

## INFUENCIA DE ESPACIOS DE CRECIMIENTO, TEMPERATURAS E INTENSIDADES DE LUZ EN LA CONSERVACIÓN *IN VITRO* DE GERMOPLASMA DE AGUACATE

Ma. Ercelia Angel Palomares<sup>1</sup>, Vidales-Fernández I.<sup>2</sup>, Guillén-Andrade H.<sup>2</sup> y Salgado-Garciglia R.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Facultad de Agrobiología, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Uruapan, Michoacán. México. [dcmeangel@yahoo.com.mx](mailto:dcmeangel@yahoo.com.mx) y [dcangel4@hotmail.com](mailto:dcangel4@hotmail.com).

<sup>2</sup>Campo Experimental Uruapan- INIFAP, Uruapan, Michoacán. México, [cefapuru@prodigy.net.mx](mailto:cefapuru@prodigy.net.mx).

<sup>3</sup>Instituto de investigaciones Químico Biológicas. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia, Michoacán. México. [rsalgado@zeus.umich.mx](mailto:rsalgado@zeus.umich.mx).

### RESUMEN

En México existe una amplia diversidad genética de aguacate y sus parientes silvestres actualmente resulta preocupante la pérdida acelerada de su germoplasma debida a la destrucción de los hábitats en las últimas décadas y a su uso como portainjertos del cultivar Hass principalmente, disminuyendo así las plantaciones de aguacate criollo en Michoacán y otros estados de la República Mexicana. Esto ha motivado la conservación *in vitro* de su germoplasma para la creación de nuevas variedades ya que la conservación por métodos tradicionales demanda erogaciones importantes, por la mano de obra, espacio y el riesgo de tener el material expuesto a la presión del ambiente. La conservación *in vitro* es una alternativa ya que al reducir espacio de crecimiento, temperatura e intensidad de luz durante la incubación de yemas axilares provenientes de plantas de aguacate cultivados *in vitro* y conservados también *in vitro* en el medio de Murashige y Skoog (MS), se pudo observar la influencia de estas variables en la inhibición de la brotación de los explantes, además presentaron bajo porcentaje de necrosis y su crecimiento fue mínimo, no afectando la viabilidad de los explantes después de 90 días de su conservación, lo cual se comprobó al colocar las yemas conservadas en el medio de cultivo MS inductor de brotes, obteniéndose de 80 a 90% de brotación.

**Palabras Clave:** germoplasma, *in vitro* y conservación

## INTRODUCCIÓN

En los últimos años, la conservación de los recursos naturales y por ende la reserva genética ha tomado gran importancia en el sentido de eliminar la presión destructiva que existe sobre las plantas que proporcionan alimento y satisfactores al hombre, por factores como la sustitución de genotipos locales por variedades mejoradas e híbridos, crecimiento de las ciudades, ampliación de superficies de los cultivos, sobre explotación de los bosques, cambios en las técnicas agrícolas y el abuso de agroquímicos, la sustitución por variedades seleccionadas y mejoradas para la explotación comercial. En el estado de Michoacán y demás Estados productores de aguacate en la República Mexicana están comprendidos los climas subtropical, templado y templado frío dentro de la llamada Sierra Volcánica Transversal (Eje Neovolcánico). Estas características geográficas y ecológicas han permitido que el aguacate sea originario de México y Centroamérica, ya que en estas áreas se concentran los recursos genéticos del aguacate y especies afines, Sánchez (1999), lo cual ha sido demostrado por su amplia diversidad genética. Los recursos que prosperan en forma silvestre están en peligro de extinción, y en grado menor también lo están aquellos ubicados en áreas urbanas y suburbanas, el aprovechamiento de estos recursos genéticos silvestres (criollos) son considerados como un importante apoyo para la economía de un gran número de familias indígenas, debido a que no exigen mucha atención, soportan condiciones ecológicas adversas y hasta el ataque de plagas y enfermedades, sin embargo, rara vez reciben alguna actividad o práctica de manejo frutícola, además se utilizan como portainjertos para la propagación del aguacate Hass.

