

## Formación de embriones somáticos en *Persea americana* Mill var. Catalina a partir de embriones cigóticos inmaduros

Lillien Fajardo Rosabal<sup>1\*</sup>, Marisol Freire Seijo<sup>2</sup>, Yudith García Rodríguez<sup>2</sup>, Leandris Argente Martínez<sup>1</sup>. \*Autor para correspondencia.

<sup>1</sup>Centro de Estudios de Biotecnología Vegetal y Medio Ambiente. Universidad de Granma. e-mail: lillien@udg.co.cu

<sup>2</sup>Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central "Martha Abreu" de Las Villas. Carretera a Camajuaní km 5.5, Santa Clara, Villa Clara, Cuba. CP 54 830

### RESUMEN

El establecimiento de cultivos embriogénicos de aguacate se ha logrado en diferentes genotipos, los embriones cigóticos inmaduros son los explantes iniciales más empleados y se ha descrito el proceso en varios cultivares de interés económico. El presente trabajo aborda la inducción y formación de embriones somáticos en el aguacatero cv. Catalina, al utilizar como explantes iniciales embriones cigóticos inmaduros. Los frutos inmaduros fueron agrupados en cinco rangos de tamaño para la extracción de los embriones cigóticos. Estos posteriormente se sembraron en medios de cultivo que contenían 4-amino-3,5,6- ácido tricloropicolínico (Picloram) en concentraciones de 0.1, 0.4 y 0.6  $\mu\text{M}$ . El medio de cultivo utilizado para la inducción de la embriogénesis somática, consistió en Macro B5, Micro MS, tiamina (0.8  $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ ), mio-inositol (100  $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ ), sacarosa (30  $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ ) y pH 5.7. Se evaluó el número de embriones cigóticos con hojas cotiledonares abiertas a partir del tercer día de cultivo, el número de embriones fenolizados a la tercera semana de cultivo y la presencia de embriones somáticos, a las cinco semanas de cultivo. Se logró la formación de embriones somáticos en todos los tratamientos estudiados. El mayor número de explantes que formaron embriones somáticos se obtuvo cuando se utilizó la concentración de 0.6  $\mu\text{M}$  de Picloram, con un rango de tamaño del fruto inmaduro de 0.71 x 0.65 mm (rango 2). Se apreciaron diferencias significativas entre los grupos de tamaño de fruto.

Palabras clave: aguacatero, embrión somático, hojas cotiledonares, picloram

### ABSTRACT

The establishment of embryogenic culture of avocado have been achieved in different genotypes, usually the immature zygotic embryos are the initial explants and the process has been described in several variety. In the present paper the induction of the somatic embryogenesis in avocado (Catalina variety) from zygotic embryos is proposed. Zygotic embryos taken from unripe fruits were used as explants. The fruits were divided into five groups according to their size. The embryos were cultured in a medium containing 4-amino-3,5,6 trichloropicolinic acid (Picloram) in concentrations of 0.1, 0.4, and 0.6  $\mu\text{M}$ . The culture medium used for the induction of the somatic embryogenesis consisted of: Macro B5, Micro MS, thiamine (0.8  $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ ), myo-inositol (100  $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ ), sucrose (30 $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ ) and pH 5.7. The number of zygotic embryos with opened cotyledonal leaves was evaluated starting from the third day of culture. It was also evaluated the number of fenolized zygotic embryos at the third week of culture and the presence of somatic embryos five weeks after the culture initiation. The formation of somatic embryos was achieved in all the treatments. The highest number of explants that formed somatic embryos was achieved when a concentration of 0.6  $\mu\text{M}$  of Picloram was used and the second group of size (0.71 x 0.65 mm) observing significant differences between the different groups of fruit size.

Keywords: avocado, cotyledonal leafs, somatic embryo, picloram

### INTRODUCCIÓN

El aguacatero (*Persea americana* Mill), es la única especie importante desde el punto de vista económico de la familia *Lauraceae*. Presenta un valor creciente en el mercado internacional, debido no sólo a las amplias posibilidades para el consumo fresco y procesado, sino también a su carácter de materia prima para la extracción de aceite de amplia utilización en la industria cosmética.

