

## FACTORES QUE AFECTAN A LA OBTENCIÓN DE EMBRIONES SOMÁTICOS BLANCO-OPACOS DE AGUACATE

B. Márquez-Martín<sup>1</sup>, C. Sánchez-Romero<sup>1</sup>, R. Perán-Quesada<sup>1</sup>, A. Barceló-Muñoz<sup>1</sup> y F. Pliego-Alfaro<sup>2</sup>

<sup>1</sup>IFAPA, Cortijo de la Cruz s/n. 29140 Churriana, Málaga. [cifacruz@olinet.es](mailto:cifacruz@olinet.es)

<sup>2</sup>Dpto. de Biología Vegetal, Campus de Teatinos s/n. Universidad de Málaga. 29071 Málaga, España. [ferpliego@uma.es](mailto:ferpliego@uma.es)

### RESUMEN

La regeneración de plantas vía embriogénesis somática en especies leñosas, incluido el aguacate, es un proceso bien conocido, aunque la frecuencia de conversión de los embriones a plantas es generalmente muy baja. Los problemas de conversión son atribuidos, en muchos casos, a morfologías atípicas o a la inmadurez de los embriones somáticos formados. Nuestros estudios se centraron en la obtención de embriones blanco-opacos, considerados como embriones en los que se ha iniciado la acumulación de sustancias de reserva. A partir de cultivos embriogénicos derivados de embriones zigóticos inmaduros del cultivar Duke-7, se seleccionó la fracción de callo con características friables y se cultivó en medio B5m (formulación MS con los macronutrientes de la formulación B5), suplementado con ABA (0- 100  $\mu$ M), agentes osmóticos (PEG y sorbitol) o distintas fuentes de nitrógeno orgánico (aminoácidos Jensen, glutamina, caseína hidrolizada y extracto de levadura a 250 y 500 mg l<sup>-1</sup>). Los medios fueron solidificados con 6 g l<sup>-1</sup> de agar y los cultivos se incubaron en condiciones de oscuridad.

En algunas especies, la aplicación de ABA y/o agentes osmóticos durante estadios tempranos de desarrollo del embrión somático evita la embriogénesis secundaria e inhibe la aparición de anomalías, así como la germinación precoz; sin embargo, nuestros resultados en aguacate ponen de manifiesto, que en presencia de ABA se disminuye la regeneración de embriones blanco-opacos, mientras que con la utilización de agentes osmóticos tampoco se obtienen resultados positivos. Por el contrario, la incorporación de nitrógeno orgánico, en particular los aminoácidos de Jensen, sí mejoró el porcentaje de regeneración de estructuras blanco-opacas.

*Abreviaturas:* ABA – Ácido abscísico; B5m – formulación MS (Murashige y Skoog, 1962) con los macronutrientes de la formulación B5 (Gamborg y col., 1968); MS – Murashige y Skoog (1962); PEG – Polietilenglicol; ebo – embrión somático blanco-opaco.

## INTRODUCCIÓN

La regeneración de plantas de aguacate vía embriogénesis somática ha sido descrita previamente por varios autores ( Mooney y van Staden, 1987; Pliego-Alfaro y Murashige, 1988; Witjaksono y Litz, 1999), aunque la frecuencia de conversión de los embriones a plantas es todavía muy baja (Perán-Quesada y col., 2001). En otras especies, los problemas de conversión son atribuidos a morfologías atípicas o a inmadurez de los embriones somáticos formados (Ammirato, 1987). Numerosos trabajos están orientados a evitar la germinación precoz y a conseguir un aumento de la acumulación de sustancias de reserva en el embrión somático. La acumulación de estas sustancias durante la embriogénesis somática y zigótica está regulada por genes inducidos por estrés hídrico o ABA (Attree y col., 1992; Obendorf y Wettlaufer, 1984; Xu y col., 1990). El cambio en los niveles de ABA durante el desarrollo embrionario es bien conocido en semillas ortodoxas (Hetherington y Quatrano, 1991; Walker-Simmons, 1987), aunque se ha demostrado que en algunas especies con semillas recalcitrantes los niveles endógenos de ABA fluctúan de manera similar (Etienne y col., 1993; Pence, 1992). Por otro lado, el uso de algunos agentes osmóticos como PEG, manitol, sacarosa o sorbitol, también puede tener efectos positivos en la maduración de embriones somáticos (Misra y col., 1993). Finalmente, la presencia de nitrógeno, suplementado en forma de nitrato, amonio, aminoácidos individuales y/o caseína hidrolizada es un requerimiento indispensable para la histodiferenciación del embrión y su maduración (Merkle y col., 1995). Walker y Sato (1981) mantienen que, en ausencia de amonio o nitrato, embriones somáticos de alfalfa no se desarrollan.

