



TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO
Instituto Tecnológico de Roque



INSTITUTO TECNOLÓGICO DE ROQUE

T E S I S

REGENERACIÓN Y TRANSFORMACIÓN DE AGUACATE CRIOLLO (*Persea americana* Mill. var. *Drymifolia*)

QUE PRESENTA

ANARELI QUINTERO JIMÉNEZ

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE

DOCTORA EN CIENCIAS EN PRODUCCIÓN AGROALIMENTARIA

DIRECTOR: GABRIEL ITURRIAGA DE LA FUENTE

ROQUE, CELAYA, GUANAJUATO, MÉXICO

NOVIEMBRE DE 2020

La tesis “**Regeneración y Transformación de Aguacate Criollo (*Persea americana* Mill. var. *Drymifolia*)**”, fue realizada por la alumna **Anareli Quintero Jiménez**, bajo la dirección del Dr. Gabriel Iturriaga de la Fuente y asesoría de Dr. Cesar Leobardo Aguirre Mancilla, revisada y aprobada por el H. Comité Tutorial conforme a las Bases Normativas para la elaboración de Tesis de Posgrado del Tecnológico Nacional de México, como requisito parcial para la obtención del grado de:

DOCTORA EN CIENCIAS EN PRODUCCIÓN AGROALIMENTARIA

H. COMITÉ TUTORIAL

Director:

[Dr. Gabriel Iturriaga de la Fuente]

Cedula: 7625496

Co-Director:

[Dr. Cesar Leobardo Aguirre Mancilla]

Cedula: 4798239

Asesor:

[Dr. Juan Gabriel Ramírez Pimentel]

Cédula: 487564

Asesor:

[Dr. Juan Carlos Raya Pérez]

Cedula: 4798249

Asesor:

[Dr. Ahuizotl de Jesús Joaquín Ramos]

Cedula: 09948918

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Gabriel Iturriaga de la Fuente por aceptarme en su equipo de trabajo, por sus enseñanzas, confiar en mí y por ayudarme a ser mejor cada día.

Al Dr. Cesar Aguirre Mancilla por su asesoría y apoyo.

Al Dr. Juan Carlos Raya Pérez y al Dr. Juan Gabriel Ramírez Pimentel por aceptar ser parte de mi comité de asesores, por sus todos sus consejos y apoyo.

A la M. en C. Elenita Heredia por apoyarme con el material vegetal y siempre tener tanta disposición y ganas de colaborar.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por otorgarme la beca de estudio con el número 421331.

	Pág.
Índice	i
Índice de tablas	iv
Índice de figuras	v
Resumen	vi
Summary	viii
I Introducción	1
II Objetivos	3
2.1 Objetivo general	3
2.2 Objetivos específicos	3
2.3 Hipótesis	3
III Revisión de literatura	4
3.1 Taxonomía	4
3.2 Origen y distribución	4
3.3 Razas de aguacate	6
3.4 El cultivo de aguacate	8
3.5 Importancia económica	9
3.6 Características nutricionales del aguacate	11
3.7 Características nutricionales de aguacate de raza mexicana	11
3.8 Mejoramiento genético convencional	11
3.9 Cultivo de tejidos vegetales	12

3.9.1	Micropropagación clonal	13
3.9.2	Organogénesis	14
3.9.3	Organogénesis de árboles frutales	16
3.9.4	Organogénesis de Aguacate	18
3.9.5	Embriogénesis somática	21
3.9.6	Embriogénesis somática de árboles frutales	25
3.9.7	Embriogénesis somática de aguacate	26
3.10	Transformación genética	29
3.10.1	Transformación genética de aguacate	30
IV	Materiales y Métodos	32
4.1	Material Vegetal	32
4.2	Inducción de la embriogénesis directa los embriones somáticos	32
4.3	Embriogénesis indirecta	32
4.4	Mantenimiento de callos embriogénicos	33
4.5	Maduración de embriones somáticos	33
4.6	Germinación de embriones maduros	33
4.7	Inducción de la organogénesis	34
4.8	Crecimiento y enraizamiento de las plántulas y brotes adventicios	34
4.9	Experimentos de selección con kanamicina	35
4.10	Preparación de células competentes de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	35
4.11	Transformación por choque térmico	35
4.12	Condiciones de transformación con el gen <i>uidA</i> (GUS)	36

4.13	Procedimiento de transformación	37
4.14	Análisis estadístico	37
V	Resultados y Discusión	39
5.1	Embriogénesis directa	39
5.2	Embriogénesis indirecta	42
5.3	Morfología de los brotes de embriones somáticos opacos blancos	44
5.4	Organogénesis	44
5.6	Dosis respuesta con Kanamicina	47
5.7	Transformación de aguacate	48
VI	Conclusiones	52
VII	Literatura citada	53

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 3.1 Diferencias entre las razas de aguacate (<i>Persea americana</i> Mill.)	7
Tabla 3.2 Cultivos más importantes del mundo regenerados <i>in vitro</i> por la vía de organogénesis	14
Tabla 3.3 Regeneración <i>in vitro</i> de árboles frutales por la vía de la organogénesis	17
Tabla 3.4 Regeneración <i>in vitro</i> de aguacate por medio de organogénesis	19
Tabla 3.5 Cultivos más importantes del mundo regenerados <i>in vitro</i> por la vía de embriogénesis somática	24
Tabla 3.6 Especies de árboles frutales regenerados por embriogénesis somática	25
Tabla 3.7 Regeneración <i>in vitro</i> de aguacate a través de embriogénesis somática	28
Tabla 5.1 Embriogénesis somática de <i>P. americana</i> var. <i>Drymifolia</i> accesión San Miguel.	41
Tabla 5.2 Regeneración de callos embriogénicos de <i>P. americana</i> var. <i>Drymifolia</i> accesión San Miguel	43
Tabla 5.3 Regeneración <i>in vitro</i> por organogénesis de diferentes accesiones de aguacate (<i>Persea americana</i> var. <i>Drymifolia</i>).	46

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.	
Figura 3.1	Glifo representando al poblado de Ahuacatlán que significa lugar donde abunda el aguacate y del lado derecho el glifo de ahucacahuitl	5
Figura 3.2	Distribución del aguacate después de la llegada de los españoles	5
Figura 3.3	Frutos de aguacate de las tres razas. De izquierda a derecha: raza antillana, raza guatemalteca y raza mexicana	6
Figura 3.4	Superficie y producción de aguacate 2018-2019	10
Figura 3.5	Exportación de aguacate mexicano cifras en millones de dólares	10
Figura 3.6	Vías de regeneración <i>in vitro</i> por organogénesis directa e indirecta	16
Figura 3.7	Embriogénesis zigótica de una planta	22
Figura 4.1	Construcción el gen marcador selectivo neomicina fosfotransferasa II (<i>nptII</i>), que confiere resistencia a kanamicina, y el gen <i>uidA</i> que codifica para GUS bajo el control del promotor 35S	37
Figura 5.1	Embriogénesis somática directa en <i>P. americana</i> var. <i>Drymifolia</i>	41
Figura 5.2	Embriogénesis somática indirecta en <i>P. americana</i> var. <i>Drymifolia</i>	43
Figura 5.3	Diferencias morfológicas en la germinación de los embriones somáticos maduros	44
Figura 5.4	Regeneración de plantas de <i>P. americana</i> var. <i>Drymifolia</i> mediante organogénesis	46
Figura 5.5	Dosis respuesta de callos embriogénicos en seis concentraciones en mg/L de kanamicina	48
Figura 5.6	Masas proembriogénicas (MPE) con actividad β -glucuronidasa en cocultivo	50
Figura 5.7	Callos en estado globular con actividad β -glucuronidasa	51

RESUMEN

La producción de aguacate criollo (*Persea americana* Mill. var. *Drymifolia*) necesita mejoras para su multiplicación, conservación y mejoramiento genético ya que esta variedad es ampliamente usada como portainjerto. La organogénesis y la embriogénesis somática y la transformación genética son técnicas efectivas para conseguir estos objetivos. Se evaluaron cinco accesiones de aguacate var. *Drymifolia*. Para la embriogénesis somática, embriones cigóticos (EC) de frutos inmaduros se utilizaron como explante y fueron cultivados en medio con diferentes concentraciones de auxinas ácido 1- naftalenacético (ANA) 2, 5 o 10 mg L⁻¹, ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) 5 o 10 mg L⁻¹ o ácido 4-amino-3,5,6-tricloropicolínico (Picloram) 0.05, 0.1 o 0.2 mg L⁻¹. Los embriones somáticos (ES) maduros se germinaron con 0.5 mg L⁻¹ de 6-N- bencil amino purina (BAP) y 1 mg L⁻¹ de ácido giberélico (GA₃). Solo la accesión San Miguel presentó embriogénesis directa. El mayor número de plantas por explante en promedio se obtuvo con 0.2 mg L⁻¹ de Picloram (0.46) y 10 mg L⁻¹ de ANA (0.40). En la embriogénesis indirecta la accesión San Miguel formó callos en 0.2 mg L⁻¹ de Picloram. Se obtuvieron 4.5 plantas completas en promedio por cada 50 mg de callo, el cual conservó su potencial de regeneración hasta por 6 meses. En la organogénesis se cultivaron EC inmaduros decapitados de cinco accesiones en medio con reguladores de crecimiento (0.5 mg L⁻¹ de BAP y 1 mg L⁻¹ de GA₃) o sin ellos. Comonfort 53 tuvo en promedio mayor número de plantas por explante (0.54). Para la transformación genética se utilizaron Masas proembriogénicas como explante y se inocularon con la cepa EHA105 de *Agrobacterium tumefaciens* portando el vector pBI121 con el gen reportero *uidA* que codifica para enzima β-glucuronidasa (GUS). Se realizaron ensayos a diferentes concentraciones de acetociringona (20, 50, 200 y 400 μM), tres diferentes densidades ópticas (0.4, 0.6 y 0.8) y dos tiempos en cocultivo (24 y 48 h). Se encontró que la mayor eficiencia de transformación se obtuvo con concentraciones de 50 μM de acetociringona y una DO_{600nm} de 0.6 y 48 h en cocultivo. Con estas condiciones (50 μM de acetociringona, DO_{600nm} 0.6 y 48 h en cocultivo) se

inocularon callos embriogénicos con las cepas EHA105 y LBA4404, donde los callos inoculados con la cepa EHA105 muestra mayor actividad de GUS. Estos resultados permitieron identificar las condiciones para la regeneración de plantas de aguacate a partir de EC y ES, y por otro lado, para la transformación de aguacate criollo con el gen reportero GUS a partir de masas proembriogénicas y callos embriogénicos.

SUMMARY

The production of native avocado (*Persea americana* Mill. var. *Drymifolia*) needs improvements for its multiplication, conservation and genetic improvement since this variety is widely used as a rootstock. Organogenesis and somatic embryogenesis and genetic transformation are effective techniques to achieve these goals. Five accessions of avocado var. *drymifolia*) were tested. For somatic embryogenesis, zygotic embryos (ZE) of immature fruits were used as explants and were cultured in medium with different concentrations of auxins. 1-Naphthaleneacetic acid (ANA) 2, 5 or 10 mg L⁻¹, 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) 5 or 10 mg L⁻¹ or 4-amino-3,5,6-trichloropicolinic acid (Picloram) 0.05, 0.1 or 0.2 mg L⁻¹. The mature somatic embryos (SE) were germinated with 0.5 mg L⁻¹ of 6-N-Benzyl amino purine (BAP) and 1 mg L⁻¹ of Gibberellic acid (GA3). Only the San Miguel accession presented direct embryogenesis. The highest number of plants per explant on average was obtained with 0.2 mg L⁻¹ Picloram (0.46) and 10 mg L⁻¹ ANA (0.40). In indirect embryogenesis, the San Miguel accession formed calluses in 0.2 mg L⁻¹ Picloram. 4.5 complete plants were obtained on average for each 50 mg of callus, which conserved its regeneration potential for up to 6 months. In organogenesis, decapitated immature ZEs from five accessions were cultured in medium with growth regulators (0.5 mg L⁻¹ of BAP and 1 mg L⁻¹ GA3) or without them. Comonfort 53 had on average a higher number of plants per explant (0.54). For the genetic transformation, proembryogenic masses were used as explants and they were inoculated with the *Agrobacterium tumefaciens* strain EHA105 carrying the pBI121 vector with the *uidA* reporter gene that encodes the β -glucuronidase enzyme (GUS). Assays were carried out at different concentrations of acetocryngone (20, 50, 200 and 400 μ M), three different optical densities (0.4, 0.6 and 0.8) and two times in coculture (24 and 48 h). It was found that the highest transformation efficiency was obtained with concentrations of 50 μ M acetocryngone and an OD_{600nm} of 0.6 and 48 h in coculture. With these conditions (50 μ M of acetocryngone, OD_{600nm} 0.6 and 48 h in coculture) embryogenic calli were inoculated with the EHA105 and LBA4404 strains, where the calli inoculated with the

EHA 105 strain showed greater GUS activity. These results made it possible to identify the conditions for avocado plants regeneration from ZE and SE, and on the other hand, for native avocado transformation with the GUS gene from pro-embryogenic masses and embryogenic calli.

I. INTRODUCCIÓN

El aguacate (*Persea americana* Mill.) es uno de los frutos más importantes del mundo; ha sido reconocido por sus beneficios a la salud y descrito como el más nutritivo de todos los frutos, especialmente por los beneficios de sus ácidos grasos, por lo que se ha convertido en una parte importante de la dieta en muchos países (Fonseca *et al.*, 2016). Según la FAO, México es el mayor productor de aguacate, que corresponde al 25% de la producción mundial (FAOSTAT, 2018).

Los principales factores que limitan la producción de aguacate son las plagas, las enfermedades (Ploetz, *et al.*, 2015; Sharma *et al.*, 2017) y los factores abióticos (Bonomelli *et al.*, 2018). El incorporar nuevas características en el aguacate mediante el mejoramiento genético es complicado, ya que tiene un período vegetativo largo de aproximadamente 6 a 8 años, y las autopolinizaciones son difíciles debido a la protoginia (Gazit y Degani, 2002; Imbert, 1997). Por lo tanto, la producción comercial de aguacate se basa en injertar variedades en portainjertos que confieren translocación mineral (Whiley *et al.*, 1990), tolerancia a la salinidad (Álvarez-Acosta *et al.*, 2018) o tolerancia a la pudrición de la raíz (van den Berg *et al.*, 2018). Algunos de estos portainjertos son híbridos de razas guatemaltecas o mexicanas; por ejemplo, *P. americana* var. *Drymifolia* es una raza mexicana que se usa frecuentemente como portainjerto en los huertos en nuestro país (Rincón-Hernández *et al.*, 2011). Por lo que es de gran importancia implementar su propagación clonal, conservación de germoplasma y mejoramiento genético. Para la conservación o mejoramiento genético *in vitro* se requiere tener un sistema de regeneración de una planta completa a través de la embriogénesis somática o la organogénesis adventicia. En la organogénesis los brotes pueden formarse directamente del explante o indirectamente a partir de callos. En contraste, la embriogénesis somática es un proceso que implica la formación de embriones a partir de células somáticas vegetales y comparado con la organogénesis es un proceso más lento e implica un riesgo de variación somaclonal (Feher, 2019). La eficiencia de regeneración de plantas de aguacate por organogénesis *in vitro* a partir de tejidos asexuales de árboles es baja y dependiente de la variedad (Bandaralage *et al.*, 2017). Algunos

reportes de micropropagación tuvieron éxito utilizando explantes nodales, tejidos juveniles y brotes axilares de plántulas de aguacate (Martínez-Pacheco *et al.*, 2010). Sin embargo, los obstáculos para el establecimiento *in vitro* de aguacate han sido la contaminación por bacterias, hongos y el oscurecimiento del explante (Nhut *et al.*, 2008). La regeneración del aguacate por embriogénesis somática se ha descrito en diferentes cultivares como Hass (Pliego-Alfaro y Murashige, 1988), Duke (Mooney y Van Staden, 1987), T372 (Witjaksono *et al.*, 1998), Anaheim (Perán-Quesada *et al.*, 2004), Duke 7 (Márquez-Martín *et al.*, 2012) y Reed (Encina *et al.*, 2014).

Para estudiar la vía de regeneración embriogénica del aguacate se han utilizado diferentes explantes, como embriones zigóticos inmaduros en estadio globular o nucela (Pliego-Alfaro y Murashige, 1988; Raviv *et al.*, 1998; Suárez *et al.*, 2006; Witjaksono y Litz, 1999), pero aún no se ha reportado un sistema de embriogénesis para la variedad Drymifolia.

En la actualidad, varias técnicas de ingeniería genética son utilizadas en el mejoramiento de variedades de aguacate, como por ejemplo la inserción de ADN foráneo por medio de la transformación con *Agrobacterium tumefaciens* donde se obtuvieron líneas transformadas con genes que codifican para proteínas antimicrobianas (Litz *et al.*, 2005; Litz *et al.*, 2007; Raharjo *et al.*, 2008 Palomo *et al.*, 2011;) y con el gen reportero β -glucoronidasa (*GUS*) (Cruz *et al.*, 1998; Muhamad *et al.*, 2012). Los casos exitosos de transformación se lograron utilizando cultivos embriogénicos derivados de embriones zigóticos inmaduros (Cruz *et al.*, 1998; Perán-Quesada *et al.*, 2004; Litz *et al.*, 2005; Litz *et al.*, 2007; Palomo *et al.*, 2011; Muhamad *et al.*, 2012; Márquez-Martín *et al.*, 2012; Raharjo *et al.*, 2013; Lopez *et al.*, 2014).

En este trabajo se desarrolló un método para la regeneración y transformación de aguacate var. Drymifolia que establece un precedente para que en futuros trabajos se establezcan protocolos más eficientes.

II. OBJETIVOS

2.1. Objetivo general

- Obtener un sistema de regeneración y transformación de *Persea americana* Mill. var. *Drymifolia*.

2.2. Objetivos específicos

- Generar un sistema de regeneración *in vitro* de embriones somáticos obtenidos de embriones zigóticos inmaduros utilizando diferentes accesiones, concentraciones y reguladores de crecimiento.
- Identificar una cepa de *Agrobacterium tumefaciens* donde se mayor actividad glucoronidasa (*GUS*)
- Evaluar concentraciones de acetociringona, densidad óptica y tiempo en cocultivo de los explantes de aguacate.

2.3. Hipótesis

Dadas las referencias de transformación con aguacate *Persea americana* var. Hass es posible la regeneración y transformación de aguacate criollo (*Persea americana* var. *Drymifolia*).

III. REVISIÓN DE LITERATURA

3.1 Taxonomía

El aguacate *Persea americana* pertenece a la familia de las Lauraceas. Es una especie diploide ($2n = 2x = 24$) con un tamaño de genoma de 8.83×10^8 bp. la cual comprende alrededor de 2 200 especies. La Laureaceas están consideradas entre las plantas con flores más antiguas junto con las Annonaceae, Magnoliaceae y Proteaceae. En esta familia se encuentran plantas leñosas que producen esencias como, la canela (*Cinnamomum verum* J.), el alcanfor (*Cinnamomum camphora* L.) y laurel (*Laurus nobilis* L.). Sin embargo, dentro de las Lauraceas, el aguacate es el de mayor importancia económica (Rendón-Anaya, *et al.*, 2019). El género *Persea* contiene aproximadamente 85 especies, y se localizan principalmente desde el sur de los Estados Unidos de Norteamérica (*Persea borbonia* L.) hasta Chile (*Persea lingue* Nees) El aguacate es del género *Persea*, y está dividido en dos subgéneros: *Persea* y *Eriodaphne*. Lo que distingue a estos dos subgéneros es la pubescencia de la cara interior de los sépalos. *Persea* pubescentes las dos caras pubescentes y en *Eriodaphne* la cara del interior no es pubescente (Barrientos-Priego y López y López, 2000).