Catalina es uno de los cultivares más productivos del grupo ecológico Antillano, su empleo se sugiere

en Cuba, con el objetivo de obtener altos volúmenes de producción para el consumo de la población (Jiménez, 2001).

Autores como Money y Van Staden (1987); Pliego-Alfaro y Murashige (1988); Raviv *et al.* (1998) y Witjaksono y Litz (1999) han desarrollado la embriogénesis somática en varios cultivares tales como: Hass, Fuerte, Duke 7, Thomas, Isham con el uso de embriones cigóticos inmaduros como explantes iniciales. Sin embargo, no aparecen referencias en la literatura científica sobre resultados al respecto en el cultivar Catalina. Por esta razón, el

presente trabajo persiguió como objetivo, lograr la formación de embriones somáticos a partir de embriones cigóticos inmaduros, en el aguacatero, cultivar Catalina.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Los trabajos de laboratorio se realizaron en condiciones asépticas. Los medios de cultivos se esterilizaron en autoclave vertical a 121 °C y 1.2 kg.cm<sup>-2</sup> de presión durante 20 min, pH 5.7 antes del autoclaveado. Para la desinfección del instrumental se utilizó hipoclorito de sodio (NaClO) al 1.0% durante 15 minutos y la manipulación del material vegetal, en cabinas de flujo laminar.

Se emplearon como explantes iniciales para la inducción de la embriogénesis somática embriones cigóticos inmaduros, extraídos de frutos con un tamaño entre: 0.46-1.27cm medidos con pie de rey ( $e = 0.02\text{mm}$ ). Los mismos se agruparon en cinco grupos de tamaño (Tabla 1), y se combinaron con tres concentraciones (0.1, 0.4 y 0.6 $\mu\text{M}$ ) de 4- amino-3,5,6- ácido tricloropicolínico (Picloram), para formar 15 tratamientos.

Para la desinfección del material vegetal inicial (frutos inmaduros) se realizó un lavado con detergente y agua corriente, seguido de una inmersión en etanol (70%) durante 2 minutos, posteriormente tres enjuagues con agua desionizada estéril, inmersión en hipoclorito de sodio (0.5 %) y tres gotas de Tween 20, durante 10 minutos y por último, tres enjuagues con agua desionizada estéril.

Los frutos fueron disectados con el auxilio de un microscopio estereoscópico. Primeramente se extrajo el saco embrionario y posteriormente, el embrión cigótico inmaduro (Figura1).

El medio de cultivo estuvo compuesto por Macronutrientes B5 según Garborg *et al.* (1968), Micronutrientes del medio de cultivo propuesto por Murashige y Skoog (1962), tiamina (0.8 mg.l<sup>-1</sup>), mio-inositol (100 mg.l<sup>-1</sup>), sacarosa (30 g.l<sup>-1</sup>) y el pH fue ajustado a 5.7, antes de la esterilización. Como

frascos de cultivo, se emplearon recipientes de vidrio de 250 ml de capacidad, con 25 ml de medio de cultivo.

Se evaluó el número de embriones cigóticos con hojas cotiledonares abiertas, a los tres días de cultivo, el número de embriones cigóticos que mostraron oxidación fenólica y el número de de explantes con formación de embriones somáticos a la tercera y quinta semana de cultivo, respectivamente.

Para el análisis estadístico, se utilizó el programa estadístico computacional; STATISTICS versión (6.0), con plataforma para sistema operativo Windows®. Los factores objeto de variación en el estudio fueron: rangos de tamaño del fruto (cinco rangos) y la concentración de picloram (tres concentraciones). Las variables independientes fueron: presencia de embriones somáticos y estado de las hojas cotiledonares. Para lograr la homogeneidad de varianza y la normalidad de los datos, se utilizó la transformación de arcsen (P), P = proporción y se realizó un análisis de varianza de clasificación doble con un arreglo experimental completamente aleatorizado. Cuando existieron diferencias entre las medias, se realizó la prueba de comparación múltiple de medias de Tukey para un nivel de significación del 5.0 %.