Con los portainjertos criollos se han intentando diversos métodos de conservación, los cuales van desde el tradicional banco de semillas hasta el mantenimiento de áreas de reserva naturales, establecimiento de jardines botánicos o huertos fenológicos. Sin embargo en muchos de estos casos el mantenimiento no es factible y en otros resulta prohibitivo, tanto por su alto costo como por el riesgo de pérdidas por manejo inadecuado o desastres naturales. Para la preservación de la variabilidad genética es necesario mencionar que ésta se debe conservar con la mayor integridad posible, por lo que el objetivo de este trabajo fue determinar la influencia de la reducción de espacios de crecimiento, temperatura e intensidad de luz durante la incubación de yemas axilares provenientes de plantas de aguacate cultivados *in vitro*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Para el trabajo se utilizaron microestacas de 8 a 13 mm de longitud con 2 ó 3 yemas axilares procedentes de plántulas generadas *in vitro* de aguacate (*Persea americana*, Mill. var. *drymifolia*), la siembra se hizo en el medio de cultivo de Murashige y Skoog (1962) MS con 30 g/l de sacarosa sin reguladores de crecimiento, con 25 repeticiones en cada caso. En espacios de crecimiento, se probaron 3 tratamientos (tamaños de envases), el tratamiento 1 tubo de ensaye (2.0 x 15 cm) con 10 ml de medio, el tratamiento 2 boca angosta (4.0 x 9.0 cm) con 20 ml de medio y el tratamiento 3 envases boca ancha (5.5. x 7.0 cm diámetro por altura, testigo) con 25 ml de medio. En el estudio de temperatura, se probaron 2 tratamientos: el tratamiento 1 (5°C) y el tratamiento 2 (25°C testigo). Para el trabajo de intensidades de luz, se evaluaron 3 tratamientos: el tratamiento 1 (80 luxes), el 2 (885 luxes) y el tratamiento 3 (2200 luxes testigo). Las condiciones de cultivo para los tratamientos de espacios de crecimiento fue temperatura de 25° C, fotoperíodo de 16 horas luz con una intensidad de 2200 lux y 8 horas de oscuridad, para los tratamientos de temperatura los cultivos de yemas axilares del tratamiento 1 se colocaron a 5° C en un refrigerador, los explantes del tratamiento 2 (25° C) se colocaron en el cuarto de incubación con una tempe-

ratura de 25° C y fotoperíodo de 16 horas luz con una intensidad de 2200 lux y 8 horas de oscuridad, las condiciones de cultivo para los tratamientos de intensidades de luz estuvieron en el cuarto de incubación en temperatura de 25° C con fotoperíodo de 16 horas de luz (variando las intensidades en cada tratamiento) y 8 horas de oscuridad.

En cada uno de los trabajos mencionados se realizaron 5 evaluaciones con intervalos de 20 días, al efectuar dichas evaluaciones cada 20 días, 5 repeticiones de cada uno de los trabajos y de cada tratamiento fueron recultivadas las yemas a medio de cultivo para brotación fue el MS con 0.3 mg/l de bencil adenina (BA) y 30 g/l de sacarosa. Las yemas en el medio para brotación fueron mantenidas en el cuarto de incubación con una temperatura de 25° C, fotoperíodo de 16 horas luz con una intensidad de 2200 lux, las variables evaluadas fueron: sobrevivencia de explantes, brotación y longitud de brotes en mm. La unidad experimental fue un tubo por tratamiento, los datos se sometieron a un diseño completamente al azar para su interpretación estadística.

## RESULTADOS

### Espacios de crecimiento

Con la siembra de las yemas axilares colectadas en campo, en diferentes recipientes de cultivo (espacios de crecimiento), se logró determinar la inhibición o retardo del crecimiento, después de transcurridos 90 días del cultivo *in vitro*. Después de este tiempo de incubación, no se presentó contaminación en ningún tratamiento, fue observado solamente un 10% de brotación en los recipientes más pequeños (tubo de ensayo), porcentaje muy bajo comparado con la brotación en yemas cultivadas en los otros dos recipientes (frascos de boca ancha y angosta con un 90 y 100% respectivamente (Figura 1).

