

Criopreservación de germoplasma de aguacate

Vidales-Fernández, I.¹, Larios-Guzmán, A.¹, Tapia-Vargas, L.M.¹, Guillén-Andrade, H.², Villaseñor-Ramírez, F.¹

¹ Investigadores del Campo Experimental Uruapan, CIRPAC-INIFAP. Ave. Latinoamericana 1101, Colonia Revolución, Uruapan, Michoacán, México. CP. 60150. vidales.ignacio@inifap.gob.mx.

² Profesor-investigador de la Facultad de Agrobiología "Pdte. Juárez". Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Paseo Lázaro Cárdenas S/N, Uruapan, Michoacán, México.

Resumen

El rescate de germoplasma de aguacate es fundamental para iniciar los programas de mejoramiento genético en este frutal, además de evitar la erosión genética, se demanda como en cualquier especie el contar con la variabilidad que sirva de base en la búsqueda de genes que coadyuven en la formación de un excelente genotipo. La conservación y caracterización de las accesiones permite en principio guardar bajo condiciones controladas y sin riesgo de pérdida el germoplasma y por otra parte proporciona información sobre las características y genes de interés. Sin embargo, la conservación *ex situ* en campo resulta costosa, impráctica y expuesta a factores climáticos que podrían eliminar los buenos propósitos; como alternativa más segura es la conservación a través de métodos alternativos *in vitro* a corto-mediano plazo y la criopreservación a largo plazo. En este documento se presentan los avances y resultados de investigaciones en este último tópico.

Palabras clave: Germoplasma, mejoramiento genético, conservación *in vitro*, criopreservación.

Summary

The rescue of germplasm of avocado is essential for initiating programs for genetic improvement in this fruity, in addition to avoid genetic erosion, there is a demand as any species having the variability that will serve as a basis in the search for genes that will assist in the formation of an excellent genotype. The conservation and characterization of the accessions in principle allows save under controlled conditions and without the risk of losing the germplasm and on the other hand provides information on the characteristics and genes of interest. However, the *ex situ* conservation in the field is costly and impractical and exposed to climatic factors which could eliminate the good intentions; as a safer alternative is conservation through *in vitro* alternative to short-medium term and long-term cryopreservation. This paper presents the progress and results of research on this last topic.

Keys words: Germplasm, genetic improvement, *in vitro* conservation, cryopreservation.

Introducción

El aguacate por su tipo de polinización abierta (planta alógama) es un cultivo que presenta altos niveles de heterocigosis, tal como lo señala Litz *et al* (2009); originario de México y Centroamérica, que en su ambiente natural en bosques tropicales y subtropicales, se encuentra alta diversidad genética de aguacate y especies afines en estado silvestre (Ben Ya'acov *et al.*, 1992b), sin embargo está seriamente amenazada por factores de disturbio que propicia la especie humana, tales como: deforestación, incendios forestales, cambio de uso de suelo, sobrepastoreo y la utilización de variedades mejoradas y seleccionadas para su explotación comercial. El rescate de germoplasma es prioritario para iniciar los programas de mejoramiento genético en este frutal, la variabilidad que

durante cientos de años ha creado la selección natural hay que conservarla, caracterizarla y utilizar los genes de manera ordenada, con apoyo de la biotecnología.

En México existen diferentes instituciones que realizan esfuerzos serios para rescatar, conservar, caracterizar y utilizar el germoplasma de aguacate, en el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) y en la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, se realizan estas acciones tan importantes que permiten guardar en campo a través de Huertos Bancos de Germoplasma (HBG) el material colectado, además de caracterizarlo fenotípica y molecularmente, también se han realizado estudios sobre conservación *in vitro* a corto-mediano plazo y de criopreservación a largo plazo, esto debido a que la conservación ex-situ en campo resulta costosa, impráctica y de alto riesgo ante factores del ambiente. Es el propósito de este documento el presentar los avances y resultados de investigaciones realizadas en criopreservación de explantes de aguacate producidos *in vitro*.