3.2 Origen y distribución

El aguacate es un árbol originario de Mesoamérica. Específicamente del sur de México (Chiapas) y los países de Honduras y Guatemala y se considera que en estas áreas fue domesticado (Whiley, 1992).

Existen evidencias que datan de los años 8,000-7,000 AC de que el vestigio más antiguo de aguacate fue localizado en una cueva de Coxcatlán de Tehuacán Puebla.

El códice Florentino indica que las culturas antiguas conocían el aguacate y su diversidad, donde ellos llamaban a la raza guatemalteca “quilaoacatl, “tlacacolaocatl” a la raza antillana y “aoacatl” a la mexicana. En el códice Mendoza se encontraron hay glifos que representan el pueblo de “Aguacatlán” que significa, “lugar donde abunda el aguacate”. Esta descripción se utilizaba para identificar la mercancía que

venía de ese poblado y al la cual se le denominaba “ahucacahuitl” (Figura 3.1) (Barrientos-Priego *et al.*,2000)

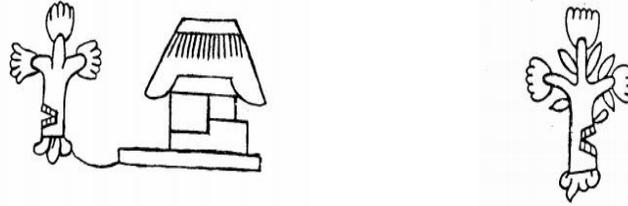


Figura 3.1. Glifo representando al poblado de Ahuacatlán que significa lugar donde abunda el aguacate y del lado derecho el glifo de ahucacahuitl (Dibujado en el códice Mendoza).

El aguacate se ha cultivado desde el Rio Bravo hasta Perú desde antes de la llegada de los europeos al continente americano. Desde la antigüedad este fruto ha sido fundamental para la alimentación en México y Centroamérica. Los aguacates fueron distribuidos en España (1600 d.C.) y África occidental (1750 d.C.). Se introdujo en Indonesia (siglo XVIII) y Brasil (siglo XIX) y se llevó desde México a Florida en 1833 a California en 1848 y Palestina en 1908 (Figura 3.2) (Barrientos-Priego y López y López, 2000).

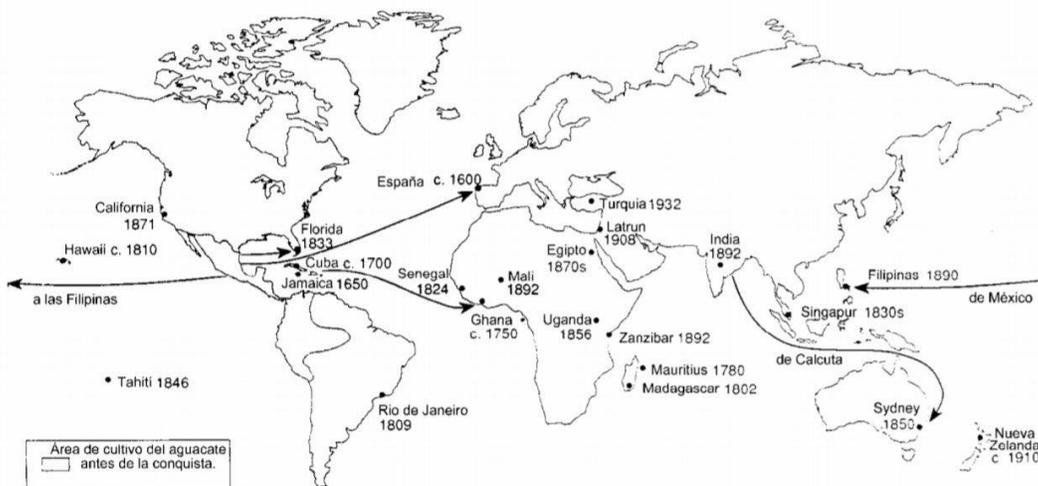


Figura 3.2 Distribución del aguacate después de la llegada de los españoles (Smith *et al.*, 2018).

3.3 Razas de aguacate

Están identificadas tres razas de aguacate, mexicana, guatemalteca y antillana (Figura 3.3). En cuanto a la clasificación botánica algunos reportes indican que la raza mexicana debe ser clasificada como una especie aparte, *Persea drymifolia*. Sin embargo, a las tres razas les considera *Persea americana* Mill. En 1987 Bergh y Ellstrand clasificaron las razas de aguacate como variedades botánicas. A la raza mexicana como la variedad botánica *Drymifolia*, la raza guatemalteca como var. *Guatemalensis* y a la raza Antillana como var. *Americana*.

Existen características que hacen diferentes a las razas entre sí, como diferencias botánicas, hábitos de crecimiento, adaptación a zonas geográficas y climas resistencia al frío o salinidad, entre otras (Tabla 3.1).



Figura 3.3 Frutos de aguacate de las tres razas. De izquierda a derecha: raza antillana, raza guatemalteca y raza mexicana (Barrientos-Priego, *et al.*, 1996).

Tabla 3.1 Diferencias entre las razas de aguacate (*Persea americana* Mill.)

(Modificado de Barrientos-Priego y López-López, 2002).

Caracter	Raza Mexicana	Raza Guatemalteca	Raza Antillana
Clima	Semitropical a templado	Subtropical	Tropical
Altitud sobre el nivel del mar	Sobre 2000 m	Entre 1000 y 2000	Menos de 1000
Resistencia a salinidad	Menor	Menor	Mayor
Resistencia a frío	Mayor	Intermedia	Menor
Hojas			
Tamaño	Menor	Intermedio	Mayor
Color	Verde oscuro	Verde oscuro	Verde pálido
Olor	Olor a anís	Sin olor a anís	Sin olor a anís
Flor			
Pubescencia	Mas	Menos	Menos
Fruto			
Tamaño	Variable, tendiente a pequeños	Intermedios	variable, tendientes a grandes
Cáscara	Delgada, lisa y suave	Gruesa, quebradiza y rugosa	Grosor mediano, flexible y suave
Semilla	Adherida o suelta, cotiledones lisos o ligeramente rugosos	Adherida y cotiledones lisos	Suelta y cotiledones rugosos
Aceite	Alto contenido	Mediano contenido	Bajo contenido
Sabor	A especia y por lo general a anís	Ligero, en ocasiones nogado	Ligero y frecuentemente dulce, con un ligero amargor al final
Fibra en la pulpa	Común	No Común	No común
Tiempo de flor a fruto	6-9 meses	10-16 meses	5 a 9 meses

3.4 El cultivo de aguacate

El aguacate es un cultivo sensible a factores edáficos. Requiere suelos de textura media, bien drenados y con buena aireación; pH de 5.5 a 7.5, con profundidad mayor a 1.5 m, ricos en materia orgánica, y muy fértiles.

Los cultivos de aguacate son sensibles las condiciones de salinidad, si existe una conductividad eléctrica mayor a 4 dS/m la planta se ve afectada. Los portainjertos de raza antillana son tolerantes a la salinidad mientras que los de raza mexicana son susceptibles (Whiley, 1992). Debido a esto, el cultivo de aguacate solo se desarrolla bien en ambientes particulares. La raza Antillana es más sensible al frío que la guatemalteca y la mexicana, ya que el origen de esta es el trópico, mientras que la raza mexicana es más tolerante al frío, ya que se originó en mayores altitudes (Ben-Ya'acov, 1972).

El aguacate está tiende hacia mantener su etapa vegetativa en lugar de pasa a la fase reproductiva de producción de frutos (Whiley *et al.*, 1992) debido a un comportamiento adaptativo de competencia por la luz en las selvas tropicales. El árbol de aguacate cultivado comercialmente florece abundantemente, pero solo un bajo porcentaje de las flores dan fruto esto puede deberse a que su polinización es entomófila y depende totalmente de la presencia de insectos.

Las prácticas agrícolas como el riego, poda, selección de plántulas y portainjertos y variables ambientales (temperatura, luz y precipitación) contribuyen al cantidad y calidad producto final de aguacate. Las prácticas de manejo pueden modificarse para mejorar el rendimiento y la calidad del fruto reconociendo las etapas de crecimiento y entendiendo sus requisitos e interacciones dentro del árbol (Whiley *et al.*, 1992).

Las condiciones nutricionales durante el crecimiento y la maduración del fruto del aguacate determinan la composición mineral de la fruta en la cosecha. El cultivo es muy demandante de nitrógeno, fósforo y potasio, así como de elementos menores como magnesio, hierro y zinc. El árbol de aguacate es muy sensible a salinidad. La conductividad eléctrica mayor a 4 dS/m afecta el crecimiento de la planta. Minerales, como el nitrógeno (N), el boro (B), el magnesio (Mg) y el potasio (K), se han correlacionado con la calidad de la fruta de aguacate, incluyendo el tamaño y la

forma de la fruta, el tiempo de maduración y la susceptibilidad a las pudriciones y los trastornos internos (Hofman *et al.*, 2002).

3.5 Importancia económica

El aguacate es el cuarto fruto tropical más importante en el mundo, se estima una producción global de 2.6 millones de toneladas. Según la FAO, México es el mayor productor de aguacate, que corresponde al 25% de la producción mundial (FAOSTAT, 2018).

La mayor producción de aguacate se concentra en los países del continente americano. Esta distribución de la producción mundial es resultado de las condiciones climatológicas y edafológicas que prevalecen en este continente, ya que son las ideales para que este fruto pueda alcanzar su madurez y óptimo desarrollo. México, como el principal productor y exportador de aguacate en el mundo en 2018, ocupó el primer lugar dentro de los productos agrícolas exportados ganando terreno al pimiento y tomate rojo (SADER 2019). En los últimos 10 años, la superficie sembrada promedio de aguacate nacional, fue de más de 230,000 hectáreas, produciendo en promedio de 1,600,000 toneladas (SIAP 2019) (Figura 3.4). Michoacán es primer lugar nacional en producción y exportación; produce cerca del 80% seguido por Jalisco (9%) y Edo de México (5%) En la última década las exportaciones de aguacate han mostrado una tasa de crecimiento acelerado del 12% y la demanda del fruto va en aumento (SIAP 2019).

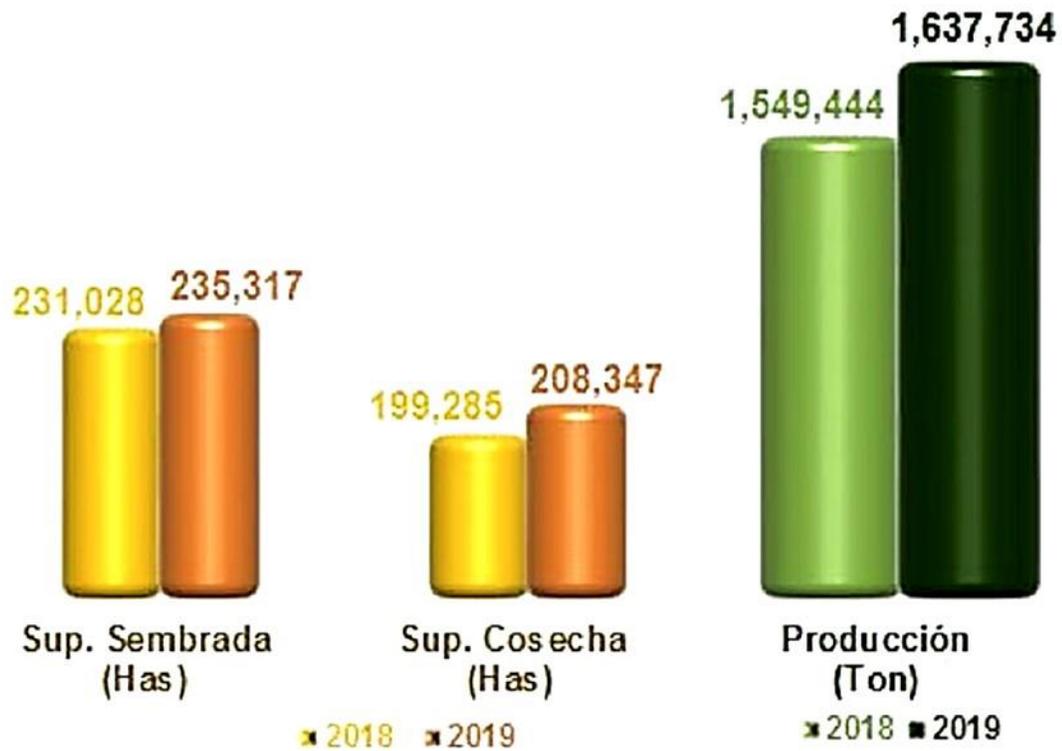


Figura 3.4 Superficie y producción de aguacate 2018-2019 (Tomada de SIAP 2019).

Las exportaciones mexicanas de aguacate están concentradas principalmente en 3 mercados, Estados Unidos (77%), Canadá (7%) y Japón (6%) y en los últimos años las ventas de aguacate alcanzaron más de 223 millones de dólares (SADER 2019) (Figura 3.5)

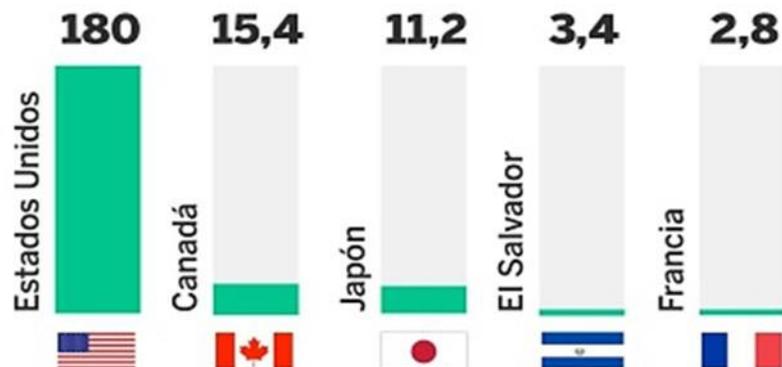


Figura 3.5 Exportación de aguacate mexicano cifras en millones de dólares (Tomada de SADER, 2019).

3.6 Características nutricionales del aguacate

El aguacate es una rica fuente de polifenoles, carotenoides y ácidos grasos insaturados y es considerado un alimento funcional. Es la fuente más alta de algunos fitonutrientes, como el beta-sitosterol que disminuye los niveles de colesterol en la sangre y la glutatoina que es un antioxidante que captura radicales libres (Fulgoni *et al.*, 2013). La pulpa también es un componente rico en β -caroteno, zeaxantina y carotenoides como luteína (Mendez-Zuñiga *et al.*, 2019).

El aguacate tiene un alto contenido de fibra que previene algunos tipos de cáncer, como el cáncer de hígado (Kawagish *et al.*, 2001), próstata (Lu *et al.*, 2005) y seno (Butt *et al.*, 2006) y la luteína (que protege contra enfermedades oculares) (Dwyer, 2000).

3.7 Características nutricionales de aguacate de raza mexicana

El aguacate de raza mexicana tiene una gran diversidad que abarca formas, tamaños. La cáscara es una capa delgada y comestibles con colores que van del azul violeta al rojo. Estas coloraciones indican la existencia de antocianinas las cuales son compuestos con función antioxidante. Las características nutraceuticas del aguacate raza mexicana varían dependiendo la accesión (Mendez-Zuñiga *et al.*, 2019). Sin embargo, se ha demostrado tienen importantes características nutricionales por su alto contenido de ácidos grasos omega-9, omega-6 y omega-3 y carotenoides. Se ha demostrado que las cantidades de compuestos fenólicos y flavonoides de diferentes accesiones de aguacate mexicano son equiparables a las encontradas en variedades como el aguacate Hass (Duarte *et al.*, 2016).

3.8 Mejoramiento genético convencional

Los principales factores que limitan la producción de aguacate son las plagas, las enfermedades (Ploetz, *et al.*, 2015; Sharma *et al.*, 2017) y los factores abióticos

(Bonomelli *et al.*, 2018). El incorporar nuevas características en el aguacate mediante el mejoramiento genético es complicado, ya que tiene un período vegetativo largo de aproximadamente 6 a 8 años, y las autopolinizaciones son difíciles debido a la protoginia (Gazit y Degani, 2002; Imbert, 1997). Por lo tanto, la producción comercial de aguacate se basa en injertar variedades en portainjertos que confieren translocación mineral (Whiley *et al.*, 1990), tolerancia a la salinidad (Álvarez-Acosta *et al.*, 2018) o tolerancia a la pudrición de la raíz (van den Berg *et al.*, 2018). Algunos de estos portainjertos son híbridos de razas guatemaltecas o mexicanas; por ejemplo, *P. americana* var. *Drymifolia* es una raza mexicana que se usa frecuentemente como portainjerto en los huertos en nuestro país (Rincón-Hernández *et al.*, 2011). Por lo que es de gran importancia implementar su propagación clonal, conservación de germoplasma y mejoramiento genético.

3.9 Cultivo de tejidos vegetales

El cultivo de tejidos vegetal se refiere al cultivo de cualquier sección de una planta (células, tejidos u órganos) en medios generados artificialmente, en condiciones axénicas y ambientes controlados. Estas técnicas se realizaron para establecer que todos los organismos vivos están constituidos de células y que estas son totipotentes (Loyola-Vargas y Ochoa-Alejo, 2018). El concepto totipotencialidad tiene dos definiciones: 1) capacidad de convertirse en un organismo completo o 2) capacidad de diferenciarse en cualquier tipo de célula o tejido de un organismo (Condic, 2014). Se ha observado, que los reguladores de crecimiento vegetal tienen un papel fundamental en la diferenciación y desdiferenciación de las células vegetales cultivadas *in vitro*. En altas proporciones de citocininas y bajas de auxinas promueven la regeneración de brotes y raíces, respectivamente, mientras que concentraciones que tienen un equilibrio resultaron en un crecimiento desorganizado de células. Este principio abrió la posibilidad de la micropropagación por regeneración de plantas completas. Estudios de Skoog y Miller (1957) evidenciaron que la proporción de estos reguladores es determinante la vía de morfogénesis de la

células o tejido cultivado *in vitro*. Estas vías pueden ser la organogénesis directa o indirecta y la embriogénesis directa o indirecta.

Estos antecedentes abrieron la posibilidad de utilizar sistemas *in vitro* y estudiar aspectos fundamentales del desarrollo y la diferenciación celular de plantas y su aplicación o investigación como el estudio de la funcionalidad de genes, micropropagación de plantas (Iliev *et al.*, 2010), generación de plantas transgénicas (Chadipiralla *et al.*, 2020), eliminación de virus en plantas infectadas (Bhat *et al.*, 2020), preservar y conservar germoplasma (Shahzad *et al.*, 2017), rescatar especies en peligro de extinción, cultivo de células para producción de metabolitos secundarios (Días *et al.*, 2016) y ediciones de genoma con CRISPR/Cas9 (Kanchiswamy *et al.*, 2016).

