

Formación de callos de *Persea americana* Mill. cultivar Catalina a partir de segmentos de hojas de plantas *in vitro*

Marisol Freire Seijo*, Alba Patricia Balsero Fiquitiva, Rafael Gómez Kosky, Yudith García Ramírez, Maite Chávez. *Autor para correspondencia.

Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas. Carretera a Camajuaní km 5.5 Santa Clara. Villa Clara. Cuba. CP 54 830. e-mail: mfreire@ibp.uclv.edu.cu

RESUMEN

La importancia de establecer protocolos para la regeneración de árboles frutales a través de la organogénesis y la embriogénesis somática está dada por la posibilidad de utilizarlos en la propagación masiva de la especie o en programas de mejoramiento genético. Específicamente en el caso del Aguacatero el cultivar Catalina es muy codiciado en Cuba, sin embargo no ha sido introducido en el cultivo *in vitro*. Con el objetivo de formar callos de aguacatero cultivar Catalina se emplearon hojas de plantas *in vitro* que se habían multiplicado en sistemas de inmersión temporal (SIT) para favorecer la expansión de los limbos foliares. En los SIT se emplearon Erlenmeyers de 1 litro y se realizaron inmersiones cada cuatro y ocho horas con un minuto de duración. Para la formación de callos se estudió el efecto del Picloram, el 6 BAP y el 2,4-D. Las plantas de mayor calidad se obtuvieron al realizar en los SIT inmersiones cada 8h. Fue posible formar callos utilizando como explantes secciones de hojas de plantas *in vitro* en un medio de cultivo con 0.1 mg l⁻¹ de Picloram.

Palabras clave: limbos foliares, plantas *in vitro*, sistema de inmersión temporal

ABSTRACT

The importance of establishing protocols for the regeneration of fruit-trees through out the organogenesis and the somatic embryogenesis is based on the possibility to use them in the propagation of the species or in programs of genetic improvement. Specifically the Catalina cultivar is very coveted in Cuba, however it has not been introduced *in vitro*. The present work had the objective of forming callus starting from leaves of *in vitro* plants from avocado tree of the Catalina cultivar. The phase of multiplication of the *in vitro* plants was carried out in temporary immersion systems in order to favour the expansion of the leaves. Erlenmeyers 1.0l were used In the TIS and immersions every four and eight hours with a minute of duration were carried out. The effect of the Picloram, the 6 BAP and the 2,4-D on leaves of *in vitro* plants for the formation of callus was studied. The plants with more quality were obtained when immersions every 8 hours were carried out. It was also possible to form callus using sections of leaves of *in vitro* plants as explants in a culture medium with 0.1 Picloram mg l⁻¹.

Key words: *in vitro* plant leaves, temporary immersion system

INTRODUCCION

El aguacatero, junto con los cítricos, el mango, la papaya y el guayabo constituyen el núcleo central de la fruticultura cubana. Catalina es uno de los cultivares de aguacatero más productivos del grupo ecológico Antillano, se ha sugerido su empleo en el país con el objetivo de obtener altos volúmenes de producción para el consumo de la población (Jiménez *et al.*, 2001).

La importancia de establecer protocolos para la regeneración de árboles frutales a través de la organogénesis y la embriogénesis somática está dada por su empleo en la propagación masiva y el mejoramiento genético. Ambos métodos han sido desarrollados en el aguacatero, sin embargo, existen algunos problemas que afectan la homogeneidad del material vegetal durante la fase

de multiplicación vía organogénesis. Uno de ellos es la poca expansión foliar (Harty, 1985), lo cual impide que las hojas de las plantas *in vitro* puedan ser empleadas como explantes para la formación de callos.

En el aguacatero, para la iniciación de callos se han empleado secciones del mesocarpio y tejidos de cotiledón de frutos casi maduros (Blumenfield y Gazit, 1971; Schroeder, 1980) pero estos cultivos fueron no morfogénicos. Las plantas *in vitro*, a pesar de ser una fuente de explantes accesible y de fácil manejo no han sido utilizadas para la iniciación de callos.

Teniendo en cuenta lo anterior se realizó el presente trabajo con el objetivo de formar callos de aguacatero cultivar Catalina a partir de hojas de plantas *in vitro*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Se empleó como material vegetal para la inoculación de los Sistemas de Inmersión Temporal (SIT), plantas *in vitro* establecidas a partir de plantas injertadas según lo descrito por Balsero (2003). Las mismas se encontraban en fase de multiplicación con cinco subcultivos.