Objetivos del mejoramiento genético

El Grupo Interdisciplinario de Investigación del INIFAP desde el año 1995 en su plan estratégico anotan que hay que trabajar en la variedad injertada para: reducir la alternancia en la producción, reducir porte y hábito de crecimiento, incorporar resistencia a plagas (trips, araña roja y cristalina, barrenador de hueso y ramas) y enfermedades (roña-*Sphaceloma persea* y antracnosis-*Colletotrichum gloeosporioides*), así como la resistencia a bajas temperaturas; y en el portainjerto resistencia a enfermedades (tristeza-*Phytophthora cinnamomi* y podredumbre blanca-*Rosellinia necatrix*), salinidad y suelos calcáreos. Indudablemente que estos factores bióticos y abióticos impactan directamente en la producción y calidad del aguacate.

Colecta y bancos de germoplasma

Desde 1993 se efectuaron recorridos por las áreas productoras de aguacate de las entidades federativas seleccionadas (24) de México. La caracterización de sitios se realizó tomando como guía la propuesta por IPGRI (Internacional Plant Genetic Resources Institute) con el auxilio de información de clima y suelos del INEGI (Instituto Nacional de Geografía e Informática), altímetro, y geoposicionador. Se caracteriza el área de colecta incluyendo información de clima, suelo, altitud, vegetación circundante, topografía, isoyetas, isotermas y otras características de interés. Actualmente se ha cubierto todo el país, se colectó en 118 municipios de México y además se cuenta con materiales sobresalientes de Colombia, Chile y Brasil; se tiene un total de 753 accesiones. Se han complementado colectas de aguacate de los estados de Michoacán, Nayarit, Nuevo León, Baja California, Oaxaca y Zacatecas, México.

Los árboles se trasplantaron al sitio que constituye el llamado huerto banco de germoplasma (HBG). En ese HBG, los materiales permanecerán individualizados para su caracterización agromorfológica. En el HBG existen materiales "pasivos", cuya única finalidad es la preservación de los genotipos, y materiales "activos" que proporcionarán copias genéticas para propósitos de evaluación y posteriormente mejoramiento de la especie.

Conservación *in vitro* de germoplasma a corto-mediano plazo

Una alternativa a las colecciones de campo es el establecimiento *in vitro* de estas bajo condiciones de crecimiento normales o limitadas. El cultivo de tejidos permite la propagación clonal rápida de un gran número de plántulas en un período breve, y la conservación de germoplasma, bajo condiciones controladas, en espacios pequeños y con poca mano de obra, además de la garantía de sanidad y estabilidad genética, lo que facilitaría enormemente el intercambio internacional de germoplasma (Banerjee y De Langhe, 1983; Withers, 1984).

Ángel (2003) con yemas axilares de la raza Mexicana (*Persea americana* var. *drymifolia*) evaluó espacios de crecimiento: tubos de ensaye (2.0 cm de diámetro x 15 cm de altura) con 10 ml de medio de cultivo, un recipiente de boca angosta, de 4.0 x 9.0 cm con 20 ml de medio, y otro de boca ancha, de 5.5 x 7.0 cm con 25 ml de medio, este último considerado como el testigo o control, ya que es el recipiente convencional de los cultivos *in vitro* (Figura 1), temperaturas (5°C y 25°C) e intensidades de luz (80, 880 y 2,200 luxes). Otra investigación con las yemas axilares de plántulas mantenidas en cultivos *in vitro* de la raza Mexicana, de tamaño de 5 a 10 mm aproximadamente, se colocaron en tubos de ensayo de 13 x 100 mm (diámetro por altura) que contenían el medio de cultivo MS sin bencilaminopurina (BA), de los diferentes tratamientos de medios mínimos (100, 50, 25 y 12.5% de sales minerales MS), Sacarosa (100, 75, 50 y 30 g/l), Manitol (7.5, 5.0, 2.5 g/l), ácido abscísico ABA (5, 1.0, 0.5 mg/l), estos tratamientos se incubaron en oscuridad continua y a temperaturas de 5 y 25°C.