El número y la longitud de brotes determinados, también fue más bajo en el tubo de ensayo, donde se formó sólo un brote de 5 mm de longitud por yema cultivada; en el frasco de boca angosta, se obtuvieron dos brotes con una longitud promedio de 16 mm; y, tres brotes en frascos de boca ancha con una longitud de 20 mm. Con los resultados anteriores, 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*.

### Temperaturas

Al incubar las yemas axilares provenientes de plantas en campo, en dos temperaturas (5°C y 25°C), se pudo determinar la más adecuada para la conservación *in vitro*, ya que los resultados mostraron un 90% de supervivencia después de 90 días a 5°C, contra un 78% de supervivencia al incubarlas a 25°C. A 5°C, tanto el porcentaje de brotación como la longitud de los brotes, fue menor que al incubar las yemas en la temperatura tradicional de cuarto de cultivo (25°C), se presentó un 10% de brotación con brotes de 5 mm de longitud en contra de un 90% de brotación y brotes de hasta 27 mm en 25°C (Figura 2). Los resultados determinados 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.

### Intensidad de luz

Al cultivar *in vitro* las yemas axilares de aguacate colectadas en campo, en las tres diferentes intensidades de luz (80, 880 y 2200 lux), dio como resultado la determinación de la mejor condición

de incubación donde hubo retardo en el crecimiento y desarrollo de los explantes. Después de 90 días de conservación, se observó el porcentaje más bajo de brotación así como en la longitud de éstos, en la condición de 80 lux, con un 5% de brotación y brotes de menos de 5 mm (Figura 3), en los tratamientos en 880 lux y 2200 lux, se presentó un 70% y 90% de brotación, con brotes de longitud promedio de 10 y 17 mm respectivamente. Estos datos mostraron diferencias significativas, siendo el tratamiento de 80 lux, donde las yemas axilares se mantuvieron sin cambio, con un alto porcentaje de supervivencia. Pudo constatar que 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*.

## DISCUSIÓN

En el espacio de crecimiento el tamaño de los recipientes para el cultivo *in vitro* de las yemas axilares de aguacate criollo, fue definitivo para lograr detener o retardar el crecimiento y desarrollo de éstas, ya que en el recipiente con menor espacio de crecimiento (tubo de ensayo) se inhibió hasta en un 90% el índice de brotación, con el número y crecimiento mínimo de los brotes inducidos (Figura 1). En el recipiente con mayor espacio de crecimiento pudo observarse hasta un 100% de brotación, con tres brotes por yema axilar y con 20 mm de longitud. El porcentaje de supervivencia de las yemas mantenidas en tubos de ensayo fue de 90%, por lo que estos recipientes resultaron los más adecuados para la conservación *in vitro* de las yemas axilares de aguacate criollo, ya que en ellos se logró la inhibición del crecimiento y desarrollo de las yemas axilares, sin afectar su viabilidad o supervivencia.

Estos resultados coinciden con Pierik (1990), quien menciona que el tipo de recipiente para cultivo, la forma y tamaño, y el sistema de cierre, influyen en la morfogénesis de los explantes cultivados *in vitro*. Righetti y col. (1990) indican que el control del crecimiento es dado por afectarse los procesos de diferenciación y morfogénesis al acumularse gases y otros compuestos orgánicos, dependiendo del tamaño y sellado de los recipientes de cultivos *in vitro*. Los tubos de ensayo fueron escogidos como los recipientes de cultivo para realizar los estudios posteriores de conservación *in vitro* de yemas axilares de aguacate.