Medio de cultivo

Como medio de cultivo se utilizó en todos los casos el compuesto por las sales inorgánicas del medio de cultivo propuesto por Murashige y Skoog (1962) (Sales MS), suplementado con 30 g.l⁻¹ de sacarosa, vitaminas MS y diferentes concentraciones de reguladores de crecimiento. Para la gelificación de los medios de cultivo se utilizó Agar (SIGMA Chemical Co.) a una concentración de 8.0 g.l⁻¹.

Los medios de cultivo se esterilizaron en autoclaves verticales a 121°C de temperatura y 1.1 kg/cm² de presión donde el tiempo de la esterilización dependió del volumen dispensado. El pH de los medios de cultivo fue ajustado a 5.7±1 con el uso de HCl y/o KOH, previo a la esterilización.

Para la fase de multiplicación del material vegetal y la formación de callos se emplearon frascos de vidrio de 250 ml de capacidad.

Sistemas de inmersión temporal

Los recipientes utilizados en los SIT fueron Erlenmeyers de 1.0 l de capacidad, con 500 ml de medio de cultivo de multiplicación. En un Erlenmeyer se colocó el medio de cultivo líquido y en otro los explantes. Cada frasco fue conectado a un sistema de entrada de aire proveniente de un compresor, el cual se accionó por un programador automático para el control de la frecuencia y la duración de las inmersiones (un minuto).

Condiciones de incubación

Los SIT y los explantes colocados en frascos de cultivo como controles en medio de cultivo semisólido se mantuvieron bajo luz artificial con una densidad de flujo fotosintético de 42-48.0 μmol.m⁻².s⁻²; un fotoperíodo de 16 horas luz y 8 horas de oscuridad a una temperatura de incubación que osciló entre los 24±2°C.

Durante la etapa de formación de callos los frascos de cultivo se colocaron en condiciones de oscuridad a 28± 2° C.

Análisis Estadístico

El procesamiento estadístico de los datos fue realizado a través del paquete estadístico Statistic Package for Social Science (SPSS) versión 8.1, Statgraphics 4.1+, Statistics 2, todos sobre la plataforma de sistema operativo para Windows.

Empleo de los SIT para favorecer la apertura de los limbos foliares

Con el objetivo de favorecer el desarrollo de los limbos foliares de las plantas *in vitro* se emplearon los SIT.

Se estudiaron dos frecuencias de inmersión: cada 4 horas, cada 8 horas y un control en medio de cultivo semisólido. Ambos medios de cultivo contenían las sales y vitaminas MS, sacarosa (30 g.l⁻¹); 6 BAP (0.3 mg.l⁻¹) y el ácido indolbutírico (AIB) (1.0 mg.l⁻¹).

Para este experimento se utilizó un diseño completamente al azar con tres repeticiones.

Como material vegetal de partida se utilizaron explantes que contenían al menos dos yemas axilares o apicales del cultivar Catalina. En cada SIT se inocularon 15 explantes; mientras que en el control con medio de cultivo semisólido se colocaron seis explantes por frasco de cultivo.

A las cuatro semanas de cultivo se evaluó el número de limbos foliares abiertos, el número promedio de brotes por SIT, así como, número de explantes hiperhídricos.

Para este estudio se realizó el análisis de varianza ANOVA correspondiente a la comparación de medias del número de brotes obtenidos por cada SIT y la prueba de Duncan como prueba de rangos para determinar los grupos homogéneos.

Efecto de tres reguladores de crecimiento en la formación de callos de Aguacatero cultivar Catalina

Como material vegetal se emplearon hojas provenientes de las plantas *in vitro* multiplicadas en los SIT. Las hojas fueron seccionadas horizontalmente dividiéndolas en tres partes iguales, punta medio y peciolo. Para la siembra de los explantes se usó la formulación de las sales B5 suplementadas con 100 mg.l⁻¹ de mioinositol; 0.4 mg.l⁻¹ de Tiamina; 8 g.l⁻¹ de agar.

Los tratamientos resultantes de la combinación de los reguladores del crecimiento, sus concentraciones y las diferentes secciones de la hoja para la siembra se refieren en la tabla 1.

A las diez semanas de cultivo se evaluó la formación de callos en cada tratamiento y la calidad de los mismos. Para su evaluación estadística se aplicó la prueba de Chi cuadrado

brindado en el procedimiento correspondiente a la tabla de contingencia y los grupos homogéneos fueron obtenidos a partir de la prueba de proporciones.