En la conservación *in vitro* de yemas axilares de la raza Mexicana se encontraron diferencias significativas entre los espacios de crecimiento utilizados para este estudio de conservación, siendo los tubos de ensayo donde la brotación, número de brotes y longitud de éstos fue mínimo, objetivo de la conservación *in vitro*. La respuesta en temperatura señala que al incubar las yemas a 25°C son diferentes significativamente a los presentados al incubarse a 5°C lo cual indicó que la temperatura más baja (5°C) es adecuada para la óptima conservación de yemas axilares de aguacate, ya que permitió una inhibición en la brotación y no se presentó el desarrollo de éstos. La intensidad más baja de luz probada en este estudio, logró mantener latentes las yemas de aguacate, intención buscada en esta investigación, debido a que no hubo prácticamente brotación pero las yemas aún sobrevivieron este periodo de cultivo *in vitro*.



Figura 1. Brotes de aguacate en fase de multiplicación y cámara de crecimiento a una temperatura de 25°C y 2,200 luxes.

En el siguiente estudio con yemas axilares procedentes de vitro-plantas conservadas *in vitro* de la raza Mexicana se observó que en los medios de cultivo con 50 y 25% de sales minerales en temperatura de 5 y 25°C presentaron bajo porcentaje de necrosis y su crecimiento fue mínimo, no se afectó la viabilidad de estas después de 270 días de su conservación, lo cual se pudo comprobar al colocar las yemas conservadas en el medio de cultivo inductor de brotación, obteniéndose de 80 a 90% de brotación. Al determinar la influencia de medios mínimos, inhibidores del crecimiento y temperatura fue posible establecer un sistema de conservación *in vitro* de aguacate criollo Mexicano.

Valladares (2005) en tejido de la cruce de las razas Antillana (*P. americana* var. *americana*) x Guatemalteca (*P. americana* var. *guatemalensis*), observó el efecto de la concentración de sales minerales MS (100, 50, 25 y 12.5%), sacarosa (30, 60 y 100 g/l) y temperatura (5, 12.5 y 25°C) en la conservación *in vitro* del tejido, a los 50, 100 y 150 días después del establecimiento del cultivo se registró el número de brotes por explante, número de explantes con brotes, Longitud y calidad del brotes. Los resultados indican que a los 50 días las mejores condiciones para la preservación de las yemas fueron: temperatura de 12.5°C con 50% de sales minerales y una concentración de 30 g/l de sacarosa. A los 100 días las condiciones más favorables se presentaron a una temperatura de 12.5°C,

con una concentración de 100 y 50% de sales minerales MS y 60 ó 100 g/l de sacarosa (Figura 2). A los 150 días la combinación más adecuada que se obtuvo fue: temperatura de 12.5°C, 50% de sales minerales MS y 60 g/l de sacarosa.

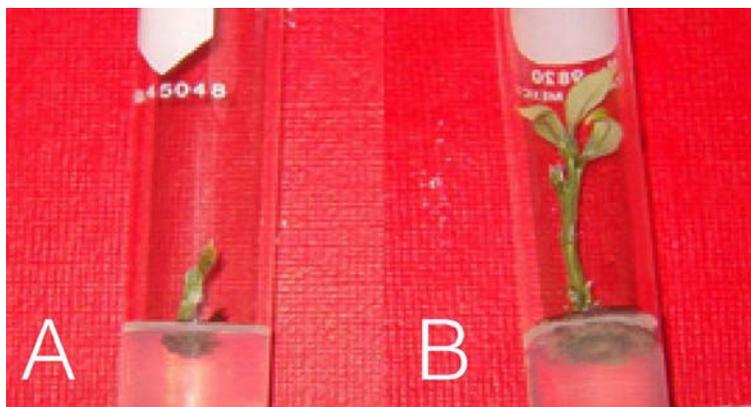


Figura 2. Efecto de la interacción entre la temperatura, concentración de sales y sacarosa a los 100 días después de establecidas las yemas axilares de aguacate Antillano x Guatemalteco. A) A 5 °C, sales MS al 25 % y 30 g/l B) A 12.5 °C, sales MS al 100 % y 60g/l.