La temperatura es otro factor importante que afecta el crecimiento de tejidos *in vitro*, es el control de la temperatura de incubación, debido a que influye directamente sobre la regulación del metabolismo primario o secundario, dirigiendo entre otros, el desarrollo de los procesos fisiológicos (Plucknett y Williams, 1992). Con la siembra de yemas axilares de aguacate criollo por 90 días en la temperatura de 5°C, se inhibió la inducción de brotes hasta en un 90% y la elongación de la yema axilar (Figura 2). Al contrario, los cultivos conservados a 25°C, siguieron un desarrollo normal de los cultivos *in vitro*, presentando formación de brotes y el crecimiento de éstos. Esta inhibición de la formación de brotes pero manteniendo óptimos porcentajes de viabilidad de los explantes después de mantenerse hasta 90 días en cultivo, se ha observado al cultivarse tejidos en temperaturas bajas (0-5 °C), permitiendo aumentar los periodos de dormancia de algunas plantas leñosas y la conservación prolongada de determinados cultivos *in vitro*; mientras que a temperaturas constantes comunes de cuartos de cultivo (20°C), se inducen los procesos de morfogénesis como la organogénesis y la embriogénesis somática (Cañal et al., 1999; Stalker y Chapman, 1999), no consiguiendo la conservación a mediano plazo. El lograr porcentajes de supervivencia de más del 90% de las yemas axilares de aguacate criollo al cultivarse a una temperatura de 5°C por 90 días, sin presentarse la formación de brotes, indica que este método es adecuado para su conservación a mediano o largo plazo, ya que por su respuesta, es posible mantenerlas por más tiempo bajo esas condiciones de cultivo. Aunque estos resultados son muy favorables para conservar *in vitro* aguacate, fue necesario realizar otros estudios para optimizar este tipo de conservación.

También las respuestas morfogénicas son alteradas por la calidad, intensidad y periodos de luz, a las cuales se incuban los explantes para su cultivo y conservación *in vitro*, aunque depende de la especie vegetal y el objetivo a investigar (Cañal *et al.*, 1999). Para el caso de las yemas axilares de aguacate criollo cultivadas *in vitro* a diferentes intensidades de luz (80, 880 y 2000 lux), se observó que en la intensidad más baja se logró mantener inhibida la formación de brotes, intención buscada en esta investigación. Esta disminución de la formación de brotes en las yemas axilares de aguacate criollo encontradas al incubarse en una intensidad de 80 lux (Figura 3), comprueba lo reportado por Cañal y col. (1999), quienes indican que las necesidades de luz de los cultivos *in vitro* son inferiores a las de la planta *in vivo* para presentar un desarrollo normal, dado que el medio de cultivo contiene cantidades importantes de sacarosa como fuente de carbono, comportándose como cultivos autótrofos. En las intensidades media (880 lux) y relativamente alta (2200 lux), hubo formación de brotes y elongación de éstos en relación directa, debido a que con una irradiación normal a excesiva (1000 a 5000 lux) se produce un aumento notable en la temperatura dentro del recipiente de cultivo, lo que causa la aceleración de procesos de morfogénesis; al contrario, el cultivar a intensidades bajas de luz (<1000 lux), disminuye aún más la tasa de fotosíntesis y los procesos de nutrición, que conllevan a detener los procesos más comunes de morfogénesis *in vitro*, como la formación de brotes y de raíces.

En general, cada especie tiene un intervalo específico de temperatura en el que se produce su desarrollo y crecimiento óptimo, intervalo que puede variar en función del genotipo, del órgano donador del explante, de la época del año, edad y estado fenológico de la planta donadora. Una complicación adicional se produce por el hecho de que puede existir interacción entre la temperatura y otros factores como la luz (intensidad y fotoperiodo), sustrato y nutrición. Esta respuesta es clara al cultivarse las yemas axilares de aguacate criollo en los diferentes recipientes, temperaturas e intensidades de luz, proponiendo cultivar este tipo de explantes en un recipiente pequeño, temperatura e intensidad de luz relativamente bajas, para lograr la conservación de este tipo de explantes a mediano plazo.

## CONCLUSIONES

Se logró establecer un sistema de conservación *in vitro* a mediano plazo de yemas axilares de aguacate reduciendo el espacio de crecimiento, disminuyendo la temperatura y la intensidad de luz durante la incubación de los explantes.

## BIBLIOGRAFIA

CAÑAL M. J., RODRÍGUEZ R., FERNÁNDEZ B., SÁNCHEZ-TAMÉZ R. Y MAJADA J. P. 1999. Biotecnología Vegetal. Libro de reportes cortos, 5º Coloquio Internacional de Biotecnología Vegetal. Instituto de Biotecnología de Plantas. Junio 16-19 de 1999. Ediciones GEO. La Habana, Quinto Santa Clara. Cuba pp. 17-25.