3.9.1 Micropropagación clonal

La micropropagación o propagación clonal *in vitro* de plantas es una de las aplicaciones más importantes del cultivo de tejidos vegetales y es un paso esencial para, la transformación genética o la edición de genomas. También es una herramienta biotecnológica para la propagación asexual masiva de plantas con alto valor comercial en un menor tiempo tales como la Stevia (Vives *et al.*, 2017), frutos rojos (“Berries”) (Debnath y Goyali 2020), plátano (Bello-Bello *et al.*, 2019) o plantas medicinales (Chauhan y Shirkot, 2020) y, especies recalcitrantes a la germinación (Altman y Loberant 2003). Estas alternativas se pueden aplicar a las diferentes especies de plantas dependiendo del genotipo (Szyp-Borowska *et al.*, 2020), capacidad de regeneración, conformación de los medios de cultivo y las condiciones ambientales en las que se encuentra establecido. La micropropagación se puede realizar diferentes formas, una de ellas es induciendo la proliferación de brotes apicales o axilares para enraizarlos después (cultivo de meristemas), formación de brotes adventicios y su posterior enraizamiento (organogénesis somática) y por la formación, maduración y germinación de embriones somáticos (embriogénesis somática) (Loyola-Vargas y Ochoa-Alejo, 2018).

3.9.2 Organogénesis

La organogénesis en plantas está clasificada como directa o indirecta (Sugimoto *et al.*, 2011). En el caso de los primeros, brotes o raíces son inducidos directamente a partir de explantes de tejido, mientras que la organogénesis indirecta implica formación de callos como un previo intermedio para inducir la formación de raíces (Figura 3.6) La regeneración indirecta de órganos en cultivo es un proceso de dos pasos, donde pequeños fragmentos de tejido llamados explantes son cultivados en medio de cultivo con auxinas para la formación de callos (Hill y Schaller 2013) (Tabla 3.2). En la actualidad ha sido posible propagar *in vitro* por medio de la organogénesis a los cultivos de mayor importancia en el mundo en cuanto a su producción y rendimientos. Estos cultivos de importancia agrícola son el arroz, maíz, papa, plátano, sorgo, soya y trigo (Tabla 3.2).

Tabla 3.2 Cultivos más importantes del mundo regenerados *in vitro* por la vía de organogénesis.

Cultivo	Vía morfogénica	Explante	Referencia
Arroz (<i>Oryza sativa</i> L.)	Organogénesis indirecta	Embriones cigóticos inmaduros	Shweta <i>et al.</i> , 2020
	Organogénesis directa	Meristemos apicales	Sawant <i>et al.</i> , 2018
			Teh <i>et al.</i> , 2018
Maíz (<i>Zea mays</i> L.)	Organogénesis indirecta	Meristemos	Muoma <i>et al.</i> , 2008
	Organogénesis directa	Internodos	Mushke <i>et al.</i> , 2016
Papa (<i>Solanum tuberosum</i> L.)	Organogénesis indirecta	Meristemos apicales	Pawar <i>et al.</i> , 2019
	Organogénesis directa	Internodos	Campos <i>et al.</i> , 2016
Plátano (<i>Musa spp</i>)	Organogénesis	Meristemos	Rai <i>et al.</i> , 2019

		directa			
		Organogénesis	Botones Florales		Nair <i>et al.</i> , 2018
		directa			
Sorgo <i>(Sorghum bicolor L.)</i>		Organogénesis	Meristemas apicales		Dreger <i>et al.</i> , 2019
		indirecta			
		Organogénesis	Embriones cigóticos		Char <i>et al.</i> , 2020
		indirecta	inmaduros		
Soya (<i>Glycine max L.</i>)		Organogénesis	Nudos cotiledonares		Kshirsagar <i>et al.</i> , 2017
		directa			
		Organogénesis	Hipocotilos		Raza <i>et al.</i> , 2017
		directa			
Trigo <i>(Triticum aestivum L.)</i>		Organogénesis	Embriones cigóticos		Seldimirova <i>et al.</i> , 2016
		indirecta	inmaduros		
			Embriones cigóticos		Mokhtari <i>et al.</i> , 2013
			inmaduros		

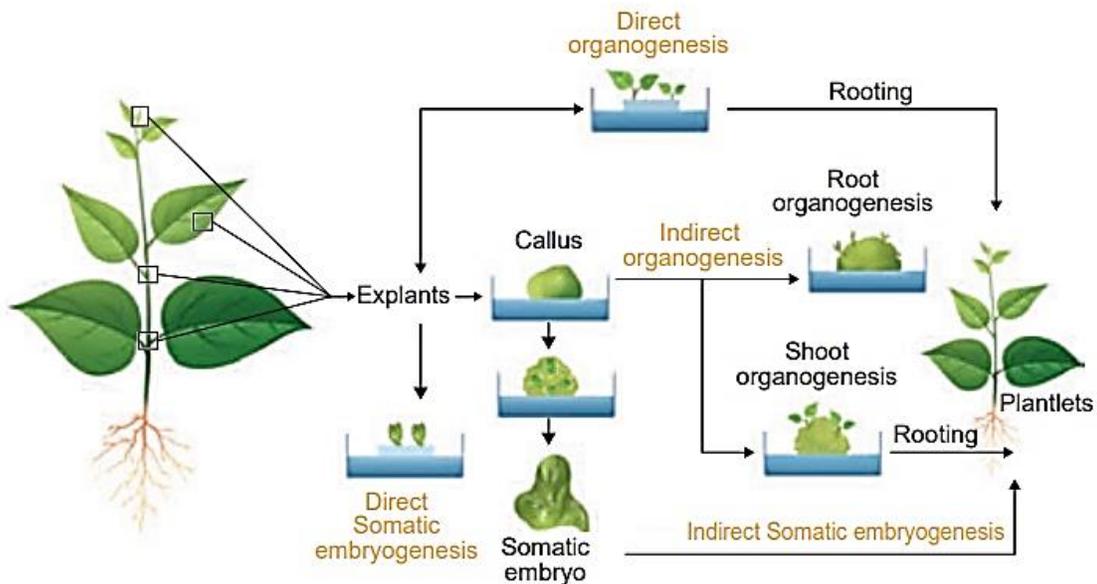


Figura 3.6 Vías de regeneración *in vitro* por organogénesis directa e indirecta (Ikeuchi *et al.*, 2016).

3.9.3 Organogénesis de árboles frutales

La organogénesis en especies como árboles forestales y frutales es compleja, ya que está demostrado que son recalcitrantes a la regeneración *in vitro*, esto se evidenció en especies como el pistache donde se obtuvieron brotes a partir de yemas axilares. Sin embargo, no se pudieron enraizar los brotes y no se obtuvieron plantas completas (Benmahioul *et al.*, 2009). Tsoulpha *et al.* (2018) describen que algunas especies de *Pyrus* son recalcitrantes y tienen necesidades especiales relacionadas a la nutrición y que componentes como CaCl_2 , MgSO_4 y KH_2PO_4 son críticos en la etapa de formación de brotes (Wada *et al.*, 2013). Otra característica que dificulta la capacidad morfogénica en la regeneración está relacionada con la edad del tejido usado como explante ya que esta capacidad disminuye cuando se utiliza tejido de plantas adultas (después de la floración) y mejora en tejidos juveniles (antes de la floración) (Bandaralage *et al.*, 2017) (Tabla 3.3).

Tabla 3.3 Regeneración *in vitro* de arboles frutales por la vía de la organogénesis.

Especie	Explante	Vía de regeneración	Referencia
Chirimoya (<i>Annona cherimola</i> Mill.)	Hoja	Organogénesis indirecta	Orantes-Ramos <i>et al.</i> , 2019
Anón (<i>Annona squamosa</i> L.)	Hipocotilos	Organogénesis directa	Lemos <i>et al.</i> , 1996
Yaca (<i>Artocarpus heterophyllus</i> Lam.)	Hoja	Organogénesis indirecta	Nair <i>et al.</i> , 1984
Papaya (<i>Carica papaya</i> L.)	Meristemos apicales	Organogénesis indirecta	Palei <i>et al.</i> , 2019
Limón (<i>Citrus acida</i> Christm.)	Epicotilos	Organogénesis indirecta	Hu <i>et al.</i> , 2017
Limón amarillo (<i>Citrus limon</i> Citrus L.)	Segmentos nodales	Organogénesis indirecta	Navarro <i>et al.</i> , 2016
Mangostán (<i>Garcinia mangostana</i> L.)	Hipocotilos	Organogénesis indirecta	Astuti <i>et al.</i> , 2020
Litchi (<i>Litchi chinensis</i> L.)	Hoja	Organogénesis indirecta	Puchooa <i>et al.</i> , 2004
Mango (<i>Mangifera indica</i> L.)	Hojas	Organogénesis indirecta	Raghuvanshi <i>et al.</i> , 1995
Naranja espinoso (<i>Poncirus trifoliata</i> L.)	Hipocotilo	Organogénesis indirecta	Zou <i>et al.</i> , 2008

<i>Guayaba (Psidium guajava L.)</i>	Tallo	Organogénesis directa	Zamir <i>et al.</i> , 2017
Plátano (<i>Musa spp L.</i>)	Meristemos	Organogénesis directa	Rai <i>et al.</i> , 2019
Jambul (<i>Syzygium cumini L.</i>)	Internodos y hojas	Organogénesis indirecta	Naaz <i>et al.</i> , 2019

3.9.4 Organogénesis de Aguacate

La micropropagación de aguacate es considerada una alternativa para la producción de aguacate (Barceló-Muñoz and Pliego-Alfaro, 2003, Bandaralage *et al.*, 2017;). El aguacate como especie leñosa es conocido como un cultivo recalcitrante a la regeneración *in vitro* (Barceló-Muñoz and Pliego-Alfaro, 2003). Sin embargo, se ha logrado desarrollar protocolos que han permitido obtener plantas a través de esta vía. La eficiencia de regeneración de plantas de aguacate por organogénesis *in vitro* a partir de tejidos asexuales es baja y dependiente del genotipo (Bandaralage *et al.*, 2017). Algunos reportes de micropropagación tuvieron éxito con diversas variedades utilizando la vía morfogénica de la organogénesis directa utilizando explantes como, yemas axilares (de la Viña *et al.*, 2001, Zulfiqar *et al.*, 2009, Bandaralage *et al.*, 2015, Restrepo *et al.*, 2018 y Mansoor, 2018), explantes nodales (Biasi *et al.*, 1994, Biasi, 1995, Ibarra-López *et al.*, 2016,), embriones cigóticos (Perán-Quesada *et al.*, 2004, Fuentes *et al.*, 2004, Sánchez-Romero *et al.*, 2007), ejes embrionarios (Mohamed-Yasseen, 1993, Barringer *et al.*, 1996), fragmentos de tallo (Taah *et al.*, 2009), brotes etiolados (Vega, 1989), brotes jóvenes (Nhut *et al.*, 2008) y brotes obtenidos de plantas *in vitro* (Schaffer *et al.*, 1999) (Tabla 3.4). Se ha demostrado que a través de la organogénesis indirecta es una ruta más compleja para la obtención de plantas de aguacate la organogénesis indirecta; hasta el momento sólo existe un reporte donde se utilizaron segmentos de hoja, pero tiene eficiencias de regeneración muy bajas (Seijo *et al.*, 2004) (Tabla 3.4). El uso de estos tejidos ha presentado obstáculos para su establecimiento *in vitro* debido a la contaminación por

bacterias, hongos, ya que los explantes se desarrollan en plantas madre que se encuentran en ambientes externos (Moreno-Vazquez *et al.*, 2014). Otra explicación, es que las condiciones que hay en el cultivo *in vitro* tales como la alta humedad promueven la aparición y ataque de microorganismos que en condiciones naturales no lo harían (van Staden *et al.*, 2004). También se ha demostrado que otro obstáculo que limita la regeneración *in vitro* es el oscurecimiento de los explantes relacionado con la producción de etileno y la necrosis (Nhut *et al.*, 2008, Bandaralage *et al.*, 2017). Las alternativas que se han utilizado para evitar estos problemas es el uso de carbón activado (Pliego-Alfaro y Murashige, 1988) o antioxidantes como polivinilpirrolidona (PVP) (Ahmed *et al.*, 2001). La organogénesis de aguacate tiene algunas desventajas tales como ser costosa y requerir personal capacitado, pero tiene también múltiples beneficios ya que es un sistema que permite obtener plantas libres de patógenos y obtener gran cantidad de material vegetal en poco tiempo.

Tabla 3.4 Regeneración *in vitro* de aguacate por medio de organogénesis.

Variedad	Explante	Vía de regeneración	Referencia
Lula	Meristemos apicales y axilares	Organogénesis indirecta	Qasrawi <i>et al.</i> , 2019
Edranol	Yemas axilares	Organogénesis directa	Mansoor, 2018
Hass	Yemas axilares	Organogénesis directa	Restrepo <i>et al.</i> , 2018
'Velvick'	Yemas axilares	organogénesis directa	Bandaralage <i>et al.</i> , 2015
Hass	Embriones cigóticos	Organogénesis directa	Rohim <i>et al.</i> , 2013
Hass	Fragmentos de	Organogénesis	Taah <i>et al.</i> , 2009

	tallo	directa	
Fuerte	Yemas axilares	Organogénesis directa	Zulfiqar <i>et al.</i> , 2009
Drymifolia	Segmentos internodales y yemas axilares	Organogénesis directa	Ibarra-López <i>et al.</i> , 2016
Dalat	Brotes juvenes	Organogénesis directa	Nhut <i>et al.</i> , 2008
Hass	Embriones cigóticos	Organogénesis directa	Sánchez-Romero <i>et al.</i> , 2007
Hass, Booth-7, Lula, Lima, Late, Waldin	Brotes	Organogénesis directa	Raharjo y Litz, 2005
Duke, Hass, Suardía, Estación, Catalina, Jaruco No. 1	Embriones cigóticos	Organogénesis directa	Fuentes <i>et al.</i> , 2004
Catalina	Segmentos de hojas	Organogénesis indirecta	Seijo <i>et al.</i> , 2004
Anaheim	Embriones cigóticos	Organogénesis directa	Perán-Quesada <i>et al.</i> , 2004
Gvaram 13	Brotes <i>in vitro</i>	Organogénesis directa	Premkumar <i>et al.</i> , 2002
Drymifolia	Brotes	Organogénesis directa	Barrera-Guerra <i>et al.</i> , 2001
RR-86	Yemas axilares	Organogénesis directa	de la Viña <i>et al.</i> , 2001
Hass	Yemas apicales	Organogénesis directa	Barceló-Muñoz <i>et al.</i> , 1999

Gvaram 13	Brotos cultivados <i>in vitro</i>	Organogénesis directa	Schaffer <i>et al.</i> , 1999
Catalonia, Dade, Maxima, Tower 2	Ejes embrionarios	Organogénesis directa	Barringer <i>et al.</i> , 1996
Duke 7'	Brotos y yemas axilares	Organogénesis directa	Wessels, 1996
Lula, Velvick	Yemas axilares	Organogénesis directa	Castro <i>et al.</i> , 1995
Ouro verde	Explantos nodales	Organogénesis directa	Biasi, 1995
Ouro verde	Explantos nodales	Organogénesis directa	Biasi <i>et al.</i> , 1994
Hass, Fuerte, Topa-Topa, Duke	Brotos apicales	Organogénesis directa	Zirari y Lionakis, 1994
Dade, Maxima, Cataloia, Tower 2, Waldin, Choquette	Ejes embrionarios	Organogénesis directa	Mohamed-Yasseen, 1993
Colin V-33 West cepa India	Brotos etiolados	Organogénesis directa	Vega, 1989
Portainjerto IV-8, Portainjerto GA-13	Yemas laterales	Organogénesis directa	Pliego-Alfaro <i>et al.</i> , 1987

3.9.5 Embriogénesis somática

La embriogénesis es el proceso de formación y desarrollo del embrión. La embriogénesis cigótica resulta de una polinización y fertilización (Figura 3.7). Mientras que la embriogénesis somática no hay fusión de gametos, lo que significa que los embriones surgen de forma indirecta (Bhatia and Bera, 2015).

La embriogénesis somática es un proceso que implica la formación de embriones a partir de células somáticas vegetales y comparado con la organogénesis es un

proceso más lento e implica un riesgo de variación somaclonal (Feher., 2019). El parecido entre los embriones cigóticos y somáticos ha permitido que la embriogénesis somática permita estudiar funciones bioquímicas, morfológicas, fisiológicas y epigenéticas durante el proceso de desarrollo de los embriones (Wang *et al.*, 2020).

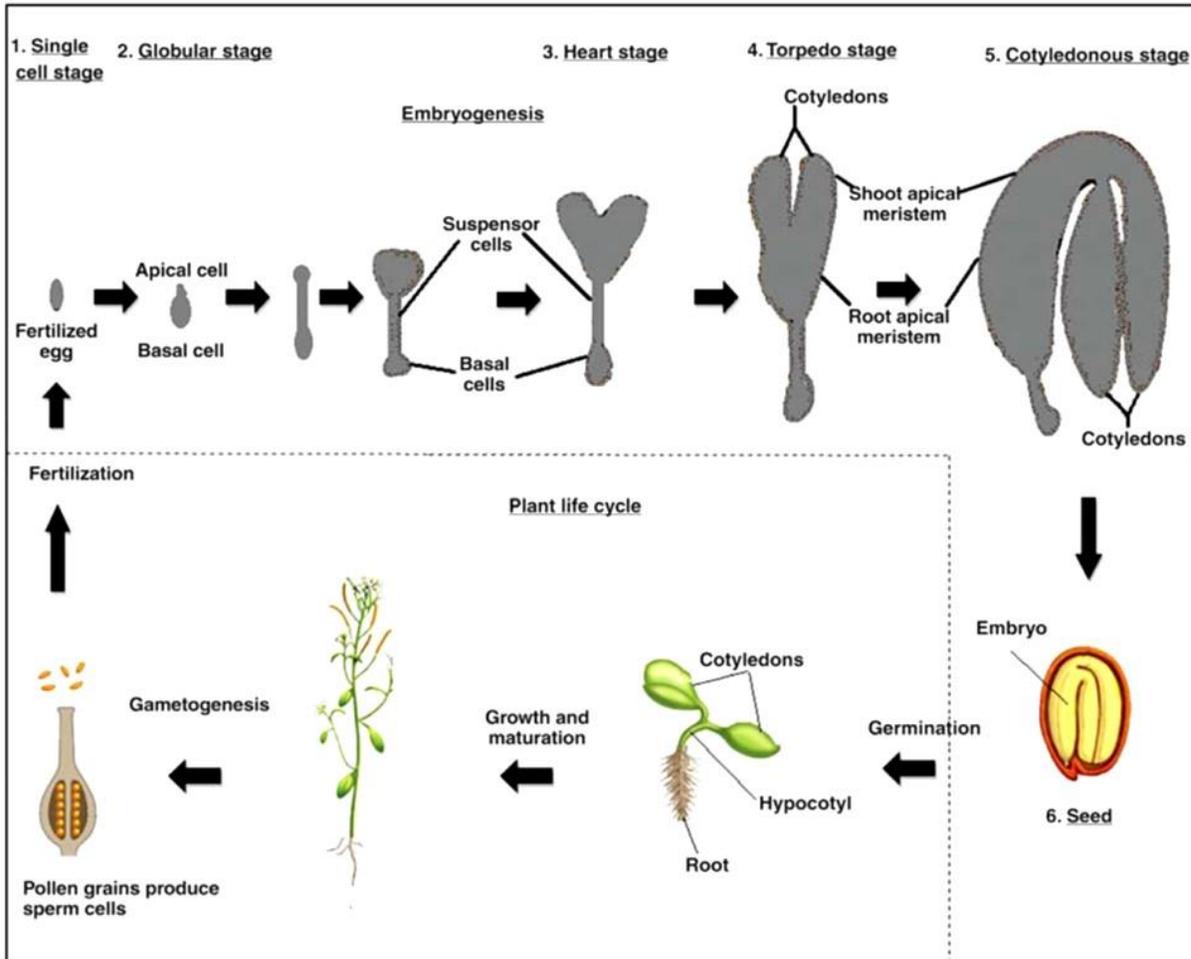


Figura 3.7 Embriogénesis cigótica de una planta (Tomada de Bhatia and Bera, 2015).