Tabla 1. Tratamientos evaluados en la formación de callos a partir de hojas de plantas *in vitro* de aguacatero cultivar Catalina.

| Regulador de crecimiento | Concentración | Sección de la hoja | Tratamiento |
|--------------------------|---------------|--------------------|-------------|
| Picloram | 0.1 | Punta | 1 |
| | 0.1 | Medio | 2 |
| | 0.1 | Pecíolo | 3 |
| | 0.3 | Punta | 4 |
| | 0.3 | Medio | 5 |
| | 0.3 | Pecíolo | 6 |
| 6 BAP | 1.0 | Punta | 7 |
| | 1.0 | Medio | 8 |
| | 1.0 | Pecíolo | 9 |
| | 3.0 | Punta | 10 |
| | 3.0 | Medio | 11 |
| | 3.0 | Pecíolo | 12 |
| 2,4-D | 1.0 | Punta | 13 |
| | 1.0 | Medio | 14 |
| | 1.0 | Pecíolo | 15 |
| | 3.0 | Punta | 16 |
| | 3.0 | Medio | 17 |
| | 3.0 | Pecíolo | 18 |

RESULTADOS Y DISCUSION

Empleo de los SIT para favorecer la apertura de los limbos foliares

Al emplear los SIT la totalidad de los limbos foliares se abrieron, todo lo contrario ocurrió en los explantes que se encontraban en medio de cultivo semisólido (Figura 1).

Al realizar el análisis de varianza correspondiente a la comparación de medias del número de brotes obtenidos en cada tratamiento, se comprobó que no hubo efecto sobre la multiplicación de los brotes por parte de la frecuencia de inmersión aplicada (Tabla 2). Sin embargo, si existieron diferencias estadísticas respecto al control en medio de cultivo semisólido.



A



B

Figura 1. Plantas *in vitro* de Aguacatero cv. Catalina multiplicadas en SIT y medio de cultivo semisólido. (A) Plantas con limbos foliares completamente abiertos multiplicadas en SIT. (B) Plantas con limbos foliares cerrados multiplicadas en medio de cultivo semisólido.

Tabla 2. Influencia de la frecuencia de inmersión en la fase de multiplicación de plantas *in vitro* de Aguacatero cv. Catalina en SIT.

| Frecuencia de inmersión (horas) | Coefficiente de multiplicación | Error estándar/ Coef. Var |
|------------------------------------|-----------------------------------|---------------------------|
| 4 | 5.57 a | 0.0996 3.52% |
| 8 | 4.75 b | 0.1556 4.83% |
| Control (Medio semisólido) | 2.15 c | 0.0968 7.78% |

Medias con letras desiguales difieren en un nivel de significación de 0.05 según prueba de Duncan

El 100% de los explantes que fueron sometidos a inmersiones cada 4h mostraron síntomas severos de hiperhidricidad, las hojas eran extremadamente quebradizas y se desprendían con facilidad de la planta. Estas plantas no se recuperaron al ser subcultivadas en medio de cultivo semisólido. La hiperhidricidad se caracterizó por una apariencia traslúcida, húmeda y gruesa de las hojas, además las plantas de manera general se mostraron muy túrgida.

Todo lo contrario ocurrió en el tratamiento con inmersiones cada 8h donde las plantas se mostraron de un verde intenso y sin síntomas de hiperhidricidad.

Biasi *et al.* (1994) señalaron la necesidad de adicionar al medio de cultivo semisólido aminoácidos para que el limbo de las hojas de las plantas *in vitro* del aguacatero se expandieran; sin embargo con el uso de los SIT las plantas fueron vigorosas, con el limbo de la hoja bien desarrollado, y yemas axilares brotadas sin necesidad de adicionar aminoácidos.

En los tres tratamientos los explantes formaron un callo basal, el que fue mayor en aquellos que se encontraban en el SIT (Figura 2). El callo formado no interfirió en el crecimiento de los explantes ni en la emisión de nuevos hijos.

Según Lorenzo *et al.* (1998) desde el punto de vista de la calidad de los brotes y el coeficiente de multiplicación, los SIT estimulan un mejor comportamiento con respecto al sistema tradicional en medio de cultivo semisólido.

Efecto de diferentes reguladores de crecimiento en la formación de callos de aguacatero cultivar Catalina

Para el diseño presentado se obtuvo que la interacción de los tres factores en este estudio influyeron sobre los resultados referentes a la formación de callos, es decir, el tipo de regulador del crecimiento, sus concentraciones y la sección

de la hoja intervinieron de manera conjunta en esta formación. No obstante, en esta interacción, el factor de acción predominante fue el tipo de regulador, donde el Picloram obtuvo los mejores resultados.