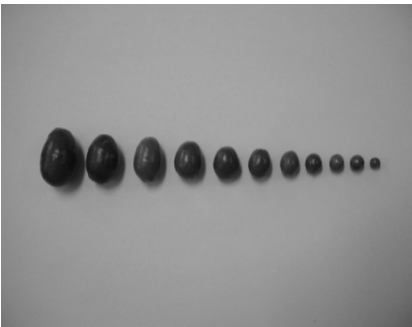
## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Entre el primer y segundo día de cultivo los embriones cigóticos se engrosaron y a los tres días de cultivo las hojas cotiledonares se abrieron. Al analizar la variable independiente apertura de las hojas cotiledonares, se encontraron diferencias significativas dentro de los grupos de tamaño del fruto, excepto para el rango 3 de tamaño y las concentraciones, con interacción entre estos factores.

Tal como se muestra en la tabla 2 el mayor porcentaje de embriones con hojas cotiledonares abiertas se obtuvo en el tratamiento que contenía en el medio de cultivo 6.0  $\mu\text{M}$  de picloram combinado con embriones cigóticos extraídos del rango 3 de tamaño de fruto (0.84 x 0.72cm). Este tratamiento difirió estadísticamente del resto de los tratamientos estudiados.

Tabla 1. Grupos formados, según rango de tamaño de los frutos inmaduros de aguacatero cultivar Catalina

Rangos de tamaño de fruto por grupo (cm)	Número del rango
0.46 x 0.50	1
0.56 x 0.80	4
0.71 x 0.65	2
0.84 x 0.72	3
1.27 x 0.97	5



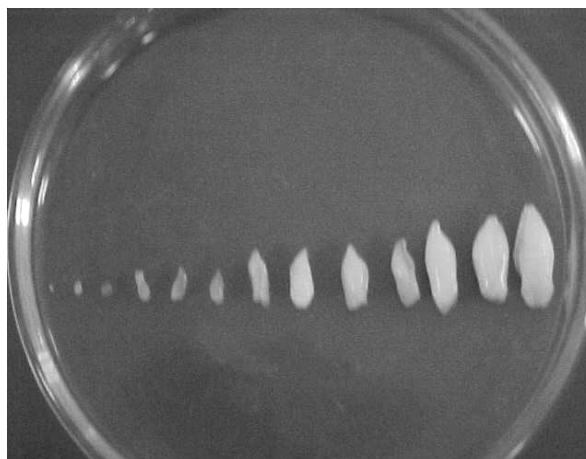


Figura 1. Embriones cigóticos inmaduros de aguacate cv. Catalina extraídos de frutos de diferentes rangos de tamaño.

Tabla 2. Porcentaje de embriones cigóticos de aguacate cv. Catalina que abrieron sus hojas al segundo día de cultivo.

Rangos de tamaño de fruto(RTF)*	Concentraciones de picloram ( $\mu\text{M}$ )	% de EC con hojas cotiledonares abiertas	Medias de los datos transformados para la presencia de cotiledones abiertos
1	0.1	50.0	$0.523 \pm 0.59^f$
	0.4	66.6	$0.728 \pm 0.83^e$
	0.6	75.0	$0.848 \pm 0.06^d$
2	0.1	50.0	$0.523 \pm 0.59^f$
	0.4	75.0	$0.818 \pm 0.25^d$
	0.6	88.8	$1.092 \pm 0.97^b$
3	0.1	66.6	$0.728 \pm 0.83^e$
	0.4	83.3	$0.984 \pm 0.50^c$
	0.6	100.0	$1.570 \pm 0.79^a$
4	0.1	40.0	$0.411 \pm 0.51^g$
	0.4	40.0	$0.411 \pm 0.51^g$
	0.6	40.0	$0.411 \pm 0.51^g$
5	0.1	44.4	$0.460 \pm 0.57^g$
	0.4	27.3	$0.276 \pm 0.51^h$
	0.6	50.0	$0.523 \pm 0.59^f$

Medias con letras diferentes difieren entre sí para  $p < 0.05\%$  según Tukey. CV=2.7%.\* según lo descrito en tabla 1.