Raya (2004) con masas proembriogénicas (MP) del cv Hass evaluó temperaturas (10, 15 y 25°C), concentraciones de sales minerales MS (100, 50 y 25%) y tipos y dosis de osmoregulador. A los 30, 65, 100 y 150 días después de la siembra se registro el número de MP's, embriones somáticos en etapa globular, corazón, torpedo y maduros. En la conservación de las MP's se determinó que a una temperatura de 15°C y una concentración de sales minerales al 50% con 30 g/l de sacarosa y 20 g/l de manitol se recuperan después de 150 días el mayor número de MP's por explante, no así en tratamiento normal donde cada 25 a 30 días se requiere el recultivo.

Criopreservación

La criopreservación es una técnica a largo plazo que se basa en la reducción y paro subsecuente de todas las funciones metabólicas de los explantes, incluyendo la división celular, ya que usualmente se utiliza nitrógeno líquido (-196°C); este es el método a elegir para resguardar un almacenamiento a largo plazo rentable y seguro de los recursos genéticos de las especies que tienen semillas recalcitrantes o se propagan vegetativamente (Panis, 2009). De esta manera el germoplasma puede ser almacenado y mantenido por períodos de tiempo virtualmente indefinidos y su estabilidad genética está garantizada (Villalobos y Engelmann, 1995). La criopreservación de embriones de aguacate es una posibilidad para la conservación a largo plazo (Efendi *et al.*, 2001).

Una alternativa para reducir la frecuencia del recultivo *in vitro*, el riesgo de contaminación y el costo, es el uso de la criopreservación, sin embargo para lograr un protocolo eficiente, se requiere en principio definir las técnicas más adecuadas, como es la deshidratación del tejido y el uso de sustancias crioprotectoras (Vidales *et al.*, 2007). Los estudios de criopreservación en México se han realizado con accesiones de las razas de aguacate Mexicana y Guatemalteca, se probaron precultivo *in vitro* en medios con sacarosa y brasinolide, procedimientos y tiempo de deshidratado de explantes y soluciones crioprotectoras; el parámetro más importante medido fue el promedio de supervivencia, adicionalmente de observaciones de tejido vivo con microscopio de epifluorescencias y electrónico.

Vargas (2006) con yemas axilares de colectas de las razas Guatemalteca y Mexicana (304-01 y 206-03), llevo a cabo estudios de criopreservación, evaluó: tiempo de deshidratado con aire estéril, soluciones crioprotectoras y procedimiento de congelación; el parámetro más importante fue promedio de supervivencia, adicionalmente se

realizaron pruebas de viabilidad química de las células por observación directa en microscopio de epifluorescencia previa tinción con diacetato de fluoresceína (Prueba FDA). No se logró tener éxito en la regeneración de brotes, sin embargo, se obtuvo información de la prueba de viabilidad; los explantes con menor tiempo de deshidratación mostraron un porcentaje de viabilidad bajo, por lo que es conveniente disminuir el contenido de agua del material vegetal para reducir los efectos de la formación de hielo en la congelación (Uragami *et al.*, 1990). Los resultados indican que el mejor tiempo de deshidratado fueron 120 minutos, ya que con este tratamiento los porcentajes de viabilidad (fluorescencia) fueron los más uniformes.

Vidales *et al* (2007) evaluaron 6 tiempos de deshidratado de yemas axilares de aguacate criollo raza Mexicana producidas *in vitro*, con aire estéril en campana de flujo laminar (30, 60, 90, 120, 150 y 180 minutos) y 2 soluciones crioprotectoras PVS2 (30% de glicerol + 15% de etilenglicol + 15 % DMSO+ medio con 0.4 M de sacarosa) y PVS4 (35% de glicerol+ 20% de etilenglicol + medio con 0.6 M de sacarosa). Los resultados indican que con 60 minutos de deshidratación y manteniendo las yemas en una solución PVS4 durante 30 minutos a 0°C se obtiene plantas con desarrollo normal, con brotes, hojas bien formadas de color verde oscuro y 100% de sobrevivencia a los 30, 45 y 60 días después de establecer las yemas en medio de brotación.

