

CULTIVO *IN VITRO* DE EMBRIONES MADUROS E INMADUROS DE AGUACATERO (*Persea americana* Mill.)¹

In vitro culture of mature and immature embryos of avocado (*Persea americana* Mill.)

Narciso N. Rodríguez M.², Víctor Fuentes F.³, Olga L. Rodríguez S.² y Mario Alvarez B.²

S U M M A R Y

Immature and mature embryos from different cultivars of avocado (*Persea americana* Mill.) were cultivated in Murashige and Skoog (1962) basal medium supplemented with BA (0,5 mg/L) in one treatment and with BA (0,5 mg/L) and GA₃ (0,5 mg/L) in another.

Best results were obtained with immature embryos got from fruits of more than 30 mm long in the medium containing GA₃. Between 3 and 10 shoots/embryo were obtained, from 2 to 5 cm high.

A 30-40% of the shoots developed roots when they were subcultured to a MS basal medium with the addition of 2 mg/L IBA and activated charcoal (0,5%).

Well developed normal plants were obtained when mature embryos, dissected with part of the cotyledon, were subcultured to a Dixon and Fuller (1976) medium without the addition of growth regulators. By adding activated charcoal (0,5%) a better growing up as well as a well structured radical system were warranted.

INTRODUCCIÓN

El aguacatero o palto (*Persea americana* Mill.) es uno de los frutales que tiene gran importancia en Cuba, debido fundamentalmente al amplio consumo de sus frutos en estado fresco, y a sus posibilidades de comercialización. El desarrollo de programas de mejoramiento en este frutal en Cuba, impone la necesidad de realizar trabajos de micropropagación en esta especie, para lograr un método de multiplicación vegetativa; así como del cultivo de embriones maduros e inmaduros con vistas a asegurar proyectos de cruzamiento y selección, debido a la gran cantidad de frutos que se pierden durante la fase de cuajado, y además para preparar patrones *in vitro* que permitan microinjertar cultivares de introducción. Investigaciones en esta dirección se están llevando a cabo en diferentes países donde se realiza este cultivo: Australia (Skene y Barlass, 1983); España (Pliego *et al.*, 1986); Estados Unidos (Pliego y Murashige, 1987); México (González-Rosas

et al., 1991 a, b); y Cuba (Rodríguez *et al.*, 1992, 1993, 1995).

El presente trabajo tiene como objetivo desarrollar la técnica de cultivo de embriones maduros e inmaduros de aguacatero, con vistas a asegurar los programas de introducción de material foráneo y de mejoramiento genético en este frutal.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se colectaron frutos pequeños (1,0 - 24,0 g) de diferentes cultivares de *Persea americana* Mill.: Hass, Suardía Estación, Catalina y Jaruco N° 1, que se encontraban en la colección de la Estación Nacional de Frutales, Alquizar, bajo régimen de polinización libre. Los frutos se llevaron al laboratorio, se lavaron con detergente y agua corriente y se sumergieron en etanol al 96% para ser flameados en la cámara de flujo laminar previo a la extracción de los embriones.

Se extrajeron los embriones adjunto a los cotiledones y se colocaron en el medio básico propuesto por Murashige y Skoog (1962) diluido al 50% (MS1/2), suplementado con 0,5 mg/L de benciladenina (BA) y de 0,5 mg/L de BA y de ácido giberélico (GA₃).

¹Recepción de originales: 28 de octubre de 1996.

²Estación Nacional de Frutales. Carretera de Pestana km 21/2, Alquizar, La Habana, Cuba.

³Instituto de Investigaciones Fundamentales en Agricultura Tropical "Alejandro de Humboldt", Santiago de las Vegas, Ciudad de La Habana, Cuba.

respectivamente. Se utilizó medio líquido y los embriones en número variable de acuerdo con su disponibilidad. (Cuadro 1). Se colocaron sobre soportes de papel de filtro.