La embriogénesis somática es un proceso en el que se forman estructuras parecidas a embriones provenientes de tejidos somáticos tendrán sufriendo una serie de cambios morfológicos y bioquímicos hasta dar lugar a embriones somáticos que tendrán la capacidad de convertirse en una planta completa (Winkelmann, 2016). Es

una forma de reproducción asexual en la que células somáticas, las cuales, bajo condiciones experimentales controladas generan células embriogénicas. Esta vía funciona muy bien para la regeneración de plantas monocotiledóneas y dicotiledóneas, pero es especialmente útil para gramíneas y leñosas (Van and Van Le, 2000). En este proceso es muy importante la composición del medio de cultivo. Una de las características en la que se debe ser especialmente cuidadoso es en la presencia y control de las auxinas, ya que estas tienen un papel fundamental en la formación de masas proembriogénicas y callos embriogénicos y la ausencia de este regulador induce la maduración de los embriones (Jiménez, 2001).

La embriogénesis somática está basada en la totipotencialidad celular, lo cual significa que las células somáticas individuales pueden regenerar plantas completas. Por lo tanto, esta vía es un sistema de regeneración que puede ser usada para transformación, o con otras herramientas biotecnológicas.

La embriogénesis somática puede dividirse en diferentes etapas como: inducción de cultivos embriogénicos, mantenimiento, maduración de los embriones somáticos, germinación, adaptación a suelo y aclimatación de las plantas completas.

Estas fases están reguladas por diversos factores, como el genotipo ya que diferentes genotipos pueden mostrar diferencias en su capacidad de formar embriones somáticos (Parrott *et al.*, 1991, Campos *et al.*, 2017).

Existen dos tipos de embriogénesis, la directa y la indirecta (Bhatia and Bera, 2015). En la directa se forman los embriones sobre el explante utilizado y en la indirecta las células del explante se dediferencian formando un callo que después darán lugar a embriones somáticos.

En la embriogénesis indirecta hay dos tipos de callo que pueden formarse, el callo embriogénico y no embriogénico. Las características del callo embriogénico son la pared celular engrosada, citoplasma de mayor densidad, células redondeadas y simétricas, color amarillento, oscuro, capacidad de disgregarse y mayor actividad metabólica (Guzmán-García, 2012), mientras que los callos no embriogénicos son traslucidos y friables (Quiroz-Figueroa *et al.* 2006).

Se ha utilizado esta vía de regeneración para para diversos cultivos, incluidos los más importantes del mundo (FAOSTAT, 2018) con respecto a rendimiento y superficie sembrada, tales cultivos son el arroz, maíz, plátano, sorgo, soya y trigo (Tabla 3.5)

Tabla 3.5 Cultivos más importantes del mundo regenerados *in vitro* por la vía de embriogénesis somática.

Cultivo	Vía morfológica	Explante	Referencia
Arroz (<i>Oryza sativa</i> L.)	Embriogénesis somática indirecta	Semillas	Kalhari <i>et al.</i> , 2017
	Embriogénesis somática directa	Embriones cigóticos inmaduros	Mariani <i>et al.</i> , 2002
Maíz (<i>Zea mays</i> L.)	Embriogénesis somática indirecta	Embriones cigóticos inmaduros	Jakubeková <i>et al.</i> , 2011
	Embriogénesis somática directa	Embriones cigóticos inmaduros	Lowe <i>et al.</i> , 2018
Papa (<i>Solanum tuberosum</i> L.)	Embriogénesis somática indirecta	Hojas	Xena <i>et al.</i> , 2000
	Embriogénesis somática directa	Hojas e internodos	Kaur <i>et al.</i> , 2018
Plátano (<i>Musa spp</i>)	Embriogénesis somática indirecta	Inflorescencia masculina inmadura	Escobedo-GraciaMedrano <i>et al.</i> , 2016
	Embriogénesis somática directa	Protoplastos	Panis <i>et al.</i> , 1993
Sorgo (<i>Sorghum bicolor</i> L.)	Embriogénesis somática indirecta	Embriones cigóticos inmaduros	Pola <i>et al.</i> , 2009
	Embriogénesis somática directa	Yemas apicales	Girijashankar <i>et al.</i> , 2007
Soya (<i>Glycine max</i> L.)	Embriogénesis somática indirecta	Cotiledones inmaduros	Hartweck <i>et al.</i> , 1988
Trigo (<i>Triticum aestivum</i> L.)	Embriogénesis somática directa	Embriones cigóticos inmaduros	Caliskan <i>et al.</i> , 2004
	Embriogénesis somática directa	Hojas	Mahalakshmi <i>et al.</i> , 2003

3.9.6 Embriogénesis somática de árboles frutales

La primera vez que hubo un estudio del intento por lograr embriogénesis somática para árboles frutales fue con la especie *Citrus* (Stevenson, 1956). Después, de esto se logró la formación de proembriones en estado globular a partir de explantes nucelares de *Citrus* y *Mangifera* (Maheswari and Rangaswamy, 1958). Estos dos trabajos sirvieron como antecedente para un sinnúmero de publicaciones de embriogénesis somática directa e indirecta de especies frutales usando diferentes explantes (Tabla 3.6). La embriogénesis somática directa e indirecta ha sido descrita para papaya (Solórzano-Cascante *et al.*, 2018 Al-Shara *et al.*, 2020), cocotero (Bett *et al.*, 2019; Osorio-Montalvo *et al.*, 2020) y plátano (Escobedo-GraciaMedrano *et al.*, 2016; Panis *et al.*, 1993), mientras que sólo se ha conseguido regenerar por embriogénesis indirecta al limón (Sajeva *et al.*, 2008), la naranja dulce (Cardoso *et al.*, 2017) la mandarina (Hussain *et al.*, 2016), el mango (Shukla *et al.*, 2016), la litchi (Shukla *et al.*, 2016), y frutales como el pistache (Ghadirzadeh-Khorzoghi *et al.*, 2019), el níspero (Lin *et al.*, 2020) y la guayaba (Akhtar *et al.*, 2018) por embriogénesis indirecta (Tabla 3.6). La embriogénesis somática de frutales ofrece una ventaja ya que está permitiendo el desarrollo de protocolos por esta ruta morfogénica para ayudar a mejorar las características que no se pueden mediante el mejoramiento convencional. Sin embargo, aún existen cuellos de botella como la baja maduración y germinación de los embriones generados en condiciones *in vitro*.

Tabla 3.6 Especies de árboles frutales regenerados por embriogénesis somática.

Especie	Explante	Vía de regeneración	Referencia
Papaya (<i>Carica papaya</i> L.)	Hipocotilos	Embriogénesis indirecta	Solórzano-Cascante <i>et al.</i> , 2018
	Embriones cigóticos inmaduros	Embriogénesis indirecta	Al-Shara <i>et al.</i> , 2020
Limón (<i>Citrus acida Christm.</i>)	Láminas de pistilo	Embriogénesis indirecta	Sajeva <i>et al.</i> , 2008
Naranja dulce	Pistilos	Embriogénesis	Cardoso <i>et al.</i> ,

(<i>Citrus sinensis</i> Osbeck)		indirecta	2017
Mandarina (<i>Citrus reticulata</i> Blanco.)	Nucela	Embriogénesis indirecta	Hussain <i>et al.</i> , 2016
Cococero (<i>Cocos nucifera</i> L.)	Embriones cigóticos inmaduros	Embriogénesis indirecta	Bett <i>et al.</i> , 2019
	Embriones somáticos inmaduros	Embriogénesis indirecta	Osorio-Montalvo <i>et al.</i> , 2020
<i>Litchi</i> (<i>Litchi chinensis</i> L.)	Hojas	Embriogénesis indirecta	Aboshama <i>et al.</i> , 2018
Pistache (<i>Pistacia vera</i> L.)	Embriones cigóticos inmaduros	Embriogénesis directa	Ghadirzadeh-Khorzoghi <i>et al.</i> , 2019
Mango (<i>Mangifera indica</i> L.)	Nucela	Embriogénesis indirecta	Shukla <i>et al.</i> , 2016
Nispero (<i>Eriobotrya japonica</i> (Thunb.) Lindl.)	Anteras	Embriogénesis directa	Lin <i>et al.</i> , 2020
Guayaba (<i>Psidium guajava</i> L.)	Embriones cigóticos inmaduros	Embriogénesis directa	Akhtar <i>et al.</i> , 2018
Plátano (<i>Musa spp</i> L.)	Embriogénesis somática indirecta	Inflorescencia masculina inmadura	Escobedo-GraciaMedrano <i>et al.</i> , 2016
	Embriogénesis somática directa	Protoplastos	Panis <i>et al.</i> , 1993

3.9.7 Embriogénesis somática de aguacate

La regeneración del aguacate por embriogénesis somática es una vía por la que mejores resultados se han tenido para la obtención de plantas *de novo*. Los factores que más influyen en la respuesta y que son determinantes para embriogénesis somática son: el genotipo, el tipo de explante, los reguladores de crecimiento y las condiciones ambientales. En diversos estudios se ha descrito el uso de diferentes cultivares como Hass (Pliego-Alfaro y Murashige, 1988), Duke (Mooney y Van Staden, 1987), T372 (Witjaksono *et al.*, 1998), Anaheim (Perán-Quesada *et al.*, 2004), Duke 7 (Márquez-Martín *et al.*, 2012) y Reed (Encina *et al.*, 2014). Los

explantes más usados en las especies leñosas son los tejidos jóvenes y el aguacate no es la excepción ya que se ha reportado el uso de embriones cigóticos inmaduros en estadio globular o nucela (Pliego-Alfaro y Murashige, 1988; Raviv *et al.*, 1998; Witjaksono y Litz, 1999, Suárez *et al.*, 2006) (Tabla 3.7).

Los reguladores de crecimiento son de vital importancia para la obtención de cultivos embriogénicos ya que de acuerdo con Gaj (2011) los explantes deben ser expuestos a auxinas para que los embriones somáticos sean inducidos, esto es debido a que el transporte y biosíntesis local de auxinas es necesaria para generar un gradiente durante la embriogénesis somática (Soriano *et al.*, 2014). Sin embargo, aún se desconoce como es que las auxinas inducen la totipotencialidad celular y promueven la embriogénesis (Wang *et al.*, 2019).

Otros factores que se ha demostrado influyen en la embriogénesis de aguacate son el medio de cultivo y el tipo y concentración de agente gelificante (Perán-Quesada 2001; Witjaksono y Litz 1999). La formulación más efectiva para inducir y multiplicar los cultivos embriogénicos es el medio con sales MS y suplementado con con 0.1 mg/L de ácido 4-amino-3,5,6-tricloropicolínico (Picloram) (Márquez-Martín, 2007; Witjaksono y Litz, 1999). La edad de los cultivos es importante para su viabilidad ya que con el paso del tiempo aumenta la tasa de multiplicación, pero pierden la capacidad de germinación (Márquez-Martín, 2007; Encina *et al.*, 2014).

Con respecto a la maduración de los embriones somáticos, estos comienzan a sufrir cambios que se ven reflejados en la acumulación de sustancias de reserva de forma similar a lo que ocurre con los embriones cigóticos. En el aguacate esta característica morfológica se utiliza como un indicador de madurez fisiológica de los embriones somáticos (Witjaksono y Litz 1999; Perán-Quesada *et al.* 2004; Márquez-Martínez *et al.*, 2011; Encina *et al.*, 2014). Perán-Quesada *et al.* (2004) y Márquez-Martín (2007) utilizaron ABA para inducir la maduración de los embriones somáticos, pero se demostró que la presencia de este regulador de crecimiento afectó negativamente tanto a la regeneración, como al número de embriones somáticos maduros obtenidos por cultivo.

La eficiencia de regeneración representada por los porcentajes de germinación es baja y se encuentra entre el 0 al 37%, indicando que la conversión de embriones somáticos a plantas completas es un proceso ineficiente (Witjaksono y Litz 1999; Sánchez-Romero *et al.* 2006; Márquez-Martín 2007; Raharjo *et al.*, 2008; Márquez-Martín *et al.*, 2011; Encina *et al.*, 2014).

Tabla 3.7 Regeneración *in vitro* de aguacate a través de embriogénesis somática.

Variedad	Explante	Vía de regeneración	Referencia
'Reed'	Embriones cigóticos	Embriogénesis indirecta	Encina <i>et al.</i> , 2014
'Hass'			
'Duke 7'			
'A10'			
Hass	Embriones cigóticos	Embriogénesis indirecta	Rohim <i>et al.</i> , 2013
Hass	Embriones cigóticos	Embriogénesis indirecta	Marquez-Martín <i>et al.</i> , 2012
<i>Persea americana</i>	Nucela	Embriogénesis indirecta	Suárez <i>et al.</i> , 2006
Anaheim	Embriones cigóticos	Embriogénesis indirecta	Perán-Quesada <i>et al.</i> , 2004
Diferentes variedades	Embriones cigóticos	Embriogénesis indirecta	Litz and Witjaksono, 1999
<i>Persea americana</i>	Protoplastos	Embriogénesis indirecta	Witjaksono <i>et al.</i> , 1998
Hass	Embriones cigóticos	Embriogénesis indirecta	Pliego-Alfaro and Murashige, 1988

3.10 Transformación genética

La transformación genética de plantas permite la introducción de genes que confieren características útiles a cultivos de interés agronómico. Representa una herramienta de apoyo para los programas de mejoramiento convencional mediante la transferencia directa de genes de un organismo a otro, permitiendo la integración y expresión de un gen que no pertenece a la especie que se transformó. Al gen que se transfiere se le llama transgén y al organismo donde se integró el gen se le llama transgénico o genéticamente modificado (Babaoglu *et al.*, 2000). La primera vez que se realizó la técnica de transferir genes foráneos fue en 1983 con el tabaco como planta modelo (Bevan *et al.*, 1983; Fraley *et al.*, 1983; Herrera-Estrella *et al.*, 1983).

Hay diferentes métodos de transformación genética, tales como electroporación, lipofección, microinyección, sonicación, bombardeo de partículas, mediante vectores virales y *Agrobacterium tumefaciens* (Birch 1997). El *A. tumefaciens* es el sistema más utilizado ya que es relativamente fácil debido a que es más barato que otros sistemas y a que la copia del transgén se integra directamente en el núcleo una a tres copias (Hansen and Wright, 1999).

La tecnología para obtener plantas transgénicas ha permitido el desarrollo de cultivos como el maíz (Munkvold *et al.*, 1999), el algodón (Wilson *et al.*, 1992), la soya (Stewart *et al.*, 1996) y el arroz (Bennett, 1994) que expresan genes de δ -endotoxinas provenientes del *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) que los hace resistentes al ataque por larvas de lepidópteros. Por otro lado, los cultivos tales como como tabaco, papa (De Greef *et al.*, 1989) maíz (Tharp *et al.*, 1999) y la soya (Padgett *et al.*, 1995) fueron transformados con el gen *Bar* para conferir resistencia al herbicida glifosato. En este siglo, las tres más grandes empresas de biotecnología agrícola en el mundo (Bayer-Monsanto, China Chem-Syngenta y Corteva, antes DuPont-Pioneer) han “piramidado” estos dos genes en un solo cultivo por medio de cruza.

Además de estos dos genes de resistencia herbicidas y al ataque de insectos, que se han estado usando en diversos cultivos transgénicos, en la última década se incorporó a la siembra comercial de maíz transgénico en EEUU un maíz tolerante a sequía. El maíz DroughtGard™ fue aprobado para cultivo comercial en EEUU y fue

desarrollado por Bayer-Monsanto, utilizando el gen de la proteína B de choque frío proveniente de *Bacillus subtilis* (Castiglioni *et al.*, 2008). Las pruebas de inocuidad alimentaria demostraron que dicha proteína no es tóxica para humanos ni animales (Wang *et al.*, 2015).

3.10.1 Transformación genética de aguacate

El aguacate (*Persea americana* Mill.) es uno de los frutos tropicales más importantes. La mejora biotecnológica de esta especie a través de la transformación genética es obstaculizada por la naturaleza recalcitrante de los explantes de aguacate para regenerar *in vitro*. Sin embargo, ya se ha demostrado que los cultivos embriogénicos derivados de embriones cigóticos inmaduros son la fuente más común de explantes para la regeneración y transformación del aguacate (Pliego-Alfaro *et al.*, 2013). Estos cultivos son fácilmente obtenidos pero la conversión de embriones somáticos a las plantas ocurre con una frecuencia muy baja, esto puede deberse a la desorganización del meristemo de brotes apicales (Sánchez-Romero *et al.* 2006; Palomo Ríos *et al.* 2012). Un factor adicional que dificulta la recuperación de plantas transgénicas de aguacate es que los explantes de aguacate muestran sensibilidad a antibióticos como carbenicilina, cefotaxima y timentina los cuales son usados para la eliminación de *A. tumefaciens* (Raharjo *et al.*, 2008; Palomo-Ríos *et al.* 2012). Las auxinas son necesarias para la inducción de la embriogénesis somática, pero en ocasiones el efecto de las auxinas permanece aún con la transferencia de los embriones a medio sin auxinas y esto evita su germinación. Debido a estos problemas, son pocas las investigaciones que han obtenido plantas transgénicas en aguacate (Cruz-Hernandez *et al.*, 1998; Raharjo *et al.* 2008; Palomo-Ríos *et al.* 2012).

Se han reportado casos exitosos de transformación de aguacate con los genes GUS y *nptII* (Cruz-Hernández *et al.*, 1998), con el gen de la defensina *PDF1.2* (Raharjo *et al.*, 2008), el gen SAMASA que codifica para una S-adenosilmetionina hidrolasa que degrada una S-adenosilmetionina, precursora del etileno (Litz *et al.*, 2007) y con

genes de la proteína verde fluorescente (GFP, por sus siglas en inglés) (Palomo-Rios *et al.*, 2017).

