

EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA DE AGUACATE (*PERSEA AMERICANA* MILL. CV. HASS)

I. Vidales-Fernández¹, R. Salgado-Garciglia², M.A. Gómez-Lim³,
E. Ángel-Palomares² y H. Guillén-Andrade¹.

¹**Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y Agropecuarias, Campo Experimental Uruapan, Ave. Latinoamericana 1101, Col. Revolución, CP 60150, Uruapan, Mich., México. cefapuru@prodigy.net.mx;**

²**Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas, Facultad de Agrobiología, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Ciudad Universitaria, CP 58030, Morelia, Mich., México. rsalgado@zeus.umich.mx;**

³**Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Unidad de Biotecnología e Ingeniería Genética de Plantas. Apartado postal 629. Irapuato, Gto. México. mgomez@ira.cinvestav.mx**

RESUMEN

El cultivo *in vitro* de tejido nucelar de aguacate (*Persea americana* Mill. cv. Hass) y la subsecuente inducción de la embriogénesis somática fue desarrollada. Segmentos de tejido nucelar fueron colocados sobre un medio de cultivo con sales minerales MS, auxinas (picloram, AIB y 2,4-D) y suplementado con caseína hidrolizada. Ácido ascórbico y L-cisteína fueron probados para reducir necrosis en oscuridad y con baja intensidad de luz. La necrosis se redujo en un 100% con la inmersión del tejido nucelar en ácido ascórbico (400 mg/l) antes del cultivo *in vitro*. Un 20% de callo embriogénico desarrollo sobre medio de inducción con 2,4-D (1 mg/l) después de 50 días a 25°C en oscuridad. Sin embargo, los callos embriogénicos desarrollaron mejor en un medio adicionado con picloram (4 mg/l) y AIB (0.4 mg/l). La multiplicación del callo embriogénico fue obtenida en baja intensidad de luz y cultivado sobre medio sin reguladores por 4 semanas; los embriones maduraron sobre un medio endurecido con agar-agar 20 g/l y germinaron en un 10% bajo cultivo de dos fases: primero en un medio bajo en nitratos y sin reguladores, y posteriormente en medio MS con 0.3 mg/l de BA.

Palabras Clave: Aguacate, nucelas, embriogénesis somática y auxinas.

INTRODUCCIÓN

El aguacate en Michoacán, México presenta problemas graves por enfermedades principalmente con antracnosis (*Colletotrichum gloeosporioides*), roña (*Sphaceloma perseae*) y tristeza (*Phytophthora cinnamomi*), en casos extremos estas provocan la muerte del árbol o bien reducen la producción y calidad de la fruta hasta en un 14% (Vidales, 2001). La baja producción es un problema que la biotecnología puede solucionar a través de la transformación con genes resistentes, la selección clonal y mutagénesis; no obstante para utilizar estos mecanismos de mejoramiento genético *in vitro* se requiere el tener previamente el sistema de regeneración de una planta completa a través de embriogénesis somática u organogénesis adventicia (Villalobos y Thorpe, 1991). Éxito en embriogénesis somática en aguacate ha sido reportado con embriones cigóticos inmaduros (Mooney y Van Staden, 1987; Pliego-Alfaro y Murashige, 1988; Raviv et al., 1998 y Witjaksono y Litz, 1999a). Sin embargo, el establecimiento de este sistema con tejido nucelar de aguacate no está reportado. El cultivo *in vitro* de las nucelas frecuentemente presenta necrosis y por consecuencia pérdida de la competencia embriogénica; condiciones de obscuridad (etiología del tejido), ácido ascórbico y L-cisteína fueron identificados como importantes componentes para evitar la necrosis en tejidos inmaduros y ha sido reportado en aguacate (Zirari and Lionakis, 1994; Llano-Agudelo et al., 1995; Mohamed-Yasseen, 1995; Witjaksono and Litz, 1999a) y en varias especies vegetales (Litz, 1984a; Litz, 1984b; Rout et al., 1995; Jiménez, 1998; Ara et al., 1999). En el presente estudio, se presentan los efectos de algunos componentes para evitar necrosis de las nucelas, así como el efecto de los reguladores de crecimiento sobre la embriogénesis somática de *P. americana* cv. "Hass".

MATERIALES Y MÉTODOS

Las pruebas se llevaron a cabo en los laboratorios de cultivo de tejidos vegetales del Campo Experimental Uruapan – INIFAP y del Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas – Universidad Michoacana. Se utilizó tejido nucelar de aguacate cv. Hass, obtenido de frutos de 10 a 12 mm de diámetro.