En aguacate se ha observado que los meristemas de tallo y raíz están, a menudo, subdesarrollados ( Mooney y van Staden, 1987; Pliego-Alfaro y Murashige, 1988). Al contrario que los embriones zigóticos maduros, los embriones somáticos de aguacate son raramente bipolares, hecho que puede explicar la baja conversión de estos embriones a plantas (< 5%) (Pliego-Alfaro y Murashige, 1988). Por tanto, para que esta técnica de regeneración sea aplicable en programas de mejora, es necesario optimizar la fase limitante del proceso: el desarrollo y la maduración de los embriones somáticos.

## MATERIAL Y MÉTODOS

A partir de frutos inmaduros de aguacate (alrededor de 1 cm de longitud) del cv Duke 7, se establecieron cultivos embriogénicos siguiendo el protocolo de Pliego-Alfaro y Murashige (1988); así, después de retirar los sépalos y el pedúnculo, los frutillos fueron desinfectados en el interior de una cabina de flujo laminar durante 10 min en una solución de lejía comercial al 10% con Tween 20 (2 gotas/100 ml). Los frutos fueron lavados 3 veces en agua destilada estéril y diseccionados en condiciones de asepsia. Los embriones zigóticos extraídos cuidadosamente de los frutos, fueron cultivados en medio de inducción MS (Murashige y Skoog, 1962) suplementado con 0.41  $\mu\text{M}$  picloram y solidificado con 6 g l<sup>-1</sup> de agar. El pH del medio fue ajustado a 5.74 y autoclavado durante 15 min a 121° C y 0.1 MPa. El medio de cultivo fue repartido en alícuotas de 25 ml en tubos 25x150 mm (Bellco Glass) cubiertos con tapones de polipropileno (Bellco Glass Inco Kaputs). Las líneas que proliferaron en estas condiciones fueron multiplicadas y mantenidas en el mismo medio de inicio.

Como material de partida en estos experimentos se utilizaron 0.4 g de callo embriogénico friable mantenido en las condiciones anteriores, con el que se establecieron suspensiones en 40 ml de medio MS líquido suplementado con 0.41  $\mu\text{M}$  de picloram (Witjaksono y Litz, 1999). Los cultivos se mantuvieron en agitación a 120 rpm en condiciones de luz difusa durante 9 días. Tras este periodo de tiempo, las suspensiones se filtraron secuencialmente a través de dos mallas, de 2 y 1 mm respectivamente, utilizándose 400 mg de la fracción retenida entre ambas mallas, como inóculo para inducir el desarrollo de embriones blanco-opacos.

En el primer experimento se evaluó el efecto de diversas concentraciones de ABA (1-100  $\mu\text{M}$ ) añadido al medio de cultivo. Posteriormente se probaron dos tipos de agentes osmóticos (PEG y sorbitol) a concentraciones de 2.5, 5 y 7.5% (p/v). Por último, se testó el efecto de diferentes fuentes de nitrógeno incorporado al medio en forma de aminoácidos de Jensen (Jensen, 1977), así como glutamina, caseína hidrolizada o extracto de levadura a dos concentraciones: 250 y 500  $\text{mg l}^{-1}$ . En todos los experimentos el medio basal utilizado fue B5m solidificado con 6  $\text{g l}^{-1}$  de agar.