En la tabla 3 se muestra que los mayores porcentajes de formación de callos se lograron en los tratamientos que contenían en el medio de cultivo Picloran como regulador del crecimiento. Las secciones de hojas que formaron callos fueron las del peciolo y la zona media donde la nervadura tenía un mayor desarrollo.

A pesar de que no existieron diferencias estadísticas entre estos tratamientos se recomienda adicionar al medio de cultivo para la formación de callos 0.1mg.l⁻¹ de Picloram y emplear la zona del peciolo, por ser esta la menor concentración. De forma general el empleo de las bajas concentraciones de reguladores del crecimiento garantiza la estabilidad genética del material vegetal y una buena regeneración de plantas a partir de los callos o embriones formados (Vikrant T y Rashid A, 2003).

Los callos formados eran pequeños, de apariencia blanquecina y en todos los casos crecieron sobre la nervadura de la hoja o en la zona de los cortes.

Witjaksono *et al.* (1998) utilizaron 0.1mg.l⁻¹ de Picloran para inducir la formación de callos de Aguacatero pero a partir de embriones cigóticos inmaduros, lo cual coincide con lo planteado en el presente trabajo. En esta especie se ha referido la utilización del regulador de crecimiento Picloran como único capaz de inducir la formación de callos (Pliego-Alfaro *et al.*, 1987) pero a partir de embriones cigóticos inmaduros.

No existen referencias del uso de explantes de plantas *in vitro* para la formación de callos en aguacatero, sin embargo la utilización de este tipo de explantes posibilita contar con un material vegetal de calidad fisiológica, sanitaria y genética teniendo en cuenta el alto grado de heterocigosis de la especie.

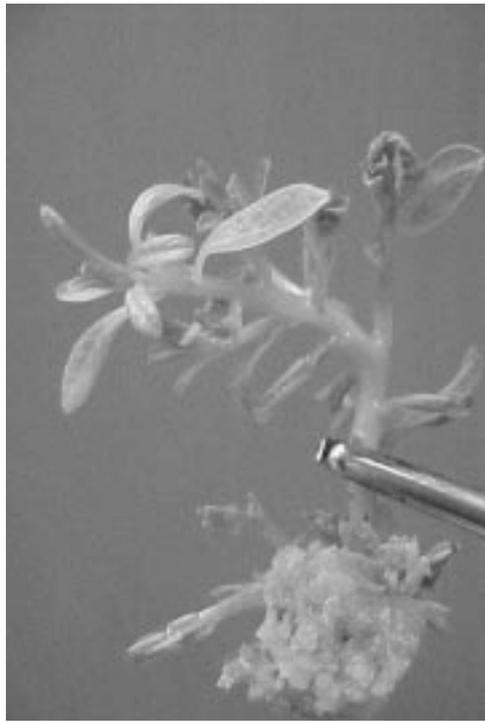


Figura 2. Formación de callo basal en plantas *in vitro* de Aguacatero cv. Catalina multiplicadas en SIT.

Tabla 3. Efecto de la interacción del tipo y la concentración de reguladores del crecimiento y la sección de la hoja de plantas *in vitro* sobre la formación de callos de Aguacatero cultivar Catalina.

| Regulador de crecimiento | Concentración mg l^{-1} | Sección de la hoja | % Formación de callos | Tratamiento |
|--------------------------|----------------------------------|--------------------|-----------------------|-------------|
| Picloram | 0.1 | Punta | 0.0 c | 1 |
| | | Medio | 60.0 ab | 2 |
| | | Pecíolo | 100.0 a | 3 |
| | 0.3 | Punta | 0.0 c | 4 |
| | | Medio | 20.0 bc | 5 |
| | | Pecíolo | 60.0 ab | 6 |
| 6 BAP | 0.1 | Punta | 0.0 c | 7 |
| | | Medio | 23.0 bc | 8 |
| | | Pecíolo | 40.0 bc | 9 |
| | 0.3 | Punta | 20.0 bc | 10 |
| | | Medio | 20.0 bc | 11 |
| | | Pecíolo | 0.0 c | 12 |
| 2,4-D | 0.1 | Punta | 0.0 c | 13 |
| | | Medio | 0.0 c | 14 |
| | | Pecíolo | 0.0 c | 15 |
| | 0.3 | Punta | 0.0 c | 16 |
| | | Medio | 0.0 c | 17 |
| | | Pecíolo | 0.0 c | 18 |

Medias con letras desiguales difieren en un nivel de significación de 0.05 según la prueba de proporciones.

En los tratamientos con el regulador 2,4-D en todas las concentraciones utilizadas se observó la necrosis y muerte de explantes, probablemente debido a la

intensa fenolización, lo cual constituye una de las mayores dificultades para el cultivo *in vitro* de esta especie.