Cuando comenzaron a separarse, los cotiledones se extrajeron, y la mitad que contenía el embrión se subcultivó al mismo medio, para facilitar la absorción de nutrientes por parte del mismo.

Se evaluó el número de embriones contaminados por hongos y bacterias, los muertos, los latentes y los que crecieron en cada caso. Donde se detectó crecimiento se determinaron el número y la longitud de los brotes emitidos. Además se realizaron mediciones cualitativas a los cultivos.

A los 45 días de cultivo, los brotes se subcultivaron a un medio sólido de Murashige y Skoog (1962) (MS) suplementado con 2,0 mg/L de ácido indol butírico (AIB). Se consideró la adición o no de carbón activado (0,5%). A los 45-60 días de cultivo se evaluó el número de brotes enraizados.

Además, se excindieron 10 brotes y se injertaron *in vivo* sobre patrones que crecieron bajo condiciones de aislamiento. Las plantas injertadas se mantuvieron a un régimen de alta humedad relativa y a una temperatura de 25 ± 2 °C.

Por otra parte se tomaron semillas de frutos maduros y se sometieron al mismo método de desinfección superficial descrito anteriormente. Seguidamente se extrajeron los embriones con una porción pequeña de cotiledón y se cultivaron en los mismos medios de cultivo empleados para embriones inmaduros, pero en estado sólido. Después de 45 días los brotes emitidos se subcultivaron a un medio MS con 2,0 mg/L de AIB y con la adición o no de carbón activado (0,5%).

Con vistas a obtener plántulas completamente conformadas, se cultivaron embriones maduros en los medios MS (Testigo) y de Dixon y Fuller (1976) (DF) (citado por Harty, 1985) sin reguladores del crecimiento y considerando la adición o no de carbón activado al 0,5%. A los 35 días de cultivo se evaluó el número de embriones que crecieron, y en cada tratamiento se determinó la altura de las plántulas (en mm), la longitud de la raíz principal (en mm), el diámetro a nivel del cuello (en mm), el número de hojas y el número de raíces secundarias. Los datos obtenidos se procesaron directamente exceptuando el número de hojas y el número de raíces secundarias que se transformaron a $(x)/2$ y a $(x + 0,5)/2$, respectivamente, mediante un análisis de varianza simple, siguiendo un diseño de bloques al azar con 7 réplicas. Las réplicas estuvieron constituidas por 4 frascos de

cada una. Las medias se compararon a través de la prueba de rangos múltiples de Duncan (1960).

A todos los medios de cultivo se les añadieron 30 g/L de sacarosa y el pH se ajustó a $5,7 \pm 0,1$, y cuando se utilizó medio sólido se agregaron 7 g/L de agar-agar. En todos los casos la esterilización se realizó en autoclave a 121 °C y a una presión de 1,5 atmósferas durante 15 minutos.

Los cultivos se mantuvieron a una temperatura de 27 ± 1 °C y a un fotoperíodo de 16 horas luz y 8 de oscuridad, con lámparas de luz blanca de 40 watts. Los brotes enraizados y las plántulas obtenidas se adaptaron a condiciones *ex vitro* en un sustrato compuesto por tierra y materia orgánica en la proporción de 1:1, con un régimen de alta humedad relativa y a 25 ± 2 °C.

RESULTADOS

En el Cuadro 1, se exponen los resultados obtenidos al considerar los embriones inmaduros cultivados en ambos medios de cultivo. Se detectó un porcentaje de contaminación relativamente alto debido fundamentalmente a la presencia de bacterias en los frutos colectados.

Se observa que el porcentaje de embriones establecidos es bajo, si se toma en consideración el total cultivado *in vitro*; sin embargo, los que se mantuvieron latentes, y donde sólo se observó un engrosamiento de los cotiledones, son reducidos. La respuesta fue superior en el medio que contenía GA_3 , pero en ambos se detectó la emisión de tres a 10 brotes por inóculo, que pueden llegar a tener entre dos y cinco centímetros aproximadamente, y con la presencia de hojas con la lámina foliar reducida. En embriones maduros hubo una respuesta similar en el 60% de los cultivos.