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Material vegetal

El material vegetal se obtuvo del banco de germoplasma del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias en Celaya, Gto., durante el ciclo primavera-verano. Los árboles de aguacate var. *Drymifolia* tenían en promedio 6 años y estos fueron fertilizados anualmente con NPK, (200-200-300) y Ca, Mg, Fe y Zn (25- 05-01-1.5). Se colectaron frutos inmaduros de aguacate de 5-8 cm de diámetro de las accesiones, Celaya 79, Comonfort 53, San Miguel, BG24, BG181 y Zutano (raza mexicana × raza guatemalteca) se lavaron con jabón desinfectante (Dermocleen®) y se enjuagaron con agua de la llave; se embebieron en hipoclorito de sodio comercial (Cloralex®) durante 10 minutos y se enjuagaron tres veces durante 1 minuto en agua esterilizada. Como explante se usaron embriones cigóticos (EC) en etapa cotiledonar.

4.2 Inducción de la embriogénesis directa los embriones somáticos

El medio de inducción (I) consistió de las sales de Gamborg modificadas (GM) (Gamborg *et al.*, 1968; Perán-Quesada *et al.*, 2004) adicionadas con 1 mg L⁻¹ de piridoxina, 1 mg L⁻¹ de tiamina, 100 mg L⁻¹ de mio-inositol, 1 g L⁻¹ de carbón activado, 30 g L⁻¹ de sacarosa y 8 g L⁻¹ de agar, y diferentes concentraciones de ácido 1-naftalenacético (ANA) (2, 5 o 10 mg L⁻¹), ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) (5 o 10 mg L⁻¹) o ácido 4-amino-3,5,6-tricloropicolínico (Picloram) (0.05, 0.1 o 0.2 mg L⁻¹). El pH del medio se ajustó a 5.7, se esterilizaron en autoclave a 121°C por 15 min y se vertieron 30 mL por caja Petri (100×25 mm) en condiciones de campana de flujo laminar. Los EC de todas las accesiones se cultivaron en el medio I y se mantuvieron en oscuridad a 30 °C hasta la inducción de embriones somáticos (ES).

4.3 Embriogénesis indirecta

El medio de inducción de callos (IC) consistió en sales GM adicionado con 1 mg L⁻¹ de piridoxina, 1 mg L⁻¹ de tiamina, 100 mg L⁻¹ de mio-inositol, 1 g L⁻¹ de carbón 30 g L⁻¹ de sacarosa y 8 g L⁻¹ de agar, y diferentes concentraciones de ANA (2.5 o 10 mg

L⁻¹), 2,4-D (5 o 10 mg L⁻¹) o Picloram (0.05, 0.1 o 0.2 mg L⁻¹). El pH del medio se ajustó a 5.7, se esterilizaron en autoclave a 121 °C durante 15 minutos y se vertieron 30 ml por caja Petri (100x25 mm) en condiciones de campana de flujo laminar. Los EC de todas las accesiones se cultivaron en el medio I y se mantuvieron en oscuridad a 30 °C hasta la inducción de embriones somáticos (ES).

4.4 Mantenimiento de callos embriogénicos

Después de la inducción, los EC derivados del aguacate San Miguel se subcultivaron en MIM a intervalos mensuales. Cada caja de Petri (100x15 mm) que contenía 30 ml de MIM con 0.2 mg L⁻¹ de Picloram se cultivaron con aproximadamente 50 mg de EC y la caja se incubó a 30 °C en la oscuridad. La transferencia de CE se realizó semanalmente por un máximo de 9 meses. Solo los CE viables sin necrosis se transfirieron a placas con medio fresco. Los ES no viables que mostraron necrosis fueron descartadas. Para inducir la formación de embriones somáticos maduros, se realizaron mensualmente subcultivos de callos embriogénicos y se mantuvieron en condiciones de oscuridad a 30 °C.

4.5 Maduración de embriones somáticos

Para inducir la maduración de los ES estos se transfirieron a medio de maduración (M) que contenía sales GM adicionadas con 1 mg L⁻¹ de piridoxina, 1 mg L⁻¹ de tiamina, 100 mg L⁻¹ de mio-inositol, 1 g L⁻¹ de carbón activado, 30 g L⁻¹ de sacarosa, 16 g L⁻¹ de agar y 0.2 mg de Picloram. El pH del medio se ajustó a 5.7, se esterilizaron en autoclave a 121°C por 15 minutos y se vertieron 30 mL por caja Petri (100x25 mm) en condiciones de campana de flujo laminar y se mantuvieron en condiciones de oscuridad a 30 °C.

4.6 Germinación de embriones maduros

El medio de germinación (GE) consistió de las sales GM (Gamborg et al., 1968) adicionadas con 1 mg L⁻¹ de piridoxina, 1 mg L⁻¹ de tiamina, 100 mg L⁻¹ de mio-inositol, 50 g L⁻¹ de sacarosa, 2.5 g L⁻¹ Phytigel®, 0.5 mg L⁻¹ 6-bencilaminopurina

(BAP) y 1 mg L^{-1} de ácido giberélico (AG3); el pH del medio se ajustó a 5.7. Los ES maduros en etapa colitodonar con un diámetro de aproximadamente 5-10 mm se colocaron en cajas Petri (10 por caja). Los ES maduros se subcultivaron en un medio fresco cada dos semanas durante un período de seis a ocho semanas hasta la germinación. Los cultivos se incubaron en una cámara de crecimiento a $25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ con 16 h de luz e intensidad lumínica de $30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ proporcionada por lámparas fluorescentes de luz blanca fría de 40 W.

4.7 Inducción de la organogénesis

Los meristemos apicales se disectaron de los EC de las accesiones utilizadas y se cultivaron en el medio de inducción (I) de la organogénesis que consistió en las sales GM, 30 mg L^{-1} de sacarosa, 1 mg L^{-1} de piridoxina, 1 mg L^{-1} de tiamina, 100 mg L^{-1} de mio-inositol y 2.5 g L^{-1} de Phytigel®, con reguladores de crecimiento (RC) 0.5 mg L^{-1} de BAP y 1 mg L^{-1} AG3 o sin reguladores de crecimiento (SRC). El pH del medio se ajustó a 5.7 antes de su esterilización en autoclave $121 \text{ }^\circ\text{C}$ por 15 minutos. En frascos de cristal de 120 mL se vertieron 30 mL de medio y se colocaron dos explantes en cada uno. Los cultivos se mantuvieron en una cámara de crecimiento a $25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ con 16 h de luz.

4.8 Crecimiento y enraizamiento de las plántulas y brotes adventicios

El medio de enraizamiento (R) estuvo compuesto por las sales GM adicionadas con 1 mg L^{-1} de piridoxina, 1 mg L^{-1} de tiamina, 100 mg L^{-1} de mio-inositol, 25 mg L^{-1} de ácido indol-3-butírico (AIB), 30 g L^{-1} de sacarosa y 2.5 mg L^{-1} Phytigel®; el pH del medio se ajustó a 5.7. Se vertieron 30 mL del en frascos de vidrio de 120 mL y se colocó una plántula en cada uno. Los ES germinados y los brotes de 2 cm de longitud obtenidos por organogénesis se transfirieron a un medio de enraizamiento durante aproximadamente 4-5 semanas. Posteriormente, las plántulas se colocaron en medio de elongación (E) en recipientes Magenta® con un medio de cultivo con la mitad de la concentración de las sales MS (Murashige y Skoog, 1962), adicionadas con 1 mg L^{-1} de piridoxina, 1 mg L^{-1} de tiamina, 100 mg L^{-1} de mio-inositol y 2.5 g L^{-1}

Phytigel®, ajustando su pH a 5.7. Las plántulas regeneradas *in vitro* se transfirieron a macetas con vermiculita y se cubrieron con bolsas de plástico para favorecer su adaptación *ex vitro*. Se regaron con la mitad de la concentración del medio Murashige y Skoog (MS) cada 3 días y se cultivaron a 25 ± 2 °C con 16 h de luz en una cámara de crecimiento como se describió anteriormente y se mantuvieron en estas condiciones durante 2 meses aproximadamente. Posteriormente se retiró la bolsa de plástico y se aclimataron en condiciones en el invernadero (25–28 °C y 170–285 $\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de intensidad lumínica).

4.9 Experimentos de selección con kanamicina

Se realizaron experimentos para identificar la dosis respuesta en callos embriogénicos de aguacate. Para esto, se utilizó medio de inducción (I) con 50 mg de callos embriogénicos y la incorporación del aminoglicosido kanamicina en diferentes seis diferentes concentraciones (0, 50, 100, 200, 300, 400 mgL^{-1}). Se mantuvieron en condiciones de oscuridad por 20 días a 29 °C.

4.10 Preparación de células competentes de *Agrobacterium tumefaciens*

Se crecieron las células en medio de cultivo LB sin antibiótico, para diluirlas luego a 1.5 ml de cultivo en 40 ml de medio LB precalentado a 37 °C, manteniéndolas en agitación hasta que alcanzaron una concentración de 1.1×10^9 células ml^{-1} correspondiente a una densidad óptica a 600 nm (OD_{600}). La suspensión de células se centrifugó a 15 min a 3000 rpm, para luego adicionarle CaCl_2 50mM, colocando después durante 20 minutos en hielo, para luego de centrifugar obtener el botón de células a las cuales se les adicionará CaCl_2 (100mM) más glicerol al 10%.

4.11 Transformación por choque térmico

Se adicionaron 40ng de ADN plasmídico, en 20 μl de células competentes y se colocarán en hielo, para luego someterlas a choque calórico. Posteriormente, se crecieron en medio LB a 3000 rpm, para luego cultivarlas en medio LB sólido con el antibiótico kanamicina.

El medio de inducción de callos (IC) consistió en sales GM adicionado con 1 mg L⁻¹ de piridoxina, 1 mg L⁻¹ de tiamina, 100 mg L⁻¹ de mio-inositol, 1 g L⁻¹ de carbón 30 g L⁻¹ de sacarosa y 8 g L⁻¹ de agar, y diferentes concentraciones de ANA (2.5 o 10 mg L⁻¹), 2,4-D (5 o 10 mg L⁻¹) o Picloram (0.05, 0.1 o 0.2 mg L⁻¹).

4.12 Condiciones de transformación con el gen *uidA* (GUS)

Las masas proembriogénicas y los callos embriogénicos fueron removidos de frutos inmaduros de 5-8 cm (Pliego-Alfaro y Murashige, 1988), y fueron utilizados como explantes. Los EC se colocaron en medio de inducción el cual consistió de sales GM con 1 mg L⁻¹ de piridoxina, 1 mg L⁻¹ de tiamina, 100 mg L⁻¹ de mio-inositol, 1 g L⁻¹ de carbón 30 g L⁻¹ de sacarosa, 8 g L⁻¹ de agar y Picloram (0.2 mg L⁻¹); el pH se ajustó a 5.7 y se cultivaron en condiciones de oscuridad a 30°C. La transformación se realizó utilizando como explante masas proembriogénicas (MPE) y callos embriogénicos de aguacate criollo inoculadas con la cepa EHA105 y LBA4404 de *Agrobacterium tumefaciens*, que porta el vector pBI121 que contiene la construcción con el gen marcador selectivo neomicina fosfotransferasa II (*nptII*), que confiere resistencia a kanamicina, y el gen *uidA* que codifica para GUS bajo el control del promotor 35S (Figura 4.1) (Jefferson, 1987). La cepa de *A. tumefaciens* EHA105 fue transformada con el vector pBI121. La transformación se verificó mediante PCR. Se realizaron dos ensayos, utilizando *A. tumefaciens* con una DO de 0.4, 0.6 y de 0.8, así como diferentes tratamientos para cocultivo con acetosiringona en concentraciones de 20, 50, 200 y 400 µM por tratamiento.

La transformación de MPE se realizó mediante el protocolo descrito por Palomo-Ríos *et al.* (2012). Los embriones se inocularon en medio líquido de en presencia de *A. tumefaciens* y se agitaron lentamente durante 10 minutos. Posteriormente las MPE se transfirieron a medio de cocultivo y se mantuvieron en condiciones de oscuridad a 30°C durante 24 y 48 h. Una vez transcurrido este tiempo, se transfirieron a medio de selección y eliminación (MSE) de *A. tumefaciens* adicionado con kanamicina 50 g L⁻¹ y timentina 250 mg L⁻¹. A los 15 días en MSE se realizó la histoquímica de GUS (Jefferson, 1987).

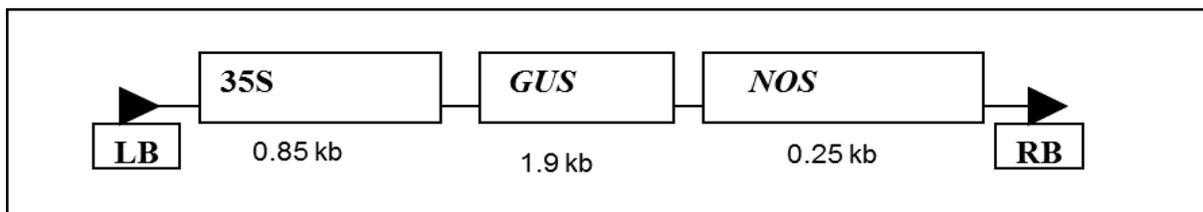


Figura 4.1 Construcción el gen marcador selectivo neomicina fosfotransferasa II (*nptII*), que confiere resistencia a kanamicina, y el gen *uidA* que codifica para GUS bajo el control del promotor 35S.

4.13 Procedimiento de transformación

El medio líquido (Gamborg *et al.*, 1968) con 2% de sacarosa, mio-inositol (100 mg L⁻¹), piridoxina (1 mg L⁻¹), se adicionó con un cultivo de la cepa LBA4404 de *A. tumefaciens* a una D.O.=0.8 en una proporción (v/v) de 5:1 respectivamente. Los embriones somáticos se incubaron en esta solución por 10 minutos en agitación lenta y posteriormente se incubaron en el medio de cocultivo con acetosiringona por 3 días a 25 °C, con un fotoperiodo de 16 h de luz (45-70 μmol m⁻² seg⁻¹) y 8 h de oscuridad.

4.14 Análisis estadístico

Para la embriogénesis somática directa e indirecta, la unidad experimental (UE) fue una caja de Petri con 5 EC, cada uno con tres repeticiones por cada accesión (Celaya 79, Comonfort 53, San Miguel, BG24, BG181 y Zutano) y diferentes concentraciones de ANA (2, 5 o 10 mg L⁻¹), 2,4-D (5 o 10 mg L⁻¹) o Picloram (0.05, 0.1 o 0.2 mg L⁻¹). Para evaluar la viabilidad de los callos embriogénicos a través del tiempo se utilizaron, 50 mg de callos por caja Petri se usaron como UE con 5 repeticiones, y se evaluó la regeneración al mes 1, 3, 6 y 9 de haber sido inducidos. La UE para la organogénesis fue una caja de Petri con 10 explantes de cada accesión y cinco réplicas con reguladores de crecimiento (0.5 mg L⁻¹ de BAP y 1 mg L⁻¹ AG3) o sin ellos. Para cada experimento se utilizó un diseño completamente al azar. La significancia se determinó mediante análisis de varianza con el paquete

estadístico SAS (SAS Institute, 2012) y la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$) para la comparación de medias.

V RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Embriogénesis directa

En trabajos previos de regeneración *in vitro* de aguacate de *Persea americana* var. Hass, se utilizaron frutos inmaduros para extraer EC en la etapa globular (Pliego-Alfaro y Murashige, 1988; Witjaksono y Litz, 1999). En contraste, en este trabajo aislamos EC en etapa cotiledonar de frutos inmaduros de diferentes accesiones de *P. americana* var. *Drymifolia* y del híbrido Zutano (Figura 5.1A), para facilitar su extracción (Figura 5.1B). Todos los EC mostraron primordios foliares, hipocotilo y ápice radicular (Figura 5.1C). Solo los EC de la accesión San Miguel respondieron a los diferentes tratamientos de inducción de la embriogénesis somática directa. Esto coincide con otros autores (Pliego-Alfaro y Murashige, 1988; Raharjo y Litz, 2005; Witjaksono y Litz, 1999), quienes observaron que la respuesta embriogénica de los explantes depende del genotipo. Los EC formaron ES en etapa globular en la zona de la radícula 15 días después de su cultivo en el medio I (Figura 5.1D). Feher (2019) indicó que esto puede deberse a que el inicio de la formación de embriones puede ocurrir a partir de células del periciclo tipo células madre y que es posible que la embriogénesis comparta pasos iniciales con la formación de raíces laterales. Después de 15 días en medio I se identificó que los grupos de ES que se formaron por explante se desarrollaban sincronizadamente en algunos explantes (Figura 5.1E) y en otros EC las fases de desarrollo eran diferentes (globular, torpedo y corazón) (Figura 5.1F y G). La maduración de los ES ocurrió en el medio M con 0.2 mg L⁻¹ de Picloram y un indicador fue el cambio de color, de translúcido (Figuras 5.1D y F) a blanco opaco (Figuras 5.1E y G), además de un cambio en el estado de desarrollo por su transición a etapa cotiledonar, la cual ocurrió aproximadamente dos semanas después de cultivo en el medio M. En esta etapa de maduración, los ES se escindieron del EC (Figura 5.1H) y se mantuvieron en el mismo medio hasta que alcanzaron un tamaño de 5-10 mm (2 semanas). Después de este tiempo, los ES se transfirieron al medio GE (Figura 5.1I), donde después de 15 días en presencia de luz, los embriones maduros comenzaron a fotosintetizar y germinaron después de 30 días de cultivo en el medio GE (Figura 5.1J). Este resultado contrasta con lo

reportado por Encina *et al.* (2014), en donde se requirió del doble de tiempo para obtener resultados similares con las variedades de aguacate Duke, Hass, Anaheim y A10 por la vía de embriogénesis indirecta y con cultivos en suspensión.

En el presente trabajo se observó que no todos los embriones maduros germinaron bipolarmente (ápice y raíz). Esto probablemente se debe a que la conversión de ES a planta con germinación bipolar se presenta en una frecuencia baja (Raharjo y Litz, 2003). Pliego-Alfaro y Murashige (1988) informaron que los meristemas no logran organizarse en la mayoría de los ES de aguacate, y que esto impide la germinación bipolar. Por esta razón en el presente estudio, los embriones unipolares germinados con aproximadamente 2 cm de altura (3 semanas en GE aproximadamente) se separaron de los cotiledones y se transfirieron al medio R (Figura 5.1J). Posteriormente, se transfirieron al medio E para promover la elongación de la parte apical y el crecimiento del sistema radicular (Figura 5.1K). Finalmente, se necesitaron dos meses para adaptarlas a las condiciones *ex vitro* (Figura 5.1L). Los tratamientos que promovieron el porcentaje más alto de explantes que formaron embriones somáticos, contenían 10 mg L⁻¹ ANA (66.6 %) ó 0.2 mg L⁻¹ Picloram (46.6 %); estos mismos tratamientos indujeron el mayor número de embriones por explante (Tabla 5.1).