Productos y procedimientos para evitar la necrosis-oxidación de la nucela

Para evitar la necrosis se probaron: cisteína 0 y 10 mg/l adicionada al medio de cultivo, ácido ascórbico 0 y 400 mg/l con inmersión del tejido durante 5 segundos antes de su establecimiento *in vitro* e incubación bajo luz con intensidad de $9.4 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$, con 16 horas de luz por 8 de obscuridad y obscuridad completa hasta la generación de callo embriogénico; en este experimento se aplicaron ocho tratamientos en total, al interaccionar los dos niveles de cada factor $2 \times 2 \times 2 = 8$. Se emplearon 25 nucelas por tratamiento en dos repeticiones, establecidas en tubos de ensayo de fondo plano de 95 x 25 mm, conteniendo medio de generación de callo embriogénico, formado con: sales minerales MS (Murashige y Skoog, 1962) 0.5 X, mioinositol 100 mg/l, ácido nicotínico 1 mg/l, piridoxina 1 mg/l, glicina 1 mg/l, tiamina 10 mg/l, caseína hidrolizada 200 mg/l, picloram 2 mg/l, sacarosa 30 g/l y agar-agar (Sigma®) 4.4 g/l, ajustando el pH a 5.7.

Componentes del medio de cultivo en la inducción de callo embriogénico, multiplicación y desarrollo, maduración y germinación de embriones somáticos

En la inducción de callo embriogénico se utilizó la concentración de sales minerales MS a 0.5X y/o 1X, y dosis de la auxina 2,4-D (0, 0.01, 0.05, 0.1, 0.5 y 1 mg/l) y combinaciones de las auxinas picloram-ácido indolbutírico (AIB) en dosis de 0-0, 1-0.1, 2-0.2, 4-0.4 y 2-0 mg/l. En el primer estu-

Se utilizaron de 7 a 12 nucelas por tratamiento y en el segundo de 10 a 20, inoculadas en tubo de ensayo de 150 x 24 mm. Una vez establecidas las nucelas en los medios de cultivo de los dos experimentos anteriores, se pusieron en obscuridad por 45 a 50 días, período después del cual se colocaron a luz con una intensidad de $9.4 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$, con 16 horas de luz por 8 de obscuridad; la temperatura se mantuvo constante a $25 \pm 2^\circ\text{C}$. En la multiplicación y desarrollo de embriones somáticos se evaluó en medio sólido y líquido la citocinina bencilaminopurina (BA) 0.11 mg/l, ácido giberélico (AG_3) 0.11 mg/l y picloram (0.1, 0.3, 0.6, 0.9 y 1 mg/l), el compuesto nitrogenado orgánico caseína hidrolizada (0, 200, 400, 600, 800 y 1000 mg/l), y el efecto de la luz indirecta y de la obscuridad. En la maduración de embriones se probó el efecto del ácido abscísico (ABA) a 0, 1, 2, 4 y 8 mg/l, sacarosa (30, 40, 50, 60, 70 y 90 g/l), agar-agar (Sigma®) 5, 6, 7, 8, 10, 11, 14, 20 y 30 g/l y manitol (70, 90, 110 y 130 g/l). En la germinación de embriones somáticos se evaluaron diferentes dosis de reguladores de crecimiento y procedimientos, la interacción BA- AG_3 (0.11-0.11, 0.11-0.24 y 0.11-0.36 mg/l), BA- AG_3 (0-0, 0.5-0, 1.25-0, 0.2-0.1 y 0.1-0.1 mg/l), barrido de reguladores BA (0, 0.3, 0.6 y 0.9 mg/l) – AIB (0, 0.03 y 0.06 mg/l), adenina (0, 25, 50 y 100 mg/l), inmersión temporal (12, 24, 48, 72 horas) e inmersión continua y prueba de sales de minerales de Anderson (1975) modificadas en nitratos y recultivo a los 90 días en medio MS con 0.3 mg/l de BA.