Se cultivaron entre 15 y 20 tubos por tratamiento realizándose dos repeticiones de cada experimento. Se tomaron datos durante 3 subcultivos (5 semanas cada uno), del porcentaje de regeneración de embriones somáticos blanco-opacos y número de embriones blanco-opacos por cultivo.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

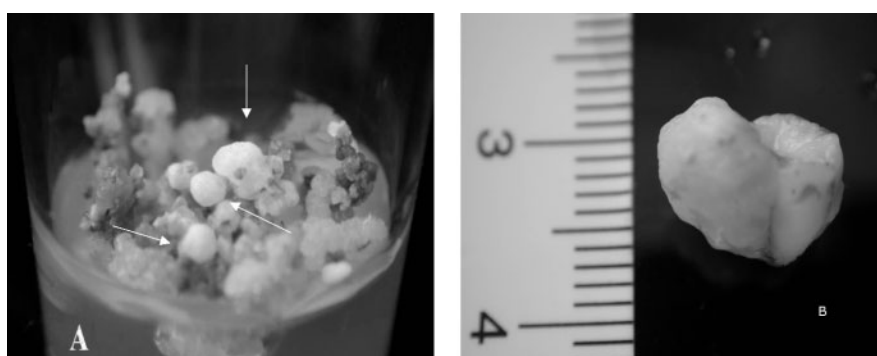


Figura 1.- A. Embriones somáticos blanco-opacos en medio de desarrollo (B5m) B. Embrión somático desarrollado.

### Efecto del ABA

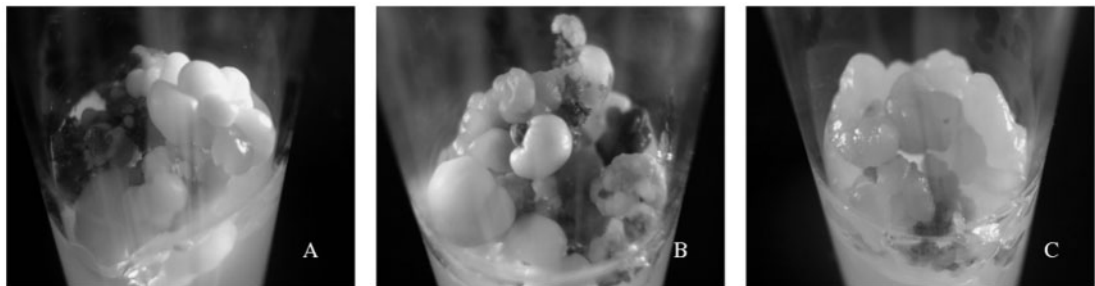
Diversos autores han apuntado que la adición de ABA al medio de cultivo regula la maduración de embriones, previene la germinación precoz y facilita la acumulación de proteínas de reserva y carbohidratos (Attree y col., 1992; Obendorf y Wettlauffer, 1984; Xu y col., 1990). Sin embargo, en el caso del aguacate, nuestros datos indican que la adición de ABA al medio afecta negativamente a la formación de embriones blanco-opacos; así, los cultivos control formaron el mayor número de embriones blanco-opacos, alcanzándose un 47.78% de regeneración (Tabla 1) (Figura 1). En semillas recalcitrantes, al carecer de una fase clara de desecación, se piensa que la fase de maduración no está influenciada por el ABA de la misma forma que en embriones ortodoxos (Perán-Quezada, 2001) por lo que, en general, es difícil controlar *in vitro* el desarrollo de este tipo de embriones (Wang y Janick, 1984).

	Control	1 $\mu\text{M}$ ABA	10 $\mu\text{M}$ ABA	100 $\mu\text{M}$ ABA
% reg ebo	47,78	33,33	35,71	23,33
n <sup>o</sup> ebo/cult	1,36 $\pm$ 0.04	0,77 $\pm$ 0.08	0,59 $\pm$ 0.04	0,43 $\pm$ 0.12

Tabla 1.- Datos de porcentaje de regeneración (% reg ebo) y número (n<sup>o</sup> ebo /cult) de embriones somáticos blanco-opacos en medios con distinta concentración de ABA.

