

EFECTO DE LA DESECACIÓN PARCIAL SOBRE LA GERMINACIÓN DE EMBRIONES ZIGÓTICOS INMADUROS DE AGUACATE

C. Sánchez-Romero¹, R. Perán-Quesada¹, B. Márquez-Martín¹, A. Barceló-Muñoz¹, F. Pliego-Alfaro²

¹ IFAPA. Cortijo de la Cruz s/n. 29140 Churriana, Málaga, España. cifacruz@olinet.es

² Dpto. de Biología Vegetal. Universidad de Málaga. 29071 Málaga, España. ferpliego@uma.es

RESUMEN

Se ha estudiado el efecto de diferentes modos y periodos de desecación sobre la germinación de embriones zigóticos inmaduros de aguacate. La desecación parcial en condiciones de alta humedad relativa tuvo efectos significativamente positivos al incrementar la germinación del 15% en embriones sin desecar al 73.33% en embriones desecados durante 14 días en medio B5m+cw. Además del porcentaje final de germinación, otros parámetros relacionados tales como el tipo de germinación y la calidad de las plántulas obtenidas, también se vieron claramente favorecidos por el proceso de desecación. Los mejores resultados se obtuvieron con embriones desecados en presencia de medio nutritivo; no obstante, los cambios observados no siempre pudieron ser correlacionados con variaciones en el contenido hídrico del embrión zigótico.

Palabras Clave: *Persea americana*, embriogénesis zigótica, contenido hídrico.

INTRODUCCIÓN

Durante su desarrollo el embrión zigótico pasa por las fases de histodiferenciación, maduración y desecación; en esta última fase, la pérdida de agua provoca una reducción general del metabolismo de la semilla (Kermode y col., 1986). Tras la hidratación en condiciones adecuadas se produce una reactivación de los sistemas metabólicos lo cual conduce a la germinación del embrión y al establecimiento de la plántula.

La desecación se encuentra entre dos fases metabólicas totalmente distintas, una claramente anabólica, caracterizada por la síntesis y acumulación masiva de productos de reserva y otra básicamente catabólica, en la que se produce la movilización de dichas sustancias para soportar el crecimiento y desarrollo de la nueva plántula. En base a esto, se ha propuesto que la desecación podría tener un papel importante en causar el cambio desde la fase de desarrollo a la fase germinativa (Bewley, 1995).

Aunque las semillas recalcitrantes, como es el caso del aguacate, son sensibles a la desecación (Farrant y col., 1993), lo cierto es que en ellas, al final del periodo de maduración, también tiene lugar una pérdida importante de agua (Sánchez-Romero y col., 2002). No obstante, nunca se alcanzan niveles tan bajos de contenido hídrico como en semillas ortodoxas ni se entra en estado de dormancia.

Estudios realizados a lo largo del desarrollo del embrión zigótico de aguacate han puesto de manifiesto que, en condiciones estándar, sólo se consiguen niveles aceptables de germinación en estadios muy avanzados de maduración (Perán-Quesada, 2001). La dificultad de reproducir dichos estadios en embriogénesis somática ha planteado la necesidad de buscar mecanismos que mejoren la conversión de los embriones somáticos actuando sobre factores que influyan directamente sobre la germinación de los mismos.

En este trabajo se ha llevado a cabo un estudio sobre el efecto de distintos tratamientos y periodos de desecación parcial sobre la germinación y posterior desarrollo de la plántula utilizando como modelo experimental embriones zigóticos inmaduros de aguacate.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron frutos de aguacate (cv. Hass) de 7-8 cm de longitud recolectados en la Estación Experimental "La Mayora" (Algarrobo, Málaga). Los frutos fueron desinfectados por inmersión durante 10 minutos en una solución de lejía comercial al 10% (v/v) con Tween 20 (1 gota/100 ml) y posteriormente enjuagados tres veces con agua destilada estéril. Los frutos desinfectados se cortaron longitudinalmente extrayendo los embriones zigóticos y seleccionando para la realización del experimento aquéllos con una longitud entre 16 y 22 mm.