Aunque el 2,4-D ha sido usado ampliamente para la formación de callos en múltiples especies como caña de azúcar (*Sacharum* sp) (Freire, 2001), Cafeto (*Coffea* spp. L) (de Feria, *et al.* 2003), y Caña santa (*Cymbopogon citratus* Staff) (Quiala *et al.* 2002), entre otros; están reconocidas otro grupo de especies en las que no es efectiva la adición de este regulador del crecimiento al medio de cultivo para propiciar el crecimiento indiferenciado de los tejidos.

Para la formación de callos de aguacatero, solamente se encuentra referida la utilización de embriones cigóticos inmaduros con 25 días postpolinización. Este es un tejido muy susceptible a la fenolización además de ser muy laboriosa la identificación y la extracción del embrión. Por estas razones es factible contar con otras fuentes de explantes como por ejemplo las provenientes de plantas *in vitro*.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos permiten concluir que al emplear los sistemas de inmersión temporal con frecuencias de inmersión cada 8h es posible obtener plantas *in vitro* de Aguacatero cv. Catalina con los limbos foliares expandidos para ser empleados en la formación de callos. El mayor porcentaje de formación de callos a partir de hojas de plantas *in vitro* (zona del pecíolo) se logró al emplear un medio de cultivo que contenía 0.1 mg^l⁻¹ de Picloram.

REFERENCIAS

- De Feria M, Jiménez E, Quiala E, Barbón R y Capote A (2003) Effect of dissolved oxygen concentration on differentiation of somatic embryos of *Coffea arabica* cv. Catimor 9722. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 72: 1-6
- Balcerio, P (2003) Estudios preliminares del cultivo *in vitro* de aguacatero (*Persea americana* Mill) cultivar Catalina. Tesis para optar por el grado científico de Magister Scientiae en Biotecnología Vegetal. IBP. Santa Clara
- Biasi, LA, OC Koller y Kämpt AN (1994) Micropropagação do abacateiro Ouro verde a partir de segmentos nodais. *Pesq. Agrop. Brazil* 29 (7): 1051-1058
- Blumemenfeld, A y Gazit S (1971) Growth of avocado fruit callus and its relation to exogenous and endogenous cytokinins. *Physiol. Plant* 25: 369-371
- Freire, M (2001) Nueva metodología de embriogénesis somática en caña de azúcar (*Saccharum* spp. híbrido var C87-51) empleando medios de cultivo líquidos. Tesis de grado de Doctor en Ciencias Agrícolas UCLV. IBP. Santa Clara
- Harty, PA (1985) Propagation of avocados by tissue culture: development of culture medium for multiplication of shoots. *South African Avocado Grower's Association: Yearbook*. 8: 70-71
- Jiménez, E, de Feria M, Barbón R, Capote A y Chávez M (1995) Empleo de biorreactores para la producción de embriones somáticos de café (*Coffea arabica* cv. Catimor). *Advances in Modern Biotechnology*. 3: II.2 . 125-139
- Jiménez, R (2001) El empleo de cultivares de aguacatero en Cuba. Su crecimiento, rendimiento y características. *Citrifrut* 9 (2-3): 19-30
- Lorenzo, J, González B, Escalona M, Teisson C, Espinosa P y Borroto C (1998) Sugarcane shoot formation in an improved temporary immersion system. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 54:197-200
- Murashige, T y Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-497
- Pliego-Alfaro, F y Murashige T (1987) Somatic embryogenesis in avocado (*Persea americana* Mill.) *in vitro*. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 12: 61-66
- Pliego-Alfaro, F, López-Encina C, Barceló-Muñoz A (1987) Propagation of avocado rootstocks by tissue cultura. *South African Avocado Grower's Association Yearbook*, v 10. 36-39
- Quiala E, Jiménez E y Capote A (2002) Establecimiento y multiplicación de suspensiones celulares de *Cymbopogon citratus* (D.C) Staff. *Biotecnología Vegetal*. 2 (3): 155-161
- Schroeder, C (1980) Etiolation and avocado bud elongation *in vitro*. *Calif. Avoc. Soc. Yearbook* 63: 86-89
- Vikrant T, y Rashid A (2003) Somatic embryogenesis from mesocotyl and leaf-base segments of *Paspalum scrobiculatum* L., a minor millet. 39 (5): 485-489
- Witjaksono, B, Schaffer A, Colls R, Litz P y Anderson G (1998) Avocado shoot culture, plantlet development and net CO₂ assimilation in an ambient and CO₂ enhanced environment. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant.* 35: 238-244