Variabes tomadas y análisis estadístico

Las variables tomadas fueron: porcentajes de necrosis-oxidación, formación de callo y germinación, diámetro en mm, color de callo, número de masas proembriónicas (MPs) y de embriones en sus diferentes fases: globulares (G), acorazonados (A), torpedos (T) y maduros (M); se evaluó viabilidad por observación directa en microscopio de epifluorescencia previa tinción con diacetato de fluoresceína. Con los datos se realizó análisis de varianza bajo diseños de bloques al azar y completamente al azar, al encontrar significancia se utilizaron las pruebas de medias: diferencia mínima significativa (DMS) y Tukey para determinar el mejor tratamiento.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Efecto del ácido ascórbico, cisteína y presencia de luz en la necrosis-oxidación del tejido nucelar

Cuando el tejido nucelar fue inmerso en solución de ácido ascórbico 400 mg/l y cultivado en medio MS e incubado en obscuridad o en baja radiación por 40 días, la necrosis-oxidación fue totalmente reducida (Figura a); en tanto que en los explantes del control se observó un 87.5% y 100% de necrosis en obscuridad y luz, respectivamente. La incorporación de L-cisteína (10 mg/l) al medio de cultivo no tuvo efecto sobre la reducción de la necrosis (Tabla 1). En ovulos de frutos inmaduros de Jaboticaba (Litz, 1984a), nucelas de mango (Litz, 1984b; Ara et al., 1999) y en embriones cigóticos inmaduros de aguacate (Witjaksono y Litz, 1999a) el ácido ascórbico fue efectivo para evitar la necrosis.

Inducción de callo embriogénico

Para inducir el callo embriogénico, el tejido nucelar fue inmerso en ácido ascórbico (400 mg/l) antes de su cultivo en varios medios e incubado en obscuridad a $25 \pm 2^\circ\text{C}$. Callo embriogénico fue producido en una baja frecuencia, pero desarrollo sobre medios diferentes: MS 0.5X con 2,4-D (1 mg/l), MS 0.5X adicionado con picloram (4.0 mg/l) y AIB (0.4 mg/l) y MS 0.5X suplementado con picloram (4 mg/l) y AIB (0.2 mg/l); no obstante que en el primer medio anterior se obtuvo un 20% de callo embriogénico, estos desarrollaron mejor en el segundo medio (Tabla 2). Estas frecuencias en embriogénesis somática son comparables con datos reportados en algunos cultivares de *P. americana*, desde 0 hasta 25% (Witjaksono y Litz, 1999a). En general, callo embriogénico fue cul-

tivado sobre el mejor medio de inducción en obscuridad por 8 semanas, y produjeron abundantes MPs (Figura 1b). Los callos mostraron un color blanco crema (a los 40 días) y conforme avanzó la fase de inducción (después de 10 días), los embriones declinaron en calidad, cambiando a un color café.

Multiplicación y desarrollo de embriones somáticos

Las MPs diferenciaron embriones después de tres semanas en medio basal MS, sin reguladores y solidificado con agar-agar (5g/l). Los embriones en fase temprana fueron compactos y bien desarrollados, de color blanco, continuaron creciendo hasta alcanzar la fase G (Figura 1c). La producción de embriones en estas condiciones fue observada en un año sin pérdida aparente en el potencial embriogénico del cultivo. También en medio líquido no se detectó respuesta al picloram y fue claro que al incrementar la dosis de esta auxina se disminuyó la viabilidad de los embriones (17.5%, con 1 mg/l de picloram) y la formación de MPs hasta 80% (Tabla 3), resultados que no coinciden con lo reportado por Money y Van Staden (1987) y Witjaksono y Litz (1999a). En el desarrollo de los embriones se observó respuesta positiva al utilizar caseína hidrolizada, con un incremento de manera significativa en el número de embriones A (Tabla 4).

Maduración de embriones somáticos

Se obtuvo un promedio de 0.66 y 0.76 M por caja de Petri (con 5 grupos de masas de embriones en fases G, A y T) con 1 y 2 mg/l de ABA, respectivamente, y un promedio máximo de 0.37 M con 50 g/l de sacarosa, sin encontrar diferencias entre los tratamientos probados. El efecto del agar-agar sobre la maduración fue importante al detectar hasta 1.96 M con una dosis de 20 g/l de agar, no se observaron diferencias con el tratamiento de 30 g/l, pero sí con 10 g/l. Los resultados anteriores coinciden con los obtenidos por Perán-Quesada *et al.* (1999) y Witjaksono y Litz (1999b) en cuanto al efecto del agente gelificante, pero no con la afirmación que elevadas concentraciones de sacarosa tienen un efecto positivo en la formación de M. Las dosis probadas en manitol provocaron alta necrosis del explante (90%) y no hubo M. Al endurecer el medio de cultivo con agar se provocó una reducción en la humedad relativa dentro de la caja de Petri, ambiente que propició una desecación lenta de los embriones somáticos y una condición de estrés que aceleró la maduración de estos, no obstante que a mayor concentración del agente gelificante el diámetro de los embriones somáticos fue menor, respuesta similar a lo observado por Witjaksono y Litz (1999b).

