575.

3. Fernández Galván, D., y Galán Sauco, V., 1987. Adaptabilidad de distintos patrones de aguacate (*Persea americana*, Mill.) a la propagación clonal, En: Actas II Congreso S.E.C.H. Córdoba, España, 1986, pp: 51-58].

4. Frolich, E.F. y Platt, R.G., 1972. Use of the etiolation technique in rooting avocado cuttings. Ca. Avoc. Soc. Yrbk., 55: 97-109.

5. Gamborg, O.L., 1966. Aromatic metabolism in plants. II. Enzymes of the shikimate pathway in suspension cultures of plat cells. Can. J. Biochem., 44: 791-799. Citado en: Plant Culture Media, Vol. 1, Formulations and Uses, 1987. E.F. George, D.J.M. Puttock y H.J. George (eds.). Exegetics Ltd. Publ. England.

6. George, E.F., 1996. Plant Propagation by Tissue Culture, Part 2, In Practice, E.F. George (ed.) Exegetics Ltd. Publ. England.

7. Harty, P.A., 1985. Propagation of avocado by tissue culture: Development of a culture medium for multiplication of shoots. South African Avocado Growers Association Yearbook, 8: 70-71.

8. Nel, D.A., Kotzé, J.M. y Snyman, C.P., 1983. Progress in tissue culture of avocado. South African Avocado Growers Association Yearbook, 6: 90-01.

9. Pliego-Alfaro, F., López-Encina, C., y Barceló-Muñoz, A. 1987. Propagation of avocado rootstocks by tissue culture. S. Afr. Avocado Growers' Assoc. Yrbk, 10: 36-39.

10. Pliego-Alfaro, F., y Murashige, T., 1987. Possible rejuvenation of adult avocado by graftage onto juvenile rootstocks *in vitro*. HortScience, 22 (6): 1321-1324.

11. Schall, S., 1987. La multipliation de l'avocatier (*Persea americana* Mill. cv. Fuerte) par microbouturage *in vitro*. Fruits, 42 (3): 171-176.

REIVINDICACIONES

1. Un método para la micropropagación de aguacate (*Persea americana* Mill.) adulto que comprende:

- multiplicar material vegetal procedente de árboles de aguacate en un primer medio de cultivo constituido por un medio de multiplicación líquido, y posteriormente en un segundo medio de cultivo constituido por un medio de multiplicación de doble fase; y

- enraizar material vegetal procedente de la multiplicación en el medio de doble fase mediante cultivo en un primer medio de cultivo constituido por un medio de enraizamiento líquido, y posteriormente en un segundo medio de cultivo constituido por un medio de enraizamiento sólido.

2. Un método según la reivindicación 1, en el que el material vegetal procedente de árboles de aguacate se selecciona entre yemas y brotes basales en crecimiento activo del árbol de aguacate a propagar.

3. Un método según la reivindicación 1, en el que dicho medio de multiplicación líquido comprende la siguiente composición:

Composición I

Medio de multiplicación líquido

Macro y microelementos de la formulación de Gamborg Fe-EDTA MS	
sacarosa	30 g/L
i-inositol	100 mg/L
tiamina-HCl	100 mg/L
piridoxina-HCl	50 mg/L
ácido nicotínico	50 mg/L
glicina	200 mg/L
benciladenina	0,3 mg/L

[MS: Formulación de Murashige y Skoog (véase el Ejemplo)]

[EDTA: Acido etilendiaminotetraacético]

4. Un método según la reivindicación 1, en el que dicho medio de multiplicación de doble fase comprende la siguiente composición:

Composición II

Medio de multiplicación de doble fase

Macro y microelementos de la formulación de Gamborg Fe-EDTA MS	
sacarosa	30 g/L
i-inositol	100 mg/L
tiamina-HCl	100 mg/L
piridoxina-HCl	50 mg/L
ácido nicotínico	50 mg/L
glicina	200 mg/L
agar (en el medio sólido)	6 g/L
benciladenina:	
en el medio sólido	0,65 mg/L
en el medio líquido	0,1 mg/L

[MS: Formulación de Murashige y Skoog (véase el Ejemplo)]

[EDTA: Acido etilendiaminotetraacético]

5. Un método según la reivindicación 1, en el que los brotes del material vegetal a propagar se multiplican en el medio de multiplicación líquido, con agitación, durante un periodo de tiempo comprendido entre 1 y 4 semanas, y a continuación, en el medio de multiplicación de doble fase durante un periodo de tiempo comprendido entre 4 y 8 semanas.

6. Un método según la reivindicación 1, en el que dicho medio de enraizamiento líquido comprende la siguiente composición:

Composición III

Medio de enraizamiento líquido

Macroelementos de la formulación MS a un tercio de su concentración Fe-EDTA Microelementos MS	
sacarosa	30 g/L
i-inositol	100 mg/L
tiamina-HCl	100 mg/L
piridoxina-HCl	50 mg/L
ácido nicotínico	50 mg/L
glicina	200 mg/L
ácido indolbutírico	1 mg/L

[MS: Formulación de Murashige y Skoog]

[EDTA: Acido etilendiaminotetraacético]

7. Un método según la reivindicación 1, en el que dicho medio de enraizamiento sólido comprende la siguiente composición:

Composición IV

Medio de enraizamiento sólido

Macroelementos de la formulación MS a un tercio de su concentración Fe-EDTA Microelementos MS	
sacarosa	30 g/L
i-inositol	100 mg/L
tiamina-HCl	100 mg/L
piridoxina-HCl	50 mg/L
ácido nicotínico	50 mg/L
glicina	200 mg/L
carbón activado	1 g/L
agar	6 g/L

[MS: Formulación de Murashige y Skoog]

[EDTA: Acido etilendiaminotetraacético]

8. Un método según la reivindicación 1, en el que el material procedente de la multiplicación en el medio de doble fase se cultiva, en primer lugar, en un medio de enraizamiento líquido con agitación, durante un periodo de tiempo inferior a una semana, y después en un medio de enraizamiento sólido en el que permanece hasta haber enraizado.

OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) ES 2 134 133

(21) N.° solicitud: 9700700

(22) Fecha de presentación de la solicitud: **04.04.97**

(32) Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

(51) **Int. Cl.**[6]**:** A01H 4/00

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	PLIEGO-ALFARO, F. Development of an in vitro rooting bioassay using juvenile-phase stern cutlings of Persea americana Mill. Journal of Horticultural Science. 1988. Volumen 63, número 2, páginas 295-301.	1-8
A	PLIEGO-ALFARO, F. et al. Propagation of avocado rootstocks by tissue culture. South African Avocado Growers' Association Yearbook. 1987. Volumen 10, páginas 36-38.	1-8
A	PLIEGO-ALFARO, F. & MURA SHIGE, T. Possible rejuvenation of adult-avocado by graftage onto juvenile rootstocks in vitro. Hortscience. Diciembre 1987. Volumen 22, número 6, páginas 1321-1324.	1-8

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

[×] para todas las reivindicaciones

[ ] para las reivindicaciones n°:

Fecha de realización del informe	Examinador	Página
19.07.99	Fco. J. Haering Pérez	1/1