Se pudo constatar que los embriones provenientes de frutos de una masa menor de 10 g, o lo que es equivalente, de una longitud de 30-40 mm, prácticamente no responden en ninguno de los medios empleados.

El subcultivo a un medio sólido de MS con 2,0 mg/L de AIB y con la adición de carbón activado (0,5%) provocó el 33,8% de enraizamiento en los brotes provenientes de embriones inmaduros. Cuando se emplearon brotes obtenidos a partir de embriones maduros se alcanzó el 40,15% de enraizamiento.

Se pudo comprobar además, que el injerto *in vivo* de los brotes sobre patrones que crecieron bajo condiciones de aislamiento fue exitoso en el 70% de los casos.

CUADRO 1. Influencia del medio de cultivo sobre el comportamiento in vitro de embriones inmaduros de *Persea americana* Mill.

TABLE 1. Effect of the media on the in vitro culture of *Persea americana* Mill. immature embryos

Cultivar	Total de contaminados (%)			Muertos (%)	Latentes (%)	Con brotes (%)
	Embriones	Hongo	Bacteria			
Medio: MS(50%)* + 0,5 mg/L BA						
Hass	161	4,34	16,14	47,00	1,97	30,55
Suardía Estación	22	0,00	47,74	16,63	2,00	33,63
Catalina	25	0,00	48,00	32,00	0,00	20,00
Medio: MS(50%) + 0,5 mg/L BA + 0,5 mg/L GA ₃						
Jaruco Nº 1	25	0,00	23,33	28,20	1,80	46,67
Suardía Estación	27	0,00	24,44	35,03	2,00	38,53
Catalina	27	3,00	26,00	29,62	2,86	38,51

*MS(50%): Medio de Murashige y Skoog (1962) a la mitad de su concentración.

Por otra parte, el cultivo de embriones maduros en los medios de MS y de DF, sin la adición de reguladores del crecimiento y con el suplemento o no de carbón activado (0,5%), demostró resultados alentadores. En todos los casos se formaron plántulas en más del 80% de los cultivos.

En el Cuadro 2 se muestran los resultados obtenidos producto de las mediciones de las cinco variables evaluadas. Como puede apreciarse, en tres de ellas se detectaron diferencias significativas entre tratamientos. Ellas son la altura, la longitud de la raíz y el número de raíces secundarias. Los mejores resultados se obtuvieron en el medio DF suplementado con carbón activado. También en el medio MS con

carbón activado se obtuvieron resultados alentadores, pero el desarrollo del sistema radical fue más pobre.

DISCUSIÓN

La implementación de la técnica de cultivo de embriones de aguacatero o palto, responde a diferentes problemas de orden práctico que se presentan en el campo del mejoramiento genético de este frutal. La producción de híbridos a través de polinizaciones dirigidas se ve afectada por la gran cantidad de frutos que se pierde en la fase de cuajado, de ahí la importancia que presenta el cultivo de embriones

CUADRO 2. Influencia de los medios de cultivo sobre el crecimiento in vitro de embriones maduros de *Persea americana* Mill.

TABLE 2. Effect of the media on the in vitro growth of *Persea americana* Mill. mature embryos

Variables	Tratamientos				E.S.	C.V.(%)
	MS		DF			
	+CA	-CA	+CA	-CA		
Altura (mm)	42,4 a	31,5 c	40,7 a	37,2 b	4,1*	10,86
Diámetro a nivel del cuello (mm)	1,92	1,86	1,62	1,77	0,1	3,87
Número de hojas	12,3	11,6	12,6	11,4	0,2	5,53
Longitud de la raíz (mm)	103,1 b	128,9 a	131,7 a	105,0 b	8,4*	7,20
Número de raíces secundarias	1,66 b	0,00 d	3,78 a	0,44 c	0,1*	0,18

MS: Medio de Murashige y Skoog (1962).

DF: Medio de Dixon y Fuller (1976).