La desecación parcial se llevó a cabo en una atmósfera con una humedad relativa del 97%. Estas condiciones se consiguieron utilizando como desecadores RITAs (Cirad, Francia) sin intercambio de aire con el exterior y con una solución saturada de K_2SO_4 en la base (Fig. 1A). Dos formas diferentes de desecación fueron testadas: incubación del embrión en placas de Petri sin medio de cultivo (Fig. 1B) o con 25 ml de medio MS (Murashige y Skoog, 1962) con los macronutrientes B5 (Gamborg y col., 1968) y suplementado con leche de coco al 10% (v/v) y 6 g l^{-1} de agar (B5m+cw) (Fig. 1C).

En cada una de las formas de desecación se probaron diferentes periodos de tiempo: 7, 14 y 21 días. Los controles consistieron en embriones sin desecar procedentes directamente del árbol.

Se cuantificaron las variaciones de peso fresco (PF) y peso seco (PS) experimentadas durante el proceso de desecación con y sin medio de cultivo. El peso seco se cuantificó tras permanecer los embriones en una estufa a $75 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 48 h. El contenido hídrico (CH) se determinó aplicando la fórmula $((\text{PF}-\text{PS})/\text{PF}) \times 100$. En cada tratamiento se realizaron un mínimo de 6 medidas.

El efecto de la desecación se evaluó sobre la capacidad de germinación de los embriones desecados y por consiguiente, 15 embriones procedentes de cada uno de los tratamientos, se pusieron a germinar, tras la eliminación parcial de los cotiledones, en medio M1 (Skene y Barlass, 1983).

En la fase de germinación se realizaron tres recultivos de 5 semanas cada uno y se tomaron datos de porcentaje de germinación, tipo de germinación (tallo, raíz o tallo y raíz) y longitud de las estructuras formadas al final de cada recultivo.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La evolución del peso fresco durante el proceso de desecación dependió de las condiciones en las que éste se llevó a cabo. El contenido hídrico disminuyó progresivamente en los embriones zigóticos desecados sin medio de cultivo alcanzándose una disminución del 3.23% tras 21 días de desecación. En los embriones desecados en medio de cultivo se produjo un ligero incremento del contenido hídrico, del 88.58% al 90.42%.

La desecación parcial en atmósfera de alta humedad relativa tuvo un efecto significativo sobre la capacidad de germinación. Así, se observó un aumento progresivo del porcentaje de germinación al aumentar el periodo de desecación obteniéndose los valores más altos a los 14 días (73.33%) (Tabla 1). Periodos de desecación más prolongados dieron lugar a una disminución de la germinación. La tendencia fue la misma tanto si la desecación se llevaba a cabo con o sin medio de cultivo. No obstante, los valores de germinación alcanzados fueron siempre más elevados cuando los embriones eran desecados en medio B5m+cw.

Embriones zigóticos sin desecar sólo desarrollaron tallos mientras que en todos los tratamientos de desecación se observó, en mayor o menor medida, germinación completa (tallo y raíz). Los mayores porcentajes de germinación completa (33.33%) se obtuvieron a los 14 días de iniciada la desecación (con y sin medio de cultivo).

Nuestro estudio pone de manifiesto que la desecación parcial en condiciones de alta humedad relativa promueve significativamente la germinación de embriones zigóticos inmaduros de aguacate. Se observa un efecto principal atribuible al proceso de desecación en sí y otro de menor influencia atribuible al modo en que éste se lleva a cabo (con o sin medio de cultivo). El efecto positivo de la desecación sobre la germinabilidad de embriones inmaduros se da a todos los niveles (mayor porcentaje de germinación final, mayor porcentaje de germinación completa y mayor calidad de las plántulas obtenidas) y siempre se ve potenciado por la presencia de medio nutritivo.