MURASHIGE T. Y F. SKOOG. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol Plant.* 15: 443-497.

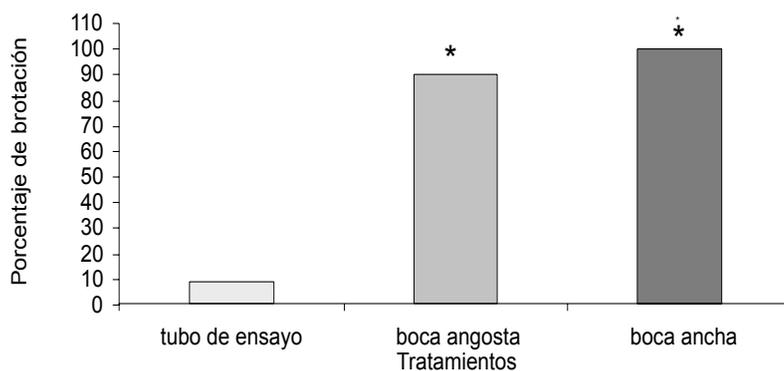
PIERIK R. L. M. 1990. Cultivo *in vitro* de plantas superiores. Ed. Mundi-Prensa. Madrid España 325 p.

PLUCKNETT D. L. Y WILLIAMS J. T. 1992. Los bancos genéticos y la alimentación mundial. Instituto Iberoamericano de Cooperación para la Agricultura Tropical San José Costa Rica. pp. 25-125.

RIGHETTI, B., MAGNANNI, E., INFANTE, R. Y PEDREN, S. 1990. Ethylene, etanol acetaldehyde and carbon dioxide released by *Prunus avium* shoot cultures. *Physiol. Plant.* 78: 507-510.

SÁNCHEZ J. L. 1999. Recursos Genéticos de Aguacate (*P. americana* Mill) y especies afines en México. Rev. Chapingo. Serie Horticultura. Universidad Autónoma Chapingo. Vol. V. Núm. Especial. 1999. p. 7 – 18.

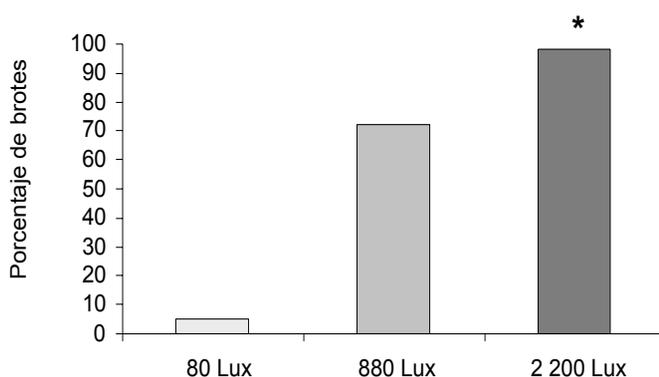
STALKER J. T. Y CHAPMAN 1989. Scientific management of germoplasm: characterization, evaluation and enhancement. Department of Crop University North Carolina State University. pp 23 – 28.



**Figura 1.** Porcentaje de brotes en yemas axilares de aguacate (*P. americana* Mill. var. *drymifolia*) colectadas en campo, después de 90 días en medio de cultivo en diferentes espacios de crecimiento (tubo de ensayo, frasco de boca angosta y frasco de boca ancha), prueba de Tukey ( $\alpha = 0.05$ ). Diferencias significativas (\*).



**Figura 2.** Porcentaje de supervivencia y de brotación y longitud de brotes) a los 90 días de conservación *in vitro* de yemas axilares de aguacate (*P. americana* Mill. var. *drymifolia*) colectadas en campo, en condiciones de cultivo de 5°C y 25°C, prueba de Tukey ( $\alpha = 0.05$ ). Diferencias significativas (\*).



**Figura 3.** Porcentaje de brotación a los 90 días de conservación *in vitro* de yemas axilares de aguacate (*P. americana* Mill. var. *drymifolia*) colectadas en campo, en tres intensidades de luz: 80, 880 y 2200 lux, prueba de Tukey ( $\alpha = 0.05$ ). Diferencias significativas (\*).