Germinación de embriones somáticos

Con las diferentes pruebas realizadas sobre reguladores de crecimiento en medio sólido o líquido, no se obtuvieron porcentajes aceptables de germinación, solamente en algunos tratamientos se observaron indicios de emisión de brotes o formación de raíces. Sin embargo, al establecer los M en medio de cultivo con sales de Anderson (1975) modificadas en nitratos (+25%), sin reguladores y recultivar éstos a los 90 días a medio MS con BA 0.3 mg/l se obtuvo un porcentaje del 10% de germinación a los 118 días de su establecimiento. Las investigaciones realizadas al respecto con otro germoplasma, mencionan porcentajes de 12% para emisión de brotes y de 1% en formación de brotes-raíces en un medio con 0.1 mg/l de Thidiazuron (TDZ) más 0.5 mg/l de AG_3 (Raviv *et al.*, 1998) o bien esta ha sido esporádica (Witjaksono y Litz, 1999b).

CONCLUSIONES

Esta investigación indica que a partir de tejido nucelar de aguacate cv. Hass se puede establecer el sistema de embriogénesis somática, se evita la necrosis de la nucela con el uso de ácido ascórbico y se genera callo embriogénico con las auxinas (2,4-D, picloram y AIB), al eliminar éstas fue

posible la multiplicación de MPs y la germinación de embriones somáticos, los cuales previamente deben cultivarse en medio de cultivo endurecido con agar y subcultivarlos en dos fases, la primera en medio sin reguladores y la segunda en presencia de la citocinina BA.

BIBLIOGRAFIA

ANDERSON, W.C. 1975. Propagation rhododendrons by tissue culture: Part. 1. Development of a culture medium for multiplication of shoots. Proc. Inter. Plant Prop. Soc. 25: 129-135.

ARA, H., JAISWAL, U. AND JAISWAL, V.S. 1999. Germination and plantlet regeneration from encapsulated somatic embryos of mango (*Mangifera indica* L.). Plant Cell Report. 19:166-170.

JIMÉNEZ, G.E.A. 1998. Cultivo de ápices y meristemos. In: Propagación y Mejora Genética de Plantas por Biotecnología. Instituto de Biotecnología de las Plantas. pp. 45-56.

LITZ, R.E. 1984A. *In vitro* somatic embriogénesis from callus of jaboticaba (*Myrciaria cauliflora*). Hortsci. 19(1): 62-64.

LITZ, R.E. 1984b. *In vitro* somatic embryogenesis from nucellar callus of monoembryonic mango. Hortsci. 19(5): 715-717.

LLANO-AGUDELO, B.E., GONZÁLEZ-ROSAS, H. AND SALAZAR-GARCÍA, S. 1995. *In vitro* culture of mature avocado embryos. Fruits, 50(1): 59-64.

MOHAMED-YASSEEN, Y. 1995. *In vitro* propagation of avocado (*Persea americana* Mill.). Calif. Avocado Soc. Yrbk. 79: 107-111.

MOONEY, P.A. AND VAN STADEN, J. 1987. Induction of embryogenesis in callus from immature embryos of *Persea americana*. Can. J. Bot. 65: 622-626.

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

PERÁN-QUESADA, R., SÁNCHEZ-ROMERO, C., BARCELÓ-MUÑOZ, A. Y PLIEGO-ALFARO, F. 1999. Efecto de la sacarosa, gelrite y ABA en el desarrollo de embriones somáticos de aguacate. XIII Reunión Nacional de la Sociedad Española de Fisiología Vegetal y VI Congreso Hispano Luso de Fisiología Vegetal.

PLIEGO-ALFARO, F. AND MURASHIGE, T. 1988. Somatic embryogenesis in avocado (*Persea americana* Mill.) *in vitro*. Plant Cell, Tiss. and Org. Cult. 12: 61-66.

RAVIV, A., AVENIDO, R.A., TISALONA, L.F., DAMASCO, O.P., MENDOZA, E.M.T., PINKAS, Y. AND ZILKAH, S. 1998. Callus and somatic embryogenesis of *Persea* species. Plant Tiss. Cult. and Biotech. 4 (3-4):196-206.

ROUT, G.R., SAMANTARAY, S. AND DAS, P. 1995. Somatic embryogenesis and plant regeneration from callus culture of *Acacia catechu* – a multipurpose leguminous tree. Plant Cell, Tiss. and Org. Cult. 42: 283-285.