En un experimento posterior Vargas (2008) con brotes de aguacate criollo cultivados *in vitro*, fueron crecidos en un medio MS, suplementado con Brasinoesteroides (Brasinolide) en concentraciones de 0, 2, 4, 6, 8 y 10 mg/l y BA (0.5 mg/l), por un periodo de 25 días. Pasado este tiempo los brotes fueron deshidratados durante 60 minutos y colocados en viales conteniendo la solución PVS 4 y puestos a una temperatura de -20°C por una hora. Transcurrido este tiempo, fueron lavados con una solución de sales y sembrados en un medio de cultivo, bajo las mismas concentraciones y condiciones de crecimiento. Los resultados obtenidos demostraron claramente que las plantas que crecieron en el medio que contenía brasinoesteroides lograron sobrevivir después de ser tratadas a bajas temperaturas, siendo la concentración 4 mg/l la que mostró un mayor efecto sobre la sobrevivencia y la concentración de 8 mg/l la que influyó más en el crecimiento; en comparación con los brotes que fueron crecidos en el medio que contenía solamente BA (testigo), los cuales no lograron sobrevivir. Adicionalmente, las pruebas de microscopía electrónica demostraron un claro efecto en la preservación, la fisiología y la integración de los brotes crecidos y mantenidos en Brasinolide.

Conclusiones

Son grandes los esfuerzos realizados en la colecta y conservación de germoplasma de aguacate, no obstante, esta debe ser una actividad continua hasta asegurarse que se tenga colectada toda la diversidad genética existente. Actualmente ya se tiene establecido un sistema de conservación de explantes *in vitro* a corto-mediano plazo (300 días). En criopreservación de explantes de aguacate a la fecha resultan insuficientes las investigaciones para tener un protocolo óptimo, es necesario continuar con investigaciones sobre: precultivo de explantes en medios enriquecidos con sacarosa, procedimiento de congelación y descongelación, técnicas de vitrificación, encapsulación-deshidratación, y precultivo-deshidratación y encapsulación.

Reconocimientos

Los autores de este estudio reconocen a la Asociación de Productores y Empacadores Exportadores de Aguacate de Michoacán, A.C. (APEAM, A.C.) por su apoyo en el desarrollo y presentación de estas investigaciones.

Bibliografía

Ángel, P. M. E. 2003. Influencia de medios mínimos, inhibidores del crecimiento y temperatura en la conservación *in vitro* del germoplasma de aguacate (*Persea americana* Mill. var. *drymifolia*). Universidad de Colima. Tesis de Doctorado en Ciencias del área ciencias agrícolas y forestales. 123 p.