El mayor número de plantas por explante se obtuvo con los tratamientos de 10 mg L⁻¹ de ANA y 0.2 mg L⁻¹ de Picloram (0.46 y 0.40, respectivamente) (Tabla 5.1). El sistema de regeneración por embriogénesis somática directa en aguacate no se había descrito anteriormente e implica una optimización del tiempo para obtener plantas completas. Sin embargo, el número de plantas completas obtenidas bajo esta vía es inferior comparado con la embriogénesis indirecta (Encina *et al.*, 2014). El proceso completo para obtener plantas desde la inducción de ES hasta la aclimatación lleva aproximadamente 6 meses, mientras que en el reporte más reciente de regeneración de aguacate (Encina *et al.*, 2014) se requirieron hasta 14 meses.

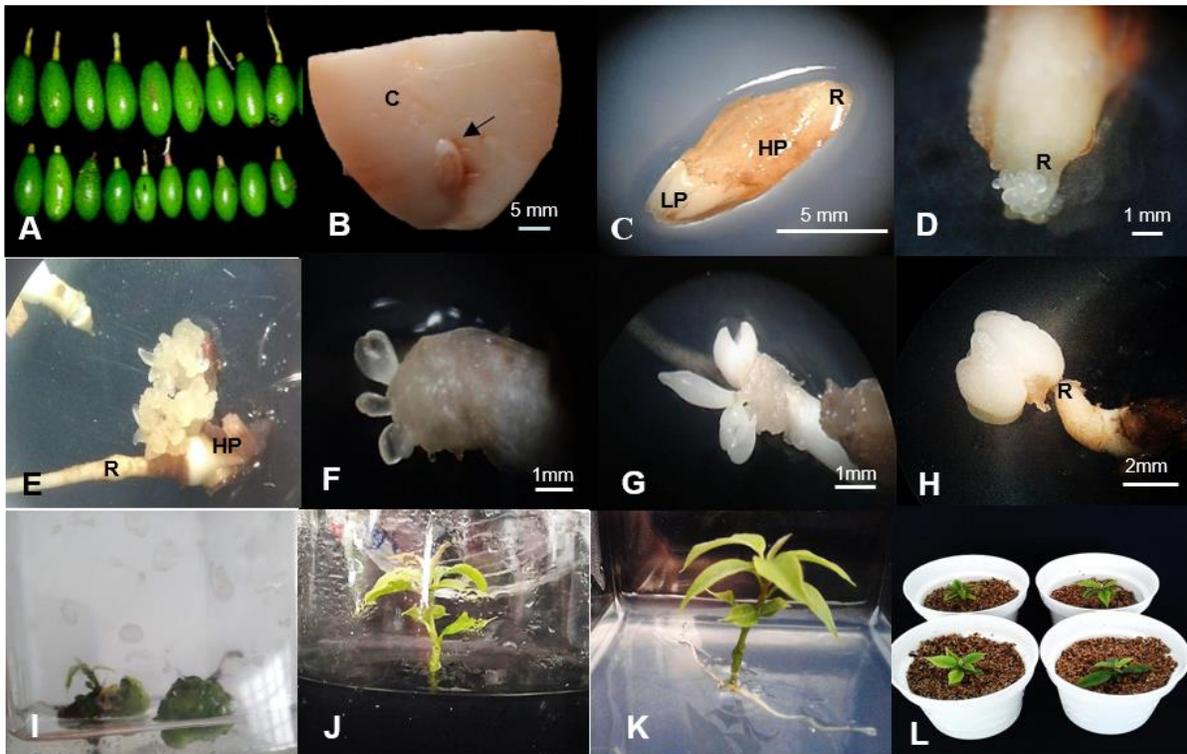


Figura 5.1 Embriogénesis somática directa en *P. americana* var. *Drymifolia*. A) Frutos inmaduros de 5-8 cm de diámetro; B) Embrión cigótico (EC), C cotiledon; C) Embrión cigótico, LP primordios foliares, H hipocotilo, R radícula; D) Embriones somáticos (ES) en etapa globular en el ápice radicular después de una semana en medio de inducción y maduración (0.2 mg L^{-1} Picloram); E) ES después de dos semanas en medio de inducción y maduración; F) ESs con aspecto translúcido en el EC; G) ES en maduración; H) ES maduro separado de la radícula; I) Germinación de ES maduro; J) Brotes en medio de enraizamiento; K) Plántula en medio de elongación; L) Plantas aclimatadas en condiciones de invernadero (después de 3 meses).

Tabla 5.1 Embriogénesis somática de *P. americana* var. *Drymifolia* accesión San Miguel.

Auxinas	Concentración mg L ⁻¹	Explantos con embriogénesis somática (%)	Promedio de embriones somáticos por explante	Embriones maduros germinados (%)	Eficiencia de regeneración Plantas/explante (%)
NAA	2	6.6 ± 0.67 c	0.53 ± 0.90 c	37.5 ± 0.37c	13.33 ± 0.31 c
	5	26.0 ± 0.80 b	1.20 ± 2.10 b	77.0 ± 0.20a	26.00 ± 0.37 b
	10	66.6 ± 0.64 a	3.00 ± 2.90 a	53.8 ± 0.33a	40.00 ± 0.37 a
2,4-D	5	20.0 ± 0.81 b	0.86 ± 1.70 c	20.0 ± 0.34c	-
	10	6.6 ± 0.67 c	0.13 ± 0.22 d	50.0 ± 0.34c	-
Picloram	0.05	20.0 ± 0.81 b	1.40 ± 2.60 b	71.4 ± 0.24b	26.00 ± 0.37 b
	0.1	20.0 ± 0.81 b	1.46 ± 2.00 b	20.0 ± 0.35c	6.00 ± 0.22 d
	0.2	46.6 ± 0.45 a	3.2 ± 2.90 a	81.8 ± 0.14a	46.00 ± 0.38 a

5.2 Embriogénesis indirecta

Los EC de la accesión San Miguel cultivados en 0.2 mg L⁻¹ de Picloram desarrollaron CE (Figura 5.2A). El 50% de los callos formados se mantuvieron en IC y el otro 50% fue transferido a medio M. De cada 50 mg de CE en medio M (Figura 5.2B), se obtuvo el máximo potencial de regeneración entre el primer y tercer mes después de inducidos y no se encontraron diferencias significativas; en promedio 10.2 y 10.0 embriones maduros (Figura 5.2C) de los cuales se obtuvieron 4.9 y 4.4 plantas completas respectivamente (Tabla 5.2). Al sexto mes el número de plantas disminuyó en un 80% mientras que en el noveno los embriones maduros perdieron su capacidad de germinar (Tabla 5.2). Witjaksono y Litz, (1999) mencionan que el potencial embriogénico en condiciones de mantenimiento depende del cultivar y puede variar de 3 meses a más de un año. Algunos de los embriones germinados mostraron malformaciones (Figura 5.2D), lo cual puede deberse a las condiciones de cultivo ya que otros autores (Pliego-Alfaro y Murashige, 1988; Witjaksono y Litz,

1999) han demostrado que manteniendo los embriones en una suspensión los fenotipos son más homogéneos y tienen mayor viabilidad. Esta ruta de regeneración por embriogénesis indirecta se ha reportado para otras variedades de aguacate (Encina *et al.*, 2014; Witjaksono y Litz, 1999) y en el presente estudio se muestra la primera evidencia para la variedad Drymifolia.

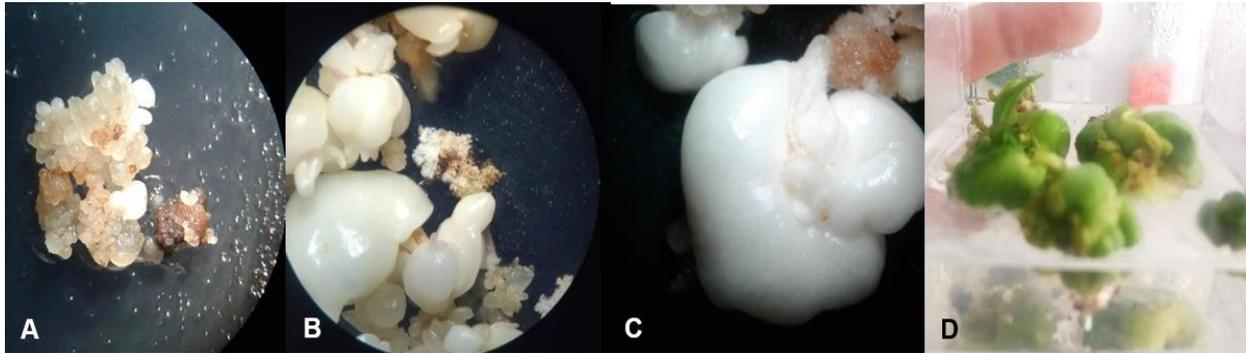


Figura 5.2 Embriogénesis somática indirecta en *P. americana* var. Drymifolia. A) Callos embriogénicos; B) Maduración de embriones somáticos (ES); C) ES maduro en medio de germinación. D) Plántulas en proceso de crecimiento.

Tabla 5.2 Regeneración de callos embriogénicos de *P. americana* var. Drymifolia accesión San Miguel.

Meses de subcultivo después de la inducción del callo	Promedio de embriones maduros/ 50 mg de callo	Germinación de embriones maduros (%)	Eficiencia de regeneración No. Plantas / No. embriones maduros (%)
Mes 1	10.2 ± 2.60 a	66 ± 2.31 a	45 ± 2.10 a
Mes 3	10.0 ± 1.00 a	60 ± 1.09 a	44 ± 2.20 a
Mes 6	4.0 ± 1.41 b	32 ± 0.12 b	25 ± 0.44 b
Mes 9	2.2 ± 2.00 c	-	-

5.3 Morfología de los brotes de embriones somáticos opacos blancos

La morfología de los brotes fue variable ya que algunos eran de tipo roseta (Figura 5.3C) y otros formaban hojas (Figura 5.3D). Algunos brotes menores de 5 mm no pudieron desarrollarse (Figura 5.3E) o presentaron malformaciones en las hojas (Figura 5.3F), esto posiblemente debido a su tamaño. Se han observado brotes similares de tipo roseta y hojas (Encina *et al.*, 2014; Pliego-Alfaro y Murashige, 1988). Sin embargo, no se observó alguna relación de la germinación tipo roseta u hojas con algún tratamiento en específico.



Figura 5.3. Diferencias morfológicas en la germinación de los embriones somáticos maduros A) Diferentes tamaños de embriones somáticos expuestos a la luz; B) Brote y cotiledones fotosintéticos de un embrión maduro; (C) Germinación tipo roseta; D) Embrión maduro con desarrollo foliar; E) Desarrollo foliar incompleto en embrión de 2 mm; F) Embrión de 2 mm con malformaciones de hojas.

5.4 Organogénesis

La formación de brotes múltiples se indujo cuatro semanas después de que los EC decapitados (Figura 5.4A) permanecieran en el medio RC (Figura 5.4B), mientras que los ECs que se cultivaron en el medio SRC requirieron seis semanas para el

desarrollo de brotes, aunque con menor eficiencia en todas las accesiones (Tabla 5.3). Hasta ahora, el uso de los EC decapitados para inducir la organogénesis no se había descrito en el aguacate, aunque se ha descrito en otras especies (Singh y Tiwari, 2012; Quintero-Jiménez *et al.*, 2010). En general, todas las accesiones de aguacate utilizadas en el presente estudio tuvieron respuesta organogénica (Tabla 5.3), aunque esta respuesta estuvo en función del genotipo. La accesión Comonfort 53 tuvo la mejor respuesta en el medio RC con respecto al número de explantes que formaron brotes (86%); en tanto que las accesiones BG181 y BG24 mostraron los valores más bajos para esta variable cuando se cultivaron en un medio RC (14 y 26 %, respectivamente) (Tabla 5.3).

Las accesiones San Miguel y Comonfort 53 formaron el porcentaje más alto explantes con brotes, aunque no hubo diferencias significativas en el promedio de brotes por explante (3.29 y 2.53, respectivamente) (Tabla 5.3). En contraste, Zulfiqar *et al.* (2009) observaron en aguacate del cv. Fuerte 2.5 brotes por explante con yemas axilares en comparación con 1.58 en las apicales. Por otro lado, en el presente trabajo se observó que Comonfort 53 y Celaya tuvieron un promedio de brotes por explante más bajo (2.53 y 1.93, respectivamente) comparados con San Miguel (3.29); sin embargo, el número de plantas por explante de Comonfort 53 y Celaya fue mayor (0.54 y 0.42 respectivamente) que San Miguel (0.38). Esto indica que la inducción inicial no siempre corresponde en la misma proporción a la diferenciación y el desarrollo de plantas completas (Tabla 5.3).

Una vez que los brotes alcanzaron 2-3 cm de longitud después de dos meses de cultivo en el medio RC, se procedió a escindirlos del explante original (Figura 3C), antes de cultivarlos en el medio MR, en el que ocurrió la emergencia de la raíz después de 2 semanas (Figura 3D) y posteriormente transferidos a ME (Figura 3E). Cuando las plántulas alcanzaron los 10 cm de largo se aclimataron (Figura 5.4F). Comonfort 53 tuvo la mayor eficiencia de regeneración (54%), seguido de Celaya 79 (42%) y San Miguel (38%) (Tabla 5.3). Esto es similar a lo descrito por Martínez-Pacheco *et al.* (2010) quienes mostraron una eficiencia de regeneración vía organogénesis de 57.5% para var. *Drymifolia*. Los resultados de este trabajo

mostraron que el protocolo de regeneración *in vitro* para la variedad de aguacate *Drymifolia* mediante la vía de organogénesis con EC es funcional para las diferentes accesiones y el híbrido de Zutano.

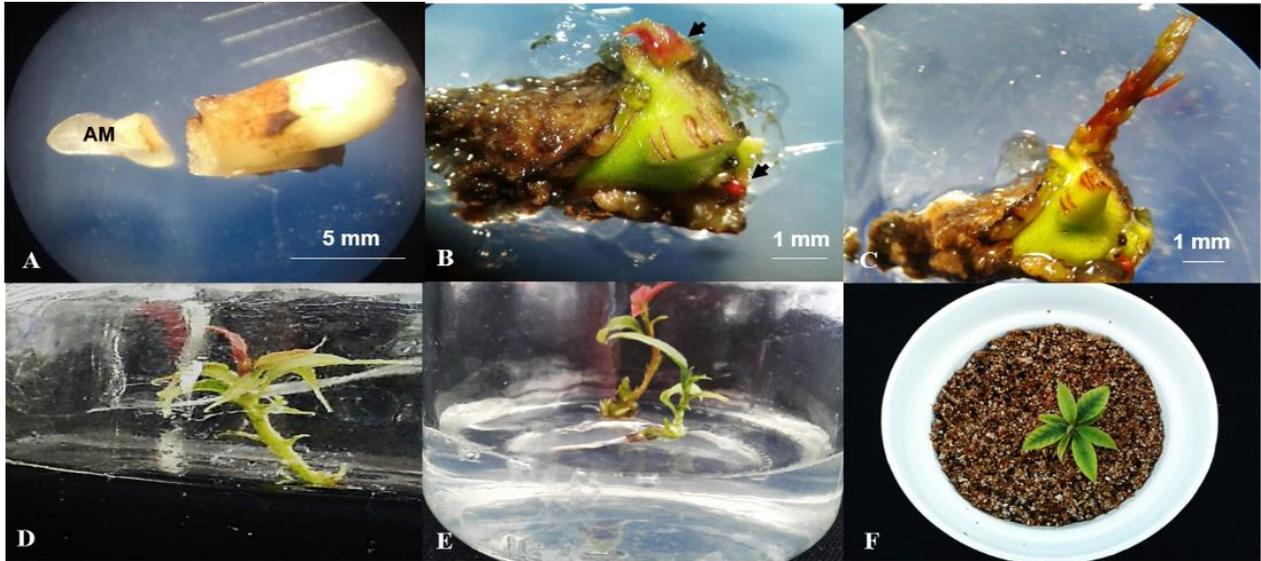


Figura 5.4 Regeneración de plantas de *P. americana* var. *Drymifolia* mediante organogénesis. A) Embrión cigótico sin ápice meristemático (AM); B) Brotes regenerados después de cuatro semanas en medio de inducción de organogénesis; C) Brotes de dos meses en medio con reguladores de crecimiento; D) Brotes en medio de enraizamiento; E) Plántulas en medio de elongación después de tres meses de iniciado el cultivo; F) Planta aclimatada en condiciones de invernadero durante 2 meses.

Tabla 5.3. Regeneración *in vitro* por organogénesis de diferentes accesiones de aguacate (*Persea americana* var. *Drymifolia*).

Accesión	Reguladores de crecimiento	Explantes con brotes (%)	Promedio de brotes por explante	Número total de plantas	Eficiencia de regeneración Plantas/

					explante (%)
Celaya 79	BAP+AG	66.0 ± 0.42 b	1.93 ± 1.23 b	21.0 ± 1.21 a	42 ± 0.31b
	SRC ^s	50.0 ± 0.68 c	1.64 ± 0.92 c	12.0 ± 1.38 c	24 ± 0.21c
BG24	BAP+AG	26.0 ± 0.55d	1.15 ± 1.12 d	5.0 ± 0.40 d	10 ± 0.11d
	SRC	10.0 ± 0.51 e	1.40 ± 2.60 c	1.0 ± 0.13 d	2 ± 0.12d
BG181	BAP+AG	14.0 ± 0.59 e	1.14 ± 1.72 d	2.0 ± 0.11 d	4 ± 0.23d
	SRC	12.0 ± 0.50 e	1.16 ± 1.23 d	1.0 ± 0.13 d	2 ± 0.12d
Zutano	BAP+AG	56.0 ± 0.77 b	2.35 ± 1.91 b	13.0 ± 0.80 c	26 ± 0.35 c
	SRC	30.0 ± 0.43 d	2.06 ± 0.80 b	4.0 ± 0.31 d	8 ± 0.24 d
San Miguel	BAP+AG	62.0 ± 0.76 b	3.29 ± 0.75 a	19 ± 1.09a	38 ± 0.10 b
	SRC	40.0 ± 0.46 c	3.05 ± 0.95 a	11 ± 0.52 c	22 ± 0.14 c
Comonfort 53	BAP+AG	86.0 ± 1.02 a	2.53 ± 1.02 a	27 ± 1.61 a	54 ± 0.15 a
	SRC	68.0 ± 0.80 b	2.38 ± 1.04 b	16 ± 0.97 b	32 ± 0.26 b

BAP= 6-bencilaminopurina AG=Ácido giberélico SRC= Sin reguladores de crecimiento

5.6 Dosis respuesta con Kanamicina

Para implementar un protocolo de transformación de aguacate, en primer lugar, se evaluó la tolerancia de los callos embriogénicos a diferentes concentraciones de kanamicina a través del tiempo y se encontró que en la concentración 200, 300 y 400 mg L⁻¹ (Figura 5.5) los callos comenzaron a necrosarse y a disminuir su tamaño en comparación con los que 50 y 100 mg L⁻¹ (Figura 5.5). El uso de antibióticos como agentes de selección son muy usados para para especies leñosas. Para el cultivo de aguacate se encontró que la dosis ideal para selección de callos de aguacate Hass es de 100 mg L⁻¹ (Cruz-Hernández *et al.* 1998), mientras que con la accesión San Miguel la dosis ideal es de 50 mg L⁻¹. Esto indica que la sensibilidad a las

concentraciones de kanamicina está relacionada con el genotipo (Palomo-Rios *et al.*, 2012)