VIDALES, F.J.A. 2001. Enfermedades. In: Tecnología para la producción de aguacate en México. SAGARPA. INIFAP. Libro Técnico 1:177-194.

VILLALOBOS, V.M. AND TORPE, V.T. 1991. Micropropagación: conceptos, metodología y resultados. In: Cultivo de tejidos en la agricultura: Fundamentos y aplicaciones. Editores W. M. Roca, L. A. Mroginski. CIAT, Cali, Colombia.

WITJAKSONO AND LITZ, R.E. 1999a. Induction and growth characteristics of embryogenic avocado cultures. *Plant Cell, Tiss. and Org. Cult.* 58: 19-29.

WITJAKSONO AND LITZ, R.E. 1999b. Maturation of avocado somatic embryos and plant recovery. *Plant Cell, Tiss. And Org. Cult.* 58: 141-148.

ZIRARI, A. AND LIONAKIS, S.M. 1994. Effect of cultivar, explant type, etiolation pretreatment and the age of plant material on the *in vitro* regeneration ability of avocado (*Persea americana*). *Acta Horticulturae* 365: 69-76.

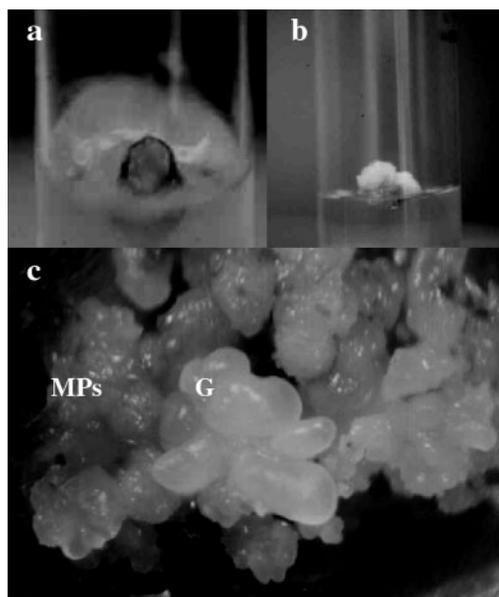


Figura 1. Inducción de callo embriogénico de aguacate (*Persea americana* Mill. cv. Hass): a, tejido nucelar sin necrosis; b, inducción de callos en tejido nucelar; c, masas proembriogénicas (MPs) y embriones somáticos en fase globular (G).

Tabla 1. Porcentajes de necrosis del tejido nucelar de aguacate (*Persea americana* cv. Hass).

Tratamientos	Obscuridad	Luz
	Porcentaje	
Sin antioxidantes	87.5	100
L-cisteína	91.5	79.16
Ácido ascórbico	0	0
L-cisteína-Ác. Ascórbico	4.15	3.8

Tabla 2. Porcentajes de formación de callo embriogénico en tejido nucelar de aguacate cv. Hass, color y tamaño de callos, en el medio donde las estructuras fueron formadas.

MS Concentración	Reguladores de crecimiento (mg/l)	Inducción de callos (%)	Color de Callos	Dímetro de callos (mm)
0.5X	Picloram-AIB 4 – 0.4	17.8	Blanco crema	13
0.5X	2,4-D 1	20	“	13
1X	Picloram-AIB 2 – 0.2	10	Café claro	13
1X	Picloram 2	10	“	8

Tabla 3. Número y porcentajes de viabilidad de estructuras embrionarias de aguacate cv. Hass en sus diferentes fases, por cada 10 ml de medio, a los 20 días de cultivo.

Tratamiento dosis de picloram (mg/l)	Número de estructuras embrionarias				Viabilidad (%)
	MPs	G	A	T	
0	29.5	12.5	4	4.5	85
0.1	13.5	12	2	1.5	80
0.3	6.5	6	1.5	0.5	35
0.5	13	10	4	0	45
0.7	8.5	8.5	2	0.5	55
1.0	6.5	10	2.5	0.5	17.5

Tabla 4. Número de estructuras embrionarias (globulares y acorazonados) en callos de aguacate cv. Hass, a los 20 días del establecimiento. Agrupamiento estadístico (Tukey $\alpha = 0.01$).

Tratamiento dosis de caseína (mg/l)	Número de estructuras embrionarias y agrupamiento estadístico		
	Globulares		Acorazonados
400	5.68	A	2.54 A
800	5.02	A	2.08 A B
600	4.58	A B	1.04 B C
0	4.20	A B	1.36 B
200	3.44	A B	1.72 A B
1000	0.88	B	0.2 C