## Efecto de agentes osmóticos

Se ha demostrado que , además del ABA, agentes osmóticamente activos como PEG, manitol o sacarosa pueden inhibir el proceso de germinación precoz, siendo en algunos casos más efectivo el establecimiento de altas presiones osmóticas en el medio de cultivo que el aporte exógeno de ABA (Perán-Quesada, 2001). En aguacate, durante las primeras semanas de desarrollo los embriones toman una apariencia diferente en los medios con sorbitol o PEG, presentando en estos últimos un aumento de tamaño considerable, así como una textura friable e hiperhídrica (Figura 2), hecho que se acentúa al aumentar la concentración de PEG. Sin embargo, estos embriones no evolucionan a blanco-opacos, permaneciendo con esas características durante todo el ensayo. La adición de cualquiera de estos agentes osmóticos al medio, disminuye significativamente el número de embriones blanco-opacos formados. Entre ambos agentes osmóticos, el sorbitol arrojó mejores resultados que el PEG, obteniéndose un máximo de 58.20% de regeneración en medio con 2.5% (p/v) sorbitol (Tabla 2); sin embargo, no se observaron diferencias significativas respecto al control. Existen trabajos en coníferas donde se pone de manifiesto que el uso de agentes osmóticos no permeables favorece la maduración de embriones somáticos (Hakman y von Arnold, 1988; Joy y col., 1991; Svobodová, y col., 1999). Svobodová y col. (1999), describen un aumento de tamaño general de los embriones madurados en presencia de PEG, aunque a altas concentraciones (7.5%) se produce un descenso de la frecuencia de germinación que atribuyen a la muerte de filas completas de células en el propio embrión. Como hemos mencionado, en aguacate también se observa ese aumento de tamaño en los embriones somáticos en presencia de PEG, aunque no se produce la conversión a blanco-opacos, hecho que podría indicar que la acumulación de sustancias de reserva no se produce.



**Figura 2.-** Desarrollo de embriones somáticos. **A:** B5m 6g l<sup>-1</sup> agar. **B:** B5m 2.5% sorbitol 6 g l<sup>-1</sup> agar. **C:** B5m 2.5% PEG 6 g l<sup>-1</sup> agar.

	Control	2,5 % PEG	5 % PEG	7,5 % PEG	2,5 % sorbitol	5 % sorbitol	7,5 % sorbitol
% reg ebo	52,64	15,63	13,47	1,67	58,20	37,88	15,27
nºebo/cult	1,65±0.75	0,28±0.05	0,22±0.06	0,01±0.01	1,73±0.66	1,17±0.31	0,29±0.01

**Tabla 2.-** Datos de porcentaje de regeneración (% reg ebo) y número (nº ebo /cult) de embriones somáticos blanco-opacos en medios con diferentes agentes osmóticos.

## Efecto de la fuente de nitrógeno

La incorporación de los aminoácidos de Jensen (Jensen, 1977) al medio de cultivo con embriones zigóticos inmaduros de aguacate tuvo efectos positivos en la maduración de los mismos (Perán-Quesada, 2001). En embriones somáticos, al estudiar el efecto de distintas fuentes de nitrógeno

orgánico, se han observado diferencias significativas entre ellas, obteniéndose también los mejores resultados con la adición de la mezcla de aminoácidos de Jensen (1977). Curiosamente, con cualquiera de las otras fuentes de nitrógeno ensayadas se produce una disminución en la regeneración de blanco-opacos. Además, no se observan diferencias significativas entre la caseína hidrolizada y la glutamina (Tabla 3). Por otra parte, en los medios con extracto de levadura se produce una degeneración del cultivo embriogénico y una muy baja producción de embriones blanco-opacos.

	Control	aa Jensen	250 mg l <sup>-1</sup> ext. levad	500 mg l <sup>-1</sup> ext. levad	250 mg l <sup>-1</sup> glutamina	500 mg l <sup>-1</sup> glutamina	250 mg l <sup>-1</sup> caseína	500 mg l <sup>-1</sup> caseína
% reg ebo	24,72	40	4,44	3,33	25,83	17,50	24,44	12,50
nºebo/cult	0,45±0.02	0,85±0.16	0,07±0.09	0,05±0.06	0,44±0	0,23±0.02	0,44±0.12	0,24±0.26

Tabla 3.- Datos de porcentaje de regeneración (% reg ebo) y número (nº ebo /cult) de embriones somáticos blanco-opacos en medios con diferentes fuentes de nitrógeno orgánico.

## BIBLIOGRAFÍA

AMMIRATO, PV 1987. Organizational events during somatic embryogenesis. En: Plant Tissue and Organ Culture, pp: 57-81. Green, C.E. y col. (Eds). Alan R. Liss. Inc., New York.