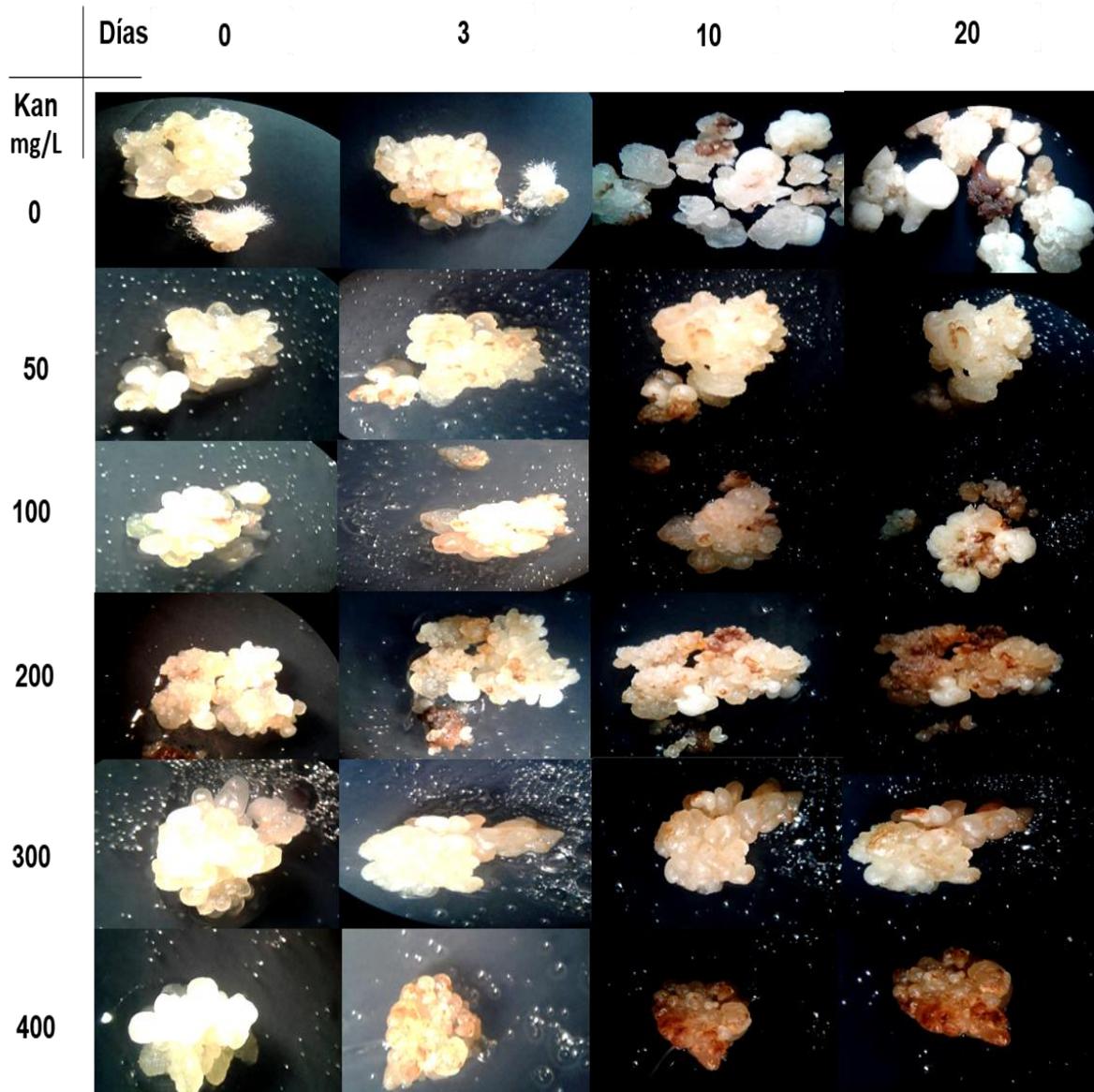


Figura 5.5 Dosis respuesta de callos embriogénicos en seis concentraciones en mg L⁻¹ de kanamicina.

5.7 Transformación de aguacate

En primera instancia se cocultivaron masas proembriogénicas (MPE) de aguacate criollo variedad *Drymifolia*, con la cepa EHA105 de *Agrobacterium tumefaciens*. Al cabo de 48 h de cocultivo, se encontró actividad de GUS en las MPE (Figura, 5.6). Esto coincide con reportado por Cruz-Hernández *et al.*, (1998) donde al transformar el mismo explante encontraron que el 40% de las MPE presentaban una coloración quimérica mientras que el resto tenía una coloración blanca. Con respecto a las diferentes concentraciones de acetosiringona (20, 50, 200 y 400 μM) se encontró actividad de GUS en todas las concentraciones mencionadas excepto en 20 μM . Sin embargo, la actividad más sobresaliente se identificó a 50 μM de acetosiringona (Figura 5.6) esto coincide con Ahmed *et al.*, (2012) donde probaron dos concentraciones (200 μM y 400 μM) donde demuestra que en la concentración más alta hay una inhibición de la transformación ya que sus mejores resultados correspondieron a las concentración de 200 μM . Con respecto a la DO_{600} 0.6 fue cualitativamente superior a 0.4 y 0.8 (Figura 5.6), Además, bajo esta condición las células permanecieron con menos daño (Figura 5.6). También se identificó que las áreas de las MPE que se encontraban en contacto con el medio cultivo con acetosiringona son las regiones donde se observa la coloración azul, esto confirma que existe una relación de la acetosiringona con la infección de *A. tumefaciens*. Además, se identificó que mejora la transformación y la actividad de la β glucuronidasa utilizando callos embriogénicos con la cepa EHA105 y 48h en cocultivo mientras que con la cepa LBA4404 la actividad glucuronidasa fue más baja en 24 y 48 h de cocultivo (Figura 5.7),

Ahmed *et al.*, (2012) evaluaron diferentes cepas de *A. tumefaciens* obteniendo mejores resultados con la cepa GV3850 que es más efectiva en la transformación de tejido que LBA4404, una explicación a estas diferencias pueden estar en el locus *att* que se encuentra en el cromosoma bacteriano, este locus contiene genes que están relacionados con la adhesión bacteriana a las células vegetales, por lo tanto los niveles de expresión de estos genes están correlacionados con la virulencia de las bacterias y a su vez con la eficiencia en la transformación (Matthysse *et al.*, 1996) Estos resultados demuestran que en este trabajo se logró la transformación de

aguacate criollo hasta la etapa de callos embriogénicos y que hasta donde tenemos noticia este sería el primer trabajo en ese sentido.

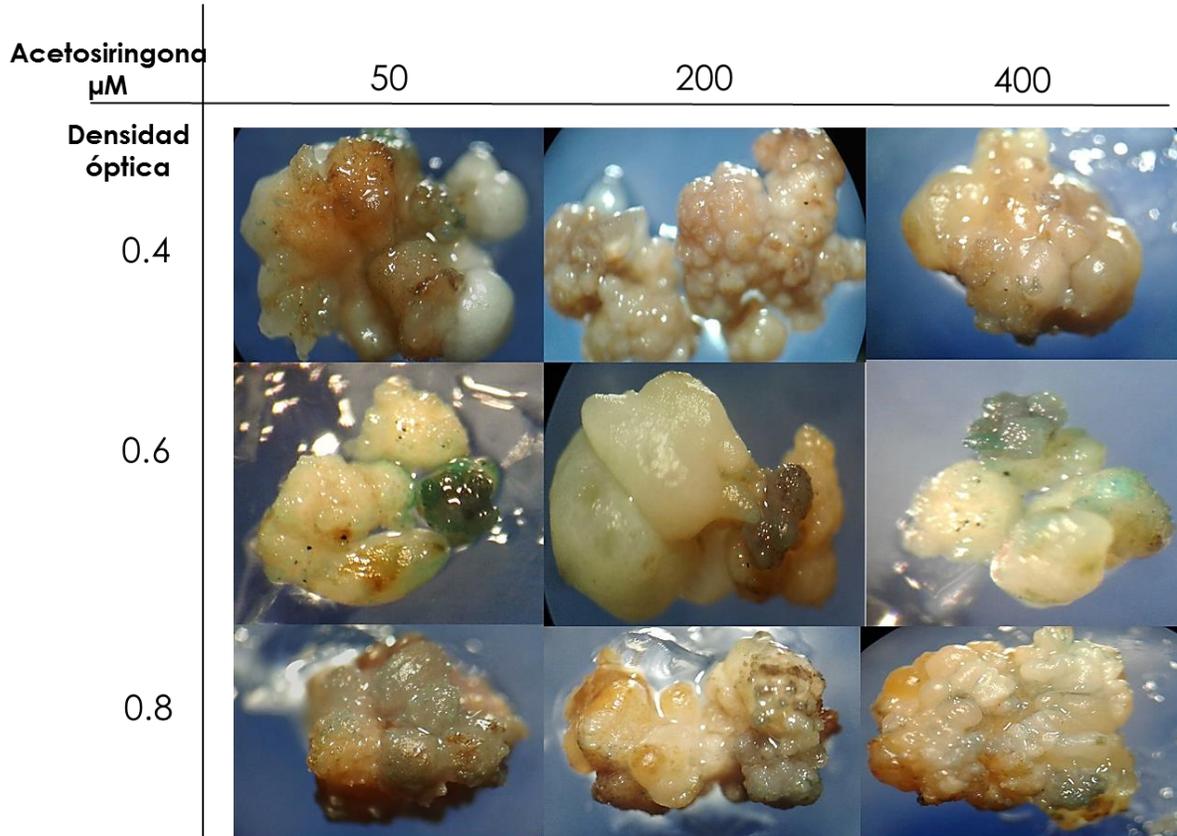


Figura 5.6 Masas proembriogénicas (MPE) con actividad β -glucuronidasa en coocultivo con diferentes concentraciones de acetosiringona por 48 h y diferentes densidades ópticas (DO_{600} 0.4, 0.6 y 0.8) de *A. tumefaciens* de la cepa EHA10.

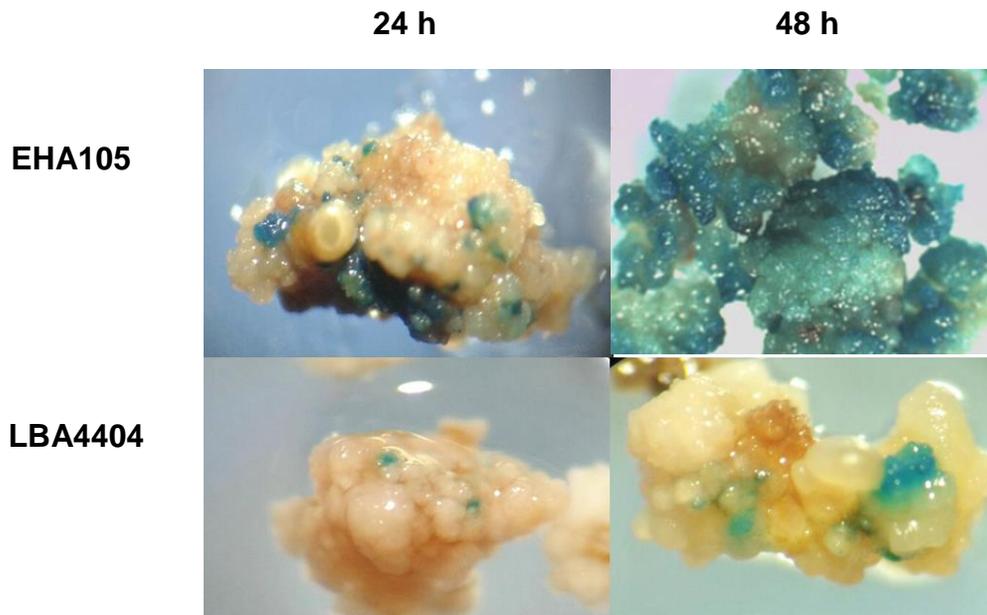


Figura 5.7. Callos embriogénicos con actividad β -glucuronidasa mantenidas en cocultivo con 50 μ m de acetosiringona por 24 y 48 h y 0.6 DO_{600} de *A. tumefaciens* de las cepas EHA105 y LBA4404.

VI. CONCLUSIONES

Se estableció un protocolo reproducible y eficiente para la regeneración *in vitro* de plantas de aguacate criollo de la variedad *Drymifolia* utilizando cinco accesiones. Este protocolo permitió regenerar plantas a partir de embriones cigóticos, por dos vías: embriogénesis somática y organogénesis. El uso de Picloram (0.82 μM) o ANA (53.7 μM) induce la formación de embriones somáticos a través de la embriogénesis directa, mientras que el Picloram (0.82 μM) promueve la formación de callos embriogénicos por embriogénesis indirecta. Se estableció la propagación *in vitro* a través de la organogénesis utilizando embriones cigóticos decapitados. San Miguel fue la única variedad con respuesta de embriogénesis somática, mientras que Comonfort 53 tuvo la mejor tasa organogénica. Por ambas vías de regeneración se obtuvieron plantas completas que se adaptaron a condiciones de invernadero.

Los factores más favorables para un sistema de transformación de aguacate criollo son una concentración de acetociringona de 50 μM y el utilizar *A. tumefaciens* a una DO de 0.6 y 48 h en cocultivo con la cepa EHA105. Se observó mayor eficiencia de transformación en los callos en con embriones en estado globular que en las masas proembriogénicas. Los callos inoculados con la cepa EHA 105 en apariencia muestran mayor actividad glucoronidasa. Esta evidencia muestra un nuevo sistema de transformación de callos de aguacate (*Persea americana* var. *Drymifolia*), el cual facilitará estudios futuros en el mejoramiento genético por transformación.

VII. LITERATURA CITADA

- Aboshama, H.M., El-Sayed, G.A., & Al-Dremly, N.I. (2018).** Somatic embryogenesis induction of litchi (*Litchi chinensis* Sonn.) from leaves of mature trees. *Journal of Scientific and Innovative Research* 7(3): 78-84.
- Ahmed, M.F., Kantharajah, A.S., & Holford, P. (2001).** Factors affecting adventitious shoot and root formation from the avocado cultivar 'Hass' (*Persea americana*, Mill.) *in vitro*. *Gartenbauwissenschaft* 66(6): 293-297.
- Akhtar, N. (2018).** Somatic embryogenesis in guava (*Psidium guajava* L.). En *Step Wise Protocols for Somatic Embryogenesis of Important Woody Plants*, pp. 1-24. Springer Nature. Cham, Suiza.
- Al-Shara, B., Taha, R.M., Mohamad, J., Elias, H., & Khan, A. (2020).** Somatic embryogenesis and plantlet regeneration in the *Carica papaya* L. cv. Eksotika. *Plants* 9(3): 360.
- Altman, A., & Loberant, B. (2003).** Micropropagation of plants, principles and practices. En *Encyclopedia of Cell Technology*. John Wiley & Sons, Nueva York, NY.
- Álvarez-Acosta C., Marrero-Domínguez, A. Gallo-Llobet, L., & González-Rodríguez, A.M. (2018).** Physiological response of selected avocados (*Persea americana*) subjected to NaCl and NaHCO₃ stress. *Scientia Horticulturae* 237: 81-88.
- Astuti, R.D., Harahap, F., & Edi, S. (2020).** Callus induction of mangosteen (*Garcinia mangostana* L.) *in vitro* with addition of growth regulators. En *Journal of Physics: Conference Series* (Vol. 1485, No. 1, p. 012029). IOP Publishing. Bristol, Reino Unido.
- Atta, R., Laurens, L., Boucheron-Dubuisson, E., Guivarch, A., Carnero, E., Giraudat-Pautot, V., Rech, P, & Chriqui, D. (2009).** Pluripotency of *Arabidopsis* xylem pericycle underlies shoot regeneration from root and hypocotyl explants grown *in vitro*. *Plant Journal* 57: 626–644.

- Babaoglu, M., Davey, M.R., & Power, J.B. (2000).** Genetic engineering of grain legumes: key transformation events. *AgBiotechNet*, 2(ABN 050).
- Barceló-Muñoz, A., Encina, C.L., Simón-Pérez, E., & Pliego-Alfaro, F. (1999).** Micropropagation of adult avocado. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)* 58(1): 11-17.
- Barceló-Muñoz, A., & Pliego-Alfaro, F. (2003).** Micropropagation of avocado (*Persea americana* Mill.). En *Micropropagation of Woody Trees and Fruits*, pp. 519-542. Springer, Dordrecht, Países Bajos.
- Bandaralage, J.C.A.H., Hayward, A., O'Brien, C., & Mitter, N. (2015).** Gibberellin and cytokinin in synergy for a rapid nodal multiplication system of avocado. En *Proceedings of the World Avocado Congress VIII*, pp. 13-18. Lima, Perú.
- Bandaralage, J.C., Hayward, A., & Mitter, N. (2017).** Micropropagation of avocado (*Persea americana* Mill.). *American Journal of Plant Sciences* 8(11): 2898-2921.
- Barrera-Guerra, J.L., Ramirez-Malagon, R. & Martinez-Jaime, O.A. (2001).** *In vitro* propagation of avocado (*Persea drymifolia* Ness.). Proceedings of the Induced Mutations in Connection with Biotechnology for Crop Improvement of the FAO/IAEA. Division of Nuclear Techniques in Food and Agriculture, pp. 63-69. Lima, Perú.
- Barrientos, A.F., García, E., & Avitia, E. (1996).** Anatomía del fruto de aguacate. ¿Drupa o Baya? Universidad Autónoma Chapingo, Chapingo, México.
- Barrientos-Priego, A.F., & López-López, L. (2000).** Historia y genética del aguacate. En *El Aguacate y su Manejo Integrado*. Mundi-Prensa, pp. 19-31. Distrito Federal, México.
- Barringer, S.A., Mohamed-Yasseen, Y., & Splittstoesser, W.E. (1996).** *In vitro* multiplication and plantlet establishment of avocado. *In Vitro-Plant* 32(2): 119-121.
- Bello-Bello, J.J., Cruz-Cruz, C.A., & Pérez-Guerra, J.C. (2019).** A new temporary immersion system for commercial micropropagation of banana (*Musa AAA*

- cv. Grand Naine). *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* 55(3): 313-320.
- Benmahioul, B., Kaid-Harche, M., Dorion, N., & Daguin, F. (2009).** *In vitro* embryo germination and proliferation of pistachio (*Pistacia vera* L.). *Scientia Horticulturae* 122(3): 479-483.
- Bennett, J. (1994).** DNA-based techniques for control of rice insects and diseases: Transformation, gene tagging and DNA fingerprinting. En *Rice pest science and management*. International Rice Research Institute, pp. 147-172. Los Baños, Filipinas.
- Ben-Ya'acov, A. (1987).** Avocado rootstock-scion relationships. South Africa. *South African Avocado Growers' Association Yearbook* 10: 30-32.
- Ben-Ya'acov, A., & Michelson, E. (1995).** Avocado rootstocks. *Horticultural Reviews-Westport then New York* 17: 381-429.
- Bergh, B., & Ellstrand. (1987).** Taxonomy of the avocado. *California Avocado Society Yearbook* 70: 135-145.
- Bett, C.C., Mweu, C.M., & Nyende, A.B. (2019).** *In vitro* regeneration of coconut (*Cocos nucifera* L.) through indirect somatic embryogenesis in Kenya. *African Journal of Biotechnology* 18(32): 1113-1122.
- Bevan, M.W., Flavell, R.B., & Chilton, M.D. (1983).** A chimaeric antibiotic resistance gene as a selectable marker for plant cell transformation. *Nature* 304(5922): 184-187.
- Bhat, A.I., & Rao, G.P. (2020).** Virus Elimination by Meristem-Tip Culture. In *Characterization of Plant Viruses*, pp. 465-477. Humana Press, Nueva York, NY.
- Bhatia, S., & Bera, T. (2015).** Somatic embryogenesis and organogenesis. *Modern Applications of Plant Biotechnology in Pharmaceutical Sciences*: 209-230.
- Biasi, L.A., Koller, O.K., & Kampf, A.N. (1994).** Micropropagation of the avocado "Ouro Verde" through culture of nodal segments. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira* 29(7): 1051-1058.