La fenolización de los explantes comenzó a manifestarse a la tercera semana de cultivo. Este fenómeno afectó el 15% de los embriones cigóticos pero ya en la décima semana de cultivo, había alcanzado la totalidad de los explantes sin diferencias entre los tratamientos.

En la quinta semana de cultivo, en todos los tratamientos se observó la formación de pequeñas masas de embriones somáticos en etapa globular. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por

Money y Van Staden (1987) y Pliego-Alfaro y Murashige (1988) quienes obtuvieron masas proembriogénicas a partir de embriones cigóticos inmaduros y tejido nuclear en frutos de esta misma especie pero diferentes cultivares.

Las masas de embriones globulares, en este caso, son estructuras primeramente transparentes, que luego se tornan de color blanco. Los embriones somáticos, aparecieron sobre el embrión cigótico tanto en posición basal como lateral.

Se logró la inducción de una embriogénesis somática directa y de alta frecuencia. Estos resultados difieren de los obtenidos por Alfaro y Murashige (1988) quienes describen una embriogénesis somática indirecta en aguacatero. Sin embargo, en otras especies leñosas como *Psidium guajava* (Vilchez, 2002) y *Mangifera indica*, cultivar Ataulfo (Domínguez, 2004), se ha referido el desarrollo de una embriogénesis somática directa al emplear como explantes iniciales fracciones de tejido nucelar de frutos inmaduros.

La formación de los embriones somáticos ocurrió independientemente de la apertura de las hojas cotiledonares (Figura 2), es decir no existió correlación entre uno y otro fenómeno. La aparición de la fenolización en los explantes tampoco interfirió en la formación de los embriones somáticos.

Al evaluar la presencia de embriones somáticos, se encontraron diferencias significativas dentro de los grupos de tamaño de los frutos. No se observó interacción entre el tamaño del fruto y las concentraciones de picloram.

En todos los casos se indujo la embriogénesis somática, lo cual concuerda con lo planteado por Pliego Alfaro y Murashige (1988), quienes afirmaron que los cultivos embriogénicos pueden ser inducidos de embriones cigóticos de varios tamaños y estados de desarrollo, de frutos de 0.6-0.8 mm a 9.0 mm de longitud.

Los mejores resultados se evidenciaron cuando se combinó un rango 2 de tamaño del fruto (0.71 x 0.65 cm), con una concentración de 0.6  $\mu$ M de picloram (Tabla 3). Resultados que antes no habían sido descritos para el cultivar catalina de aguacatero.

Tabla 3. Influencia del rango de tamaño de fruto y las concentraciones de picloram, en la formación de embriones somáticos de aguacate cv. Catalina.

Rangos de tamaño del fruto (RTF)*	Concentraciones de picloram( $\mu$ M)	Porcentaje de formación de embriones somáticos (%)	Medias de los datos transformados para la presencia de embriones somáticos
1	0.1	50.0	0.523 $\pm$ 0.73 <sup>b</sup>
	0.4	0.00	0.010 $\pm$ 0.00 <sup>k</sup>
	0.6	25.0	0.252 $\pm$ 0.68 <sup>f</sup>
2	0.1	50.0	0.523 $\pm$ 0.59 <sup>b</sup>
	0.4	0.00	0.010 $\pm$ 0.00 <sup>k</sup>
	0.6	66.6	0.728 $\pm$ 0.83 <sup>a</sup>
3	0.1	40.0	0.339 $\pm$ 0.48 <sup>d</sup>
	0.4	16.6	0.166 $\pm$ 0.77 <sup>g</sup>
	0.6	40.0	0.411 $\pm$ 0.51 <sup>c</sup>
4	0.1	10.0	0.100 $\pm$ 0.16 <sup>i</sup>
	0.4	0.00	0.010 $\pm$ 0.00 <sup>k</sup>
	0.6	0.00	0.010 $\pm$ 0.00 <sup>k</sup>
5	0.1	11.1	0.111 $\pm$ 0.22 <sup>h</sup>
	0.4	9.09	0.091 $\pm$ 0.02 <sup>j</sup>
	0.6	30.0	0.304 $\pm$ 0.69 <sup>e</sup>