+CA: Con carbón activado (0,5 mg/L).

-CA: Sin carbón activado.

inmaduros para salvar genotipos deseados. En este caso, el trabajo desarrollado logró una vía para solucionar parcialmente este problema, a través del cultivo *in vitro* de embriones inmaduros de diferentes cultivares, resultados que coinciden con los de Skene y Barlass (1983) y Rodríguez *et al.* (1993, 1995), garantizando la aparición de brotes múltiples con la adición de BA en el medio de cultivo. Se comprobó que el GA₃ provoca además un efecto positivo en los primeros estadios del desarrollo de los mismos, resultados que coinciden con los de Nel y Kotze (1982), para el cultivo *in vitro* de embriones de esta especie, así como con Capote *et al.* (1992), quienes plantean que para llevar a cabo la micropropagación del aguacatero es aconsejable el empleo de este regulador del crecimiento durante la fase de establecimiento *in vitro*.

Dos de los inconvenientes de esta técnica son la alta tasa de contaminación por bacterias que presentan los frutos pequeños que se desprenden de los árboles, y el hecho de que los frutos de dimensiones muy pequeñas (de menos de 30 mm de longitud) no responden a ella. Skene y Barlass (1983), lograron el 60% de los cultivos sólo en frutos de 100 días de formados, lo que confirma los resultados obtenidos.

El cultivo *in vitro* de embriones maduros se ha empleado a su vez para la selección de genotipos resistentes a la salinidad (González-Rosas *et al.*, 1991b); para preparar patrones para microinjetar ápices *in vitro* con vistas al saneamiento (De Lange, 1985); y para el rejuvenecimiento de cultivares como paso previo a la micropropagación (Pliego *et al.*, 1986; Pliego y Murashige, 1987).

La obtención de plántulas *in vitro* a partir de embriones maduros puede lograrse en el medio MS o pre-

ferentemente en el DF sin suplemento de reguladores del crecimiento y con la adición de carbón activado (0,5%). Ambos medios se han empleado con éxito en el cultivo de tejidos de aguacate (Nel y Kotze, 1982; Pliego *et al.*, 1986; Harty, 1985; Capote y Blanco, 1992), sin embargo, en este caso el medio DF ofrece mejores resultados debido posiblemente a la disminución de las sales de potasio; a pesar de que otros autores han obtenido buenos resultados en el cultivo de embriones maduros al suplementar el medio MS con kinetina o bencil adenina (González-Rosas *et al.*, 1991a) y con ácido giberélico (Nel y Kotze, 1982).

CONCLUSIONES

- Se puede inducir la formación de brotes múltiples a partir de embriones inmaduros y maduros de *Persea americana* Mill. cultivados en medio MS, suplementado con 0,5 mg/L de BA y con 0,5 mg/L de BA y de GA₃, respectivamente.
- La adición de 0,5 mg/L de GA₃ en el medio de cultivo parece favorecer el crecimiento de embriones inmaduros en los primeros estadios.
- El subcultivo de brotes provenientes de embriones inmaduros y maduros a un medio MS con 2,0 mg/L de AIB y la adición de carbón activado (0,5%) provoca el 33,8 y el 40,15% de enraizamiento, respectivamente.
- El medio DF sin reguladores del crecimiento y la adición de carbón activado (0,5%), favorece el desarrollo de embriones maduros bien conformados.

RESUMEN

Se cultivaron embriones inmaduros y maduros de diferentes cultivares de aguacatero o palto (*Persea americana* Mill.) en dos medios de cultivo, que consistían en el medio de Murashige y Skoog (1962) a la mitad de su concentración con la adición de 0,5 mg/L de BA en un caso y de 0,5 mg/L de BA y de GA₃ en el otro.

Se detectó una mejor respuesta en el medio que contenía GA₃ al considerar embriones inmaduros extraídos de frutos de más de 30 cm de longitud, y se logró la formación de tres a 10 brotes que pueden tener entre dos y cinco cm aproximadamente. Resultados similares se obtuvieron al cultivar embriones totalmente maduros.