- Biasi, L.A. (1995).** Fitotoxicidade de três antibióticos na cultura *in vitro* de abacateiro. *Bragantia* 54(2): 251-256.
- Birch, R.G. (1997).** Plant transformation: problems and strategies for practical application. *Annual Review of Plant Biology* 48(1): 297-326.
- Bonomelli C., Celis, V., Lombardi; G., & Mártiz, J. (2018).** Salt stress effects on avocado (*Persea americana* Mill.). Plants with and without seaweed extract (*Ascophyllum nodosum*) application. *Agronomy* 8: 64.
- Butt, A.J., Roberts, C.G., Seawright, A.A., Oelrichs, P.B., MacLeod, J.K., Liaw, T. Y., Kavallaris, M., Somers-Edgar, T.J., Lehrbach, G.M., Watts, C.K., & Sutherland, R.L. (2006).** A novel plant toxin, persin, with in vivo activity in the mammary gland, induces Bim-dependent apoptosis in human breast cancer cells. *Molecular Cancer Therapeutics* 5(9), 2300-2309.
- Caliskan, M., Turet, M., & Cuming, A.C. (2004).** Formation of wheat (*Triticum aestivum* L.) embryogenic callus involves peroxide-generating germin-like oxalate oxidase. *Planta*, 219(1): 132-140.
- Campos, N.A., da Silva, G.J., de Paula, M.F.B., Rodrigues, T.B., Rodrigues, L.A. Z., & Paiva, L.V. (2016).** Direct organogenesis protocol from shoot segments of '*Solanum tuberosum*' cv. Monalisa. *Australian Journal of Crop Science* 10(7): 964.
- Campos, N.A., Panis, B., & Carpentier, S.C. (2017).** Somatic embryogenesis in coffee: the evolution of biotechnology and the integration of omics technologies offer great opportunities. *Frontiers in Plant Science* 8: 1460.
- Cardoso, J.C., Curtolo, M., Latado, R.R., & Martinelli, A.P. (2017).** Somatic embryogenesis of a seedless sweet orange (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck). *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* 53(6): 619-623.
- Castiglioni, P., Warner, D., Bensen, R.J., Anstrom, D.C., Harrison, J., Stoecker, M., Abad, M., Kumar, G., Salvador, S., D'Ordine, R., Navarro, S., Black, S., Fernandes, M., Targolli, J., Dasgupta, S., Bonin, C., Luethy, M.H., & Heard, J.E. (2008).** Bacterial RNA chaperones confer abiotic stress tolerance in plants

- and improved grain yield in maize under water-limited conditions. *Plant Physiology* 147(2): 446-455.
- Castro, M., Oyanedel, E., & Cautin, R. (1995).** *In vitro* shoot proliferation in avocado (*Persea americana* Mill.) induced by CPPU. En *Proceedings of the World Avocado Congress* 3: 223-226.
- Chadipiralla, K., Gayathri, P., Rajani, V., & Reddy, P.V.B. (2020).** Plant Tissue Culture and Crop Improvement. En *Sustainable Agriculture in the Era of Climate Change*, pp. 391-412. Springer Nature. Cham, Suiza.
- Chanderbali, A.S., Albert, V.A., Ashworth, V.E., Clegg, M.T., Litz, R.E., & Soltis, D.E. (2008).** *Persea americana* (avocado): bringing ancient flowers to fruit in the genomics era. *Bioessays* 30(4): 386-396.
- Char, S.N., Lee, H., & Yang, B. (2020).** Use of CRISPR/Cas9 for targeted mutagenesis in Sorghum. *Current Protocols in Plant Biology* 5(2): e20112.
- Chauhan, R., & Shirkot, P. (2020).** Micropropagation of endangered medicinal plant *Bacopa monnieri* (L.) Pennell. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry* 9(2): 1614-1620.
- Condic, M.L. (2014).** Totipotency: what it is and what it is not. *Stem Cells and Development* 23(8): 796-812.
- Cruz-Hernandez, A., Litz, R.E., & Gomez Lim, M., Witjaksono, W. (1998).** *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of embryogenic avocado cultures and regeneration of somatic embryos. *Plant Cell Reports* 17(6-7): 497-503.
- De Greef, W., Delon, R., De Block, M., Leemans, J., & Botterman, J. (1989).** Evaluation of herbicide resistance in transgenic crops under field conditions. *Bio/technology* 7(1): 61-64.
- Debnath, S.C., & Goyali, J.C. (2020).** *In Vitro* Propagation and Variation of Antioxidant Properties in Micropropagated Vaccinium Berry Plants-A Review. *Molecules* 25(4): 788.

- de la Viña, G., Barceló-Muñoz, A., & Pliego-Alfaro, F. (2001).** Effect of culture media and irradiance level on growth and morphology of *Persea americana* Mill. microcuttings. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)* 65(3): 229.
- Dias, M.I., Sousa, M.J., Alves, R.C., & Ferreira, I.C. (2016).** Exploring plant tissue culture to improve the production of phenolic compounds: A review. *Industrial Crops and Products* 82: 9-22.
- Dreger, M., Mól, R., Deja, A., Raj, E., Mańkowska, G., & Wielgus, K. (2019).** Improved plant regeneration in callus cultures of *Sorghum bicolor* (L.) Moench. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 55(2): 190-198.
- Duarte, P.F., Chaves, M.A., Borges, C.D. (2016).** Avocado: characteristics, health benefits and uses. *Ciência Rural* 46(4): 747–754.
- Encina, C.L., Parisi, A., O'Brien, C., & Mitter, N. (2014).** Enhancing somatic embryogenesis in avocado (*Persea americana* Mill.) using a two-step culture system and including glutamine in the culture medium. *Scientia Horticulturae* 165: 44-50.
- Escobedo-GraciaMedrano, R.M., Enríquez-Valencia, A.J., Youssef, M., López-Gómez, P., Cruz-Cárdenas, C.I., & Ku-Cauich, J.R. (2016).** Somatic Embryogenesis in Banana, *Musa* ssp. En *Somatic embryogenesis: fundamental aspects and applications*, pp. 381-400. Springer Nature, Cham, Suiza.
- FAOSTAT (2018).** Statistics of crops production by country. Food and Agriculture Organization, Rome. <http://www.fao.org/faostat/en/#data> (10 October 2020).
- Feher, A. (2019)** Callus, Dedifferentiation, Totipotency, Somatic Embryogenesis: What These Terms Mean in the Era of Molecular Plant Biology? *Frontiers in Plant Science* 10: 1-11.
- Filonova, L. H., Bozhkov, P.V., & Arnold, S.V. (2000).** Developmental pathway of somatic embryogenesis in *Picea abies* as revealed by time-lapse tracking. *Journal of Experimental Botany* 51(343): 249-264.

- Fonseca Duarte, P., Alves Chaves, M., Dellinghausen Borges, C., & Barboza Mendonça, C.R. (2016).** Avocado: characteristics, health benefits and uses. *Ciencia Rural* 46: 747-754.
- Fraley, R.T., Rogers, S.G., Horsch, R.B., Sanders, P.R., Flick, J.S., Adams, S.P., Bittner, M.L., Brand L.A., Fink, C.L., Fry, J.S., Gallupi, G.R., Goldberg, S.B., Hoffmann, N.L., & Woo, S.C. (1983).** Expression of bacterial genes in plant cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 80(15): 4803-4807.
- Fuentes, J.L., Rodríguez, N.N., Santiago, L., Valdés, Y., Ramírez, I.M., & Rodríguez, J.A. (2004).** Zygotic embryo culture in avocado (*Persea americana* Mill). *Cultivos Tropicales* 25(3): 73-76.
- Fulgoni, V.L., Dreher, M., & Davenport, A.J. (2013).** Avocado consumption is associated with better diet quality and nutrient intake, and lower metabolic syndrome risk in US adults: results from the National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) 2001–2008. *Nutrition Journal* 12(1): 1.
- Gamborg, O.L., Miller, R., & Ojima, K. (1968).** Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Experimental cell research*, 50(1): 151-158.
- Gaj, M.D. (2011).** Somatic embryogenesis and plant regeneration in the culture of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. immature zygotic embryos. In *Plant Embryo Culture*, pp. 257-265. Humana Press. Nueva York, NY.
- Ghadirzadeh-Khorzoghi, E., Jahanbakhshian-Davaran, Z., & Seyedi, S.M. (2019).** Direct somatic embryogenesis of drought resistance pistachio (*Pistacia vera* L.) and expression analysis of somatic embryogenesis-related genes. *South African Journal of Botany* 121: 558-567.
- Girijashankar, V., Sharma, K.K., Balakrishna, P., & Seetharama, N. (2007).** Direct somatic embryogenesis and organogenesis pathway of plant regeneration can seldom occur simultaneously within the same explant of sorghum. *Journal of SAT Agricultural Research* 3(1): 1-3.
- Gunjan S., Maymon M. & Freeman S. (2017).** Epidemiology, pathology and identification of *Colletotrichum* including a novel species associated with

- avocado (*Persea americana*) anthracnose in Israel. *Scientific Reports* 7: 15839.
- Guzmán García, E. (2012).** Avocado somatic embryogenesis: maturation and germination of somatic embryos, characterization and cryopreservation of embryogenic cultures. Tesis Doctoral. Universidad de Córdoba. Córdoba, España.
- Hansen, G., & Wright, M.S. (1999).** Recent advances in the transformation of plants. *Trends in Plant Science*, 4(6): 226-231.
- Hartweck, L.M., Lazzeri, P.A., Cui, D., Collins, G.B., & Williams, E.G. (1988).** Auxin-orientation effects on somatic embryogenesis from immature soybean cotyledons. *In Vitro Cellular & Developmental Biology* 24(8): 821-828.
- Herrera-Estrella, L., Depicker, A., Van Montagu, M., & Schell, J. (1983).** Expression of chimaeric genes transferred into plant cells using a Ti-plasmid-derived vector. *Nature*, 303(5914): 209-213.
- Hill, K., & Schaller, G.E. (2013).** Enhancing plant regeneration in tissue culture: a molecular approach through manipulation of cytokinin sensitivity. *Plant Signaling & Behavior* 8(10): 212-24.
- Hofman, P.J., Vuthapanich, S., Whiley, A.W., Klieber, A., & Simons, D.H. (2002).** Tree yield and fruit minerals concentrations influence 'Hass' avocado fruit quality. *Scientia Horticulturae* 92(2): 113-123.
- Horsch, R.B., Fraley, R.T., Rogers, S.G., Sanders, P.R., Lloyd, A., & Hoffmann, N. (1984).** Inheritance of functional foreign genes in plants. *Science* 223(4635): 496-498.
- Hu, W., Fagundez, S., Katin-Grazzini, L., Li, Y., Li, W., Chen, Y., Wang, X., Deng, Z., Xie, S., McAvoy, R.J., & Li, Y. (2017).** Endogenous auxin and its manipulation influence *in vitro* shoot organogenesis of citrus epicotyl explants. *Horticulture Research* 4: 17071.
- Hussain, M., Raja, N.I., Iqbal, M., Iftikhar, A., Sadaf, H.M., Sabir, S., Sultan, M.A., & Faz, M. N.A. (2016).** Plantlets regeneration via somatic embryogenesis from

- the nucellus tissues of Kinnow mandarin (*Citrus reticulata* L.). *American Journal of Plant Sciences* 7(6): 798-805.
- Ibarra-López, A., Ojeda-Zacarías, M., García-Zambrano, E.A., & Gutiérrez-Diez, A. (2016).** Inducción *in vitro* de brotes de dos cultivares de aguacate raza mexicana *Persea americana* var. *Drymifolia* Schltdl. & Cham. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 7(2): 337-347.
- Ikeuchi, M., Ogawa, Y., Iwase, A., & Sugimoto, K. (2016).** Plant regeneration: cellular origins and molecular mechanisms. *Development* 143(9): 1442-1451.
- Iliev, I., Gajdosova, A., Libiaková, G., & Jain, S.M. (2010).** Plant micropropagation. *Plant Cell Culture: Essential Methods*, pp. 1-23. John Wiley & Sons. Londres, Reino Unido.
- Imbert, F.M (1997).** Delayed pistil senescence causes an overlap in protogyny in 'Tonnage' avocado. *California Avocado Society Yearbook* 81: 99-106.
- Jakubeková, M., Pretová, A., & Obert, B. (2011).** Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature embryo induced callus of maize (*Zea mays* L.). *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences* 1(4): 478-487.
- Jefferson, R.A., Kavanagh, T.A., & Bevan, M.W. (1987).** GUS fusions: beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *The EMBO Journal* 6(13): 3901-3907.
- Jiménez, V.M. (2001).** Regulation of *in vitro* somatic embryogenesis with emphasis on to the role of endogenous hormones. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal* 13(2): 196-223.
- Kalhari, N., Nulit, R., Go, R., Zulkifly, S., Azizi, P., & Abiri, R. (2017).** Selection, characterizations and somatic embryogenesis of Malaysian salt-tolerant rice (*Oryza sativa* cv. MR219) through callogenesis. *International Journal of Agriculture and Biology* 19(1): 157-163.
- Kanchiswamy, C.N. (2016).** DNA-free genome editing methods for targeted crop improvement. *Plant Cell Reports* 35(7): 1469-1474.

- Kaur, A., Reddy, M.S., & Kumar, A. (2018).** Direct somatic embryogenesis of potato [*Solanum tuberosum* (L.)] cultivar 'Kufri Chipsona 2'. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)* 134(3): 457-466.
- Kawagishi, H., Fukumoto, Y., Hatakeyama, M., He, P., Arimoto, H., Matsuzawa, T., Arimoto, Y., Suganuma, H., Inakuma, T., Sugiyama, K. (2001).** Liver injury suppressing compounds from avocado (*Persea americana*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49(5): 2215-2221.
- Kshirsagar, S.A., Jadhav, P.V., Kale, P.B., Nandanwar, R.S., Walke, R.D., & Dani, R.G. (2017).** TDZ-Induced efficient in-vitro regeneration and flowering through direct shoot organogenesis in soybean cv. JS-335. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 60: e17160524.
- Lahav, E., & Lavi, U. (2009).** Avocado genetics and breeding. En *Breeding plantation tree crops: tropical species*, pp. 247-285. Springer. Nueva York, NY.
- Lemos, E.E.P., & Blake, J. (1996).** Micropropagation of juvenile and adult *Annona squamosa*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)* 46(1): 77-79.
- Lin, L., Junqiang, L., Zong, H., & Wang, Y. (2020).** Effect of antibiotics on *Agrobacterium*-mediated transformation from anther derived embryos of *Eriobotrya japonica* (Thunb.) Lindl. cv.'Dawuxing'. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology* 95(8): 1-11.
- Litz, R.E., & Grosser, J.W. (1998).** Isolation, culture and regeneration of avocado (*Persea americana* Mill.) protoplasts. *Plant Cell Reports* 18(3-4): 235-242.
- Litz, R., Efendi, D., Raharjo, S.H.T., Padilla, G., & Moon, P.A. (2007).** Genetic transformation of avocado with S-adenosylmethionine hydrolase (Samase) and evaluation of transformants after three years. En *Proceedings VI World Avocado Congress CD*, 1c-24. Viña del Mar, Chile.
- Litz, R.E., Efendi, D., Raharjo, S.H.T., & Suárez, I. (2005).** Genetic transformation of avocado (*Persea americana* Mill.): A coordinated strategy for crop improvement. *Acta Horticulturae* 692: 131-136.

- Loyola-Vargas, V.M., & Ochoa-Alejo, N. (2018).** An introduction to plant tissue culture: advances and perspectives. En *Plant Cell Culture Protocols*, pp. 3-13. Humana Press. Nueva York, NY.
- Lowe, K., La Rota, M., Hoerster, G., Hastings, C., Wang, N., Chamberlin, M., Wu, E., Jones, T., & Gordon-Kamm, W. (2018).** Rapid genotype “independent” *Zea mays* L.(maize) transformation via direct somatic embryogenesis. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* 54(3): 240-252.
- Lu, Q.-Y., Zhang, Y., Wang, Y., Wang, D., Lee, R.-p., Gao, K., Byrns, R., & Heber, D. (2009).** California Hass avocado: profiling of carotenoids, tocopherol, fatty acid, and fat content during maturation and from different growing areas. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57(21):10408–10413.
- Mahalakshmi, A., Khurana, J.P., & Khurana, P. (2003).** Rapid induction of somatic embryogenesis by 2, 4-D in leaf base cultures of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Biotechnology* 20(4): 267-273.
- Maheswari, P., & Rangaswamy, N.S. (1958).** Polyembryony and *in vitro* culture of embryos of citrus and mangifera. *Indian Journal of Horticulture* 15: 275-282.
- Mansoor, F. (2018).** Development of a protocol for the proliferation of *in vitro* axillary buds in avocado (*Persea americana*) cv.'edranol'. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias, Universidad de Witwatersrand. Johannesburgo, Sudáfrica.
- Marais, L.J., (2004).** Avocado diseases of major importance worldwide and their management. En *Diseases of Fruits and Vegetables*, vol. II. pp. 1–36. Springer. Dordrecht, Países Bajos.
- Mariani, T.S., Miyake, H., & Takeoka, Y. (2002).** Direct somatic embryogenesis in rice (*Oryza sativa* L.): Structural and Developmental Patterns. *Jurnal Matematika dan Sains* 7(2): 53-56.
- Márquez-Martín, B., A. Barceló-Muñoz, A., Pliego-Alfaro, F., & Sánchez-Romero, C. (2012).** Somatic embryogenesis and plant regeneration in avocado (*Persea americana* Mill.): influence of embryogenic culture type. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology* 21:180-188.

- Márquez-Martín, B., Sesmero, R., Quesada, M.A., Pliego-Alfaro, F., & Sánchez-Romero, C. (2011).** Water relations in culture media influence maturation of avocado somatic embryos. *Journal of Plant Physiology* 168(17): 2028-2034.
- Martínez-Pacheco M.M., L.M. Suárez-Rodríguez, A. Hernández-García, R. Salgado-Garciglia, I.V. Fernández, M.E.A. Palomares, M.A. Cortés-Rodríguez & R. López-Gómez (2010).** *In vitro* propagation of Mexican race avocado (*Persea americana* Mill. Var. *Drymifolia*). *Acta Horticulturae* 923: 47-52.
- Matthysse, A.G., Yarnall