- Banerjee, N & De Langhe, E. 1983. A tissue culture method for rapid clonal propagation and storage under minimal growth conditions for *Musa*. *Plant Cell Reports*. 4: 351-354
- Ben Ya'acov, A., G. Buffer, A. Barrientos-Priego, E. de la Cruz-Torres & L. López-López. 1992a. A study of avocado germplasm resources, 1988-1990. I.- General description of the international project and its findings. *Proc. of Second World Avocado Congress* 1992. pp. 535-541.
- Ben Ya'acov, A., L. López-López, E. de la Cruz-Torres & A. F. Barrientos Priego. 1992b. A study of avocado germplasm resources, 1988-1990. II.- Findings from the central part of México. *Proc. of Second World Avocado Congress* 1992. pp. 543-544.
- Bergh, B. O. 1992. The origin, nature, and genetic improvement of the avocado. *Calif. Avocado Soc. Yearbook*. 76:61-75.
- Efendi, D., Litz, R. E. & Al Oraini, F. 2001. Cryopreservation of embryogenic avocado (*Persea americana* Mill.) cultures. In *Vitro Cell. Dev. Biol.* 37. 39 A (Abstract).
- Engelmann, Florent & Hiroko Takagi, editors. 200. Cryopreservation of tropical plant gerplasm. Current research progress and application. Japan International Research Center for Agricultural Sciences, Tsukuba, Japan / International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy. 496 p.
- INIFAP. 1995. Plan estratégico de investigación del cultivo del aguacate. Documento interno de trabajo. Campo Experimental Uruapan, Centro de Investigación Regional "Pacífico Centro"-INIFAP.
- IPGRI. 1995. Descriptors for avocado (*Persea spp.*). International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy. 1995, 52 p.
- Litz, R.E., Perea, A.I. & Suárez, P.I. 2009. Mejoramiento de aguacate en el siglo XXI. Memorias en extenso del III Congreso Latinoamericano del aguacate celebrado en Medellín, Colombia, del 11 al 13 de noviembre. Simposio Mejoramiento Genético. pp. 2-13.
- Panis, B. 2009. Crioconservación de germoplasma de *Musa*. 2ª. Edición. Guías técnicas No. 9 (F. Engelmann y E. Benson, eds). Bioversity International, Montpellier, Francia. 48 p.
- Raya, M. Y. A. 2004. Efecto de la temperatura, sales minerales y osmoreguladores sobre la conservación *in vitro* de masas proembriogénicas y embriones somáticos de aguacate (*Persea americana* Mill.) var. Hass. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Facultad de Agrobiología "Pdte. Juárez". Tesis de Licenciatura.
- Sakai, A., Kobayashi, S. & Oiyama, I. 1990. Cryopreservation of nucellar cells of navel orange (*Citrus sinensis* Osb. var. *Brasiliensis* Tanaka) by vitrification. *Plant Cell Reports* 9,30-33.
- Sakai, A. S. 1993. Cryopreservation of plant genetic resource. 6: 5-26.
- Sakai, A. 1995. Cryopreservation form germplasm collection in woody plants. Pp. 293-315. In: Jain, S., Gupta, P. and Newton, R. (Eds.), *Somatic embryogenesis in woody plants*, Vol. 1, Dluwer, Dordrecht.
- Sakai, A. 1997. Potentially valuable cryogenic procedures for cryopreservation of cultured plant meristems. Pp. 53-66. In: *Conservation of Plant Genetic Resources In Vitro*. Volume 1: General Aspects. M.K. Razdan and E.C. Cocking (eds.). Science Publishers Inc., Enfield, USA.
- Uragami A., A. Sakai & M.Magai. 1990. Cryopreservation of dried axillary buds from plantlets of *Asparagus officinalis* L. Grown *in vitro*. *Plant Cells Reports* 9, 328-331.
- Valladares, R. S. 2005. Conservación *in vitro* de yemas axilares micropropagadas de aguacate (*Persea americana* Mill.). Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Facultad de Agrobiología "Pdte. Juárez". Tesis de Licenciatura.

- Vargas, M., Rocha, C., Vidales, I. & Ángel, E. 2007. Uso de la brasinólida en la propagación *in vitro* y criopreservación de brotes de aguacate criollo. Resumen en la memoria del VI Congreso Mundial de la Palta, celebrado en Viña del Mar, Chile. p. 53.
- Vargas, V. M. 2006. Efecto fisiológico de brasinoesteroides y crioprotectores sobre yemas axilares de aguacate criollo producidas *in vitro*. Avances de investigación. Universidad Autónoma de Nayarit.
- Vargas, V. M. 2008. Efecto fisiológico de brasinoesteroides y crioprotectores sobre yemas axilares de aguacate criollo producidas *in vitro*. Tesis de Doctor en Ciencias. Universidad Autónoma de Nayarit.
- Vidales, F. I. 2002. Efecto de los reguladores de crecimiento en los procesos de organogénesis y embriogénesis somática de aguacate (*Persea americana* Mill.) Tesis Doctoral. Área Ciencias Agrícolas y Forestales. Universidad de Colima. Tecomán, Colima, México. 150 p.
- Vidales-Fernández, I., Rodríguez-Jiménez, J., Salgado-Garciglia, R., López-Gómez, R., Angel-Palomares, E. & Guillén-Andrade, H. 2007. Deshidratación y soluciones crioprotectoras de aguacate criollo (*Persea americana* Mill. var. *drymifolia*) producidas *in vitro*. Resumen en la memoria del VI Congreso Mundial de la Palta, celebrado en Viña del Mar, Chile. p. 59.
- Villalobos-Arámbula, V. M. & Engelmann, F. 1995. Ex situ conservation of plant germoplasm using Biotechnology. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 11:376-382.
- Withers, L. A. 1984. Germoplasm conservation *in vitro*: present state of research and its applications. In crop genetic resources: conservation and evaluation. Ed. by J. H. W. Holden, J.T. Williams. London, George Allen & Unwin, pp 139-157