ATTREE, SM, POMEROY, MK, FOWKE, LC 1992. Manipulation of culture conditions for culture of somatic embryos of white spruce for improved triacylglycerol biosynthesis and desiccation tolerance. *Planta*, 187: 395-404.

ETIENNE, H, SOTTA, B, MONTORO, P, MIGINIAC, E, CARRON, MP 1993. Comparison of endogenous ABA and IAA contents in somatic and zygotic embryos of *Hevea brasiliensis* Müll. Arg. during ontogenesis. *Plant Sci.*, 92:111-119.

GAMBORG, OL, MULLER, RA, OJIMA, K 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp. Cell Research*, 50: 151-158.

HAKMAN, I, VON ARNOLD, S, 1988. Somatic embryogenesis and plant regeneration from suspension cultures of *Picea glauca* (white spruce), *Physiol. Plant.* 72:579-587.

HETHERINGTON, AM, QUATRANO, RS, 1991. Mechanisms of action of abscisic acid at the cellular level. *New Phytologist*, 119: 9-32.

JENSEN, CJ, 1977. Monoploid production by chromosome elimination. En: Applied and Fundamental Aspects of Plant Cell, Tissue and Organ Culture, pp: 299-340. Reinert, J., Bajaj, Y.P.S. (Eds). Springer-Verlag, Berlín.

JOY, RW IV, YEUNG, EC, KONG, L, THORPE, TA 1991. Development of white spruce somatic embryos. I. Storage product deposition. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 27P: 32-41

MERKLE, SA, PARROT, WA, FLINN, BS 1995. Morphogenic aspects of somatic embryogenesis. En: *In Vitro Embryogenesis in Plants*, pp: 155-204. Thorpe, TA (Ed). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Holand.

MISRA, S, ATTREE, SM, LEAL, I, FOWKE, LC 1993. Effect of abscisic acid, osmoticum, and desiccation on synthesis of storage proteins during the development of white spruce somatic embryos, *Ann. Bot.* 71: 11-22.

MOONEY, 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 tissue cultures. Physiol. Plant., 15: 473-497.

OBENDORF, RL, WETTLAUFFER, SH 1984. Precocious germination during in vitro growth of soybean seeds. Plant Physiol., 76: 1023-1028.

PENCE, VC 1992. Abscisic acid and the maturation of cacao embryos *in vitro*. Plant Physiol., 98: 1391-1395.

PERÁN-QUESADA, R, SÁNCHEZ-ROMERO, C, MÁRQUEZ-MARTÍN, B, BARCELÓ-MUÑOZ, A, PLIEGO-ALFARO, F 2001. Efecto del medio de cultivo sobre la maduración y germinación de embriones somáticos de aguacate. Actas de Horticultura. Vol 28. (1): 111-115.

PERÁN-QUESADA, R 2001. Embriogénesis in vitro de aguacate (*Persea americana* Mill.). Tesis doctoral. Universidad de Málaga, España.

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

SVOBODOVÁ, H, ALBRECHTOVÁ, J, KUMSTYROVÁ, L, LIPAVSKÁ, H, VÁGNER, M, VONDRÁKOVÁ, Z 1999. Somatic embryogenesis in Norway spruce: Anatomical study of embryo development and influence of polyethylene glycol on maturation process. Plant Physiol. Biochem., 37(3): 209-221.

WALKER, KA, SATO, SJ 1981. Morphogenesis in callus tissue of *Medicago sativa*: the role of ammonium ion in somatic embryogenesis, Plant Cell Tiss. Org. Cult., 1: 109-121.

WALKER-SIMMONS, M 1987. ABA levels and sensitivity in developing wheat embryos of sprouting resistant and susceptible cultivars. Plant Physiol., 84: 61-66.

WANG, YC, JANICK, J 1984. Inducing precocious germination in asexual embryos of cacao. HortSci., 19: 839-841.

WITJAKSONO, LITZ, RE 1999. Maturation of avocado somatic embryos and plant recovery. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 58: 141-148.

XU, N, COULTER, KM, BEWLEY, JD 1990. Abscisic acid and osmoticum prevent germination of developing alfalfa embryos, but only osmoticum maintains the synthesis of developmental proteins. Planta, 182: 382-390.