El papel regulador de la desecación como proceso desencadenante de la germinación ha sido previamente descrito por diferentes autores tanto en embriones zigóticos (Kermode y col., 1986) como en embriones somáticos (Roberts y col., 1989). Desecaciones parciales con pérdidas de agua muy pequeñas, del nivel de las registradas en embriones de aguacate desecados sin medio de cultivo (aproximadamente el 3%), han sido suficientes en otras especies como *Laurus nobilis* (Tako y col., 2002) o *Ricinus communis* (Kermode y Bewley, 1989) para incrementar significativamente la germinabilidad. Efectos tan patentes con variaciones tan pequeñas de contenido hídrico han sido explicados por una capacidad aparente de la desecación parcial de sustituir a tratamientos de desecación total o bien porque cambios más sutiles, resultantes en sólo pequeñas fluctuaciones del contenido hídrico, sean suficientes y no se requiera necesariamente un tratamiento radical que puede llegar a conducir a una rotura severa de la estructura o el metabolismo celular (Kermode y Bewley, 1989).

BIBLIOGRAFÍA

BEWLEY JD 1995. Physiological aspects of desiccation tolerance. A retrospect. International Journal of Plant Science 156: 393-403

FARRANT JM, BERJAK P, PAMMENTER NW 1993. Studies on the development of the desiccation-sensitive (recalcitrant) seeds of *Avicennia maina* (Forssk.) Vierh.: The acquisition of germinability and response to storage and dehydration. *Annals of Botany* 71: 405-410

GAMBORG, OL, MULLER RA, OJIMA K 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Experimental Cell Research* 50: 151-158

KERMODE AR, BEWLEY JD, DASGUPTA J, MISRA S 1986. The transition from seed development to germination: a key role for desiccation? *HortScience* 21:1113-1118

KERMODE AR, BEWLEY JD 1989. Developing seeds of *Ricinus communis* L., when detached and maintained in an atmosphere of high relative humidity, switch to a germinative mode without the requirement for complete desiccation. *Plant Physiology* 90: 702-707

MURASHIGE T, SKOOG F 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473-497

PERÁN-QUESADA R 2001. Embriogenesis *in vitro* de aguacate (*Persea americana* Mill.). Tesis Doctoral. Universidad de Málaga, España.

ROBERTS DR, FLINN BS, SUTTON BCS 1989. Desiccation promotes and synchronizes the germination of white spruce somatic embryos. *Plant Physiology* 89 (Suppl.) 49 (Abst.)

SÁNCHEZ-ROMERO C, PERÁN-QUESADA R, BARCELÓ-MUÑOZ A, PLIEGO-ALFARO F 2002. Variations in storage protein and carbohydrate levels during development of avocado zygotic embryos. *Plant Physiology and Biochemistry* 40: 1043-1049

SKENE KGM, BARLASS M 1983. In vitro culture of abscised immature avocado embryos. *Annals of Botany* 52: 667-672

TAKOS I, KONSTANTINIDOU E, MEROU TH 2002. The effect of desiccation on the seed germination of *Laurus nobilis* L. En: Thanos CA, Beardmore TL, Connor KF, Tolentino EL Jr (eds). *Tree Seeds 2002, Annual Meeting of IUFRO*. Chania Crete, pp 178-182

Figura 1: A) RITA con embriones zigóticos de aguacate (cv. Hass) a la semana de iniciada la desecación. B) Desecación sin medio de cultivo. C) Desecación en medio B5m+cw.



Tabla 1: Efecto de la desecación parcial sobre la germinación de embriones zigóticos inmaduros de aguacate (cv. Hass). Datos procedentes de 15 embriones por tratamiento.

Tratamiento	Germinación (%)
Control	15
Sin medio 7 días	26.67
Con medio B5m+cw 7 días	46.67
Sin medio 14 días	66.67
Con medio B5m+cw 14 días	73.33
Sin medio 21 días	26.67
Con medio B5m+cw 21 días	40