El subcultivo de los brotes a un medio de Murashige y Skoog con 2,0 mg/L de AIB y carbón activado (0,5%) provocó un 30-40% de enraizamiento.

Se obtuvieron plántulas completamente conformadas cuando se extrajeron embriones maduros con una porción de cotiledón y se cultivaron en el medio de Dixon y Fuller (1976) sin reguladores del crecimiento. La adición de carbón activado (0,5%) garantiza un mejor crecimiento y un sistema radical bien conformado.

LITERATURA CITADA

- CAPOTE, M. y BLANCO, M. 1992. Primeros resultados de la propagación *in vitro* de *Persea americana* Mill. en Cuba. VIII Seminario Científico INCA. I. Taller Internacional sobre Biofertilización en los Trópicos. La Habana, Cuba. 88 p.
- DIXON, A. and FULLER, K.W. 1976. Effects of synthetic auxin levels on *Phaseolus vulgaris* L. *Physiol. Plant Path* 11: 287-292.
- DUNCAN, D. 1960. Critical values for Duncan's new multiple range test. *Biometrics*. p.: 677-678.
- GONZÁLEZ-ROSAS, H., LLANO, B.E. and SALAZAR, S. 1991a. Effect of IBA, kinetin and benzyl amino purine on the germination, shoot development, and root formation in avocado embryos cultivates *in vitro*. World Avocado Congress II. University of California. California Avocado Society. 139 p.
- GONZÁLEZ-ROSAS, H., RAMÍREZ, G., RODRIGUEZ, J.L. and SALAZAR, S. 1991b. Preliminary results on *in vitro* selection for tolerance to chloride excess in avocado. World Avocado Congress II. University of California. California Avocado Society. 140 p.
- HARTY, P.A. 1985. Propagation of avocados by tissue culture: development of a culture medium for multiplication of shoots. *South Afri. Avoc. Grow. Ass* 8: 70-71.
- MURASHIGE, T. and SKOOG, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant*. 15: 473-497.
- NELL, D. and KOTZE, J.M. 1982. Tissue culture of avocados. *South Afri. Avoc. Grow. Ass*. 5: 68-70.
- PLIEGO, F., BARCELÓ, A. y LÓPEZ, C. 1986. Rejuvenecimiento de una planta leñosa frutal, aguacate, y su propagación por cultivo de tejidos. Expociencia. Ministerio de Educación y Ciencia. Junta de Andalucía. Consejería de Educación y Ciencia. p.: 97-103.
- PLIEGO, F. and MURASHIGE, T. 1987. Possible rejuvenation of adult avocado by graftage onto juvenile rootstocks *in vitro*. *Hort Science* 22(6): 1321-1324.
- RODRÍGUEZ, N.N., RODRÍGUEZ, O.L. y ÁLVAREZ, M. 1992. Cultivo de embriones maduros e inmaduros de *Persea americana* Mill. VIII Seminario Científico INCA. I Taller Internacional sobre Biofertilización en los Trópicos. La Habana, Cuba. 81 p.
- RODRÍGUEZ, N.N.; RODRÍGUEZ, O.L. y ÁLVAREZ, M. 1993. Cultivo *in vitro* de embriones maduros e inmaduros como vía para el mejoramiento genético del aguacatero (*Persea americana* Mill.). IV Simposio de Botánica. La Habana, Cuba. 314 p.
- RODRÍGUEZ, N.N., RODRÍGUEZ, O.L., ÁLVAREZ, M. y CAPOTE, M. 1995. Aplicación del cultivo *in vitro* de embriones inmaduros y maduros de aguacatero en programas de cuarentena y de mejoramiento genético. Resúmenes Primer Simposio Internacional sobre Fruticultura Tropical y Subtropical. La Habana, Cuba. 92 p.
- SKENE, K.G.M. and BARLASS, M. 1983. *In vitro* culture of abscised immature avocado embryos. *Annals of Botany* 52: 667-672.