Medias con letras diferentes difieren entre sí para  $p < 0.05\%$  según Tukey. CV=7.3%. \* Según lo descrito en tabla 1.

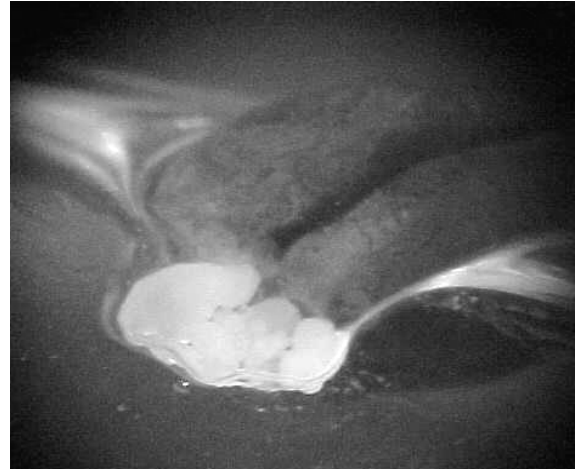


Figura 2. Formación de embriones somáticos a partir de embriones cigóticos inmaduros de aguacate cv. Catalina, con hojas cotiledonares abiertas y cerradas.

## CONCLUSIONES

Se logró la formación de embriones somáticos en el aguacatero cv. Catalina a partir de embriones cigóticos inmaduros. Los mejores resultados se obtuvieron al utilizar la concentración de 0.6  $\mu$ M de Picloram, con un rango de tamaño del fruto inmaduro de 0.71 x 0.65 mm. Se describió por primera vez este evento morfogénico en el cultivar Catalina.

## REFERENCIAS

- Domínguez, R (2004) Embriogénesis somática, transformación y regeneración de mango (*Mangifera indica* L.) cv. Ataulfo y Hindi. En: <http://www.ciad.mx/boletin/sep0ct04/Embriogenesis.pdf>
- Ganborg, OL, Miller RA y Ojima K (1968) Plant cell cultures. Nutrient requirements of suspension cultures of solvean root cells. Exp. Cell. Res. 50:151-158
- Vilchez, JA, Albany N R, Gómez Kosky R, García L (2002) Inducción de embriogénesis somática en *Psidium. guajava* L.

a partir de embriones cigóticos. Revista de la Facultad de Agronomía 19 (4): 284-293

Jiménez, R (2001) El empleo de cultivares de aguacatero en Cuba. Su crecimiento, rendimiento y características. Citrifrut 9:19-30

Money, PA, Van Staden J (1987) Induction of embryogenesis in callus from immature embryos of *Persea americana*. Can. J. Bot. 65:622-626

Murashige, T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissues cultures. Plant Physiology 15: 473 – 497

Pliago-Alfaro, F, Murashige T (1988) Somatic embryogenesis in avocado (*Persea americana* Mill.). Plant Cell Tiss.Org.Cult.12: 61-66

Raviv, A, Avenido RA, Tisalona LF, Damasco OP, Mendoza EMT, Pinkas Ya y Zilkah S (1998) Callus and somatic embryogenesis of *Persea* species. Plant Tiss. Cult. Biotech. 4: 196-206

Witjaksono A, Litz RE (1999) Induction and growth characteristics of embryogenic avocado (*Persea americana* Mill.) cultures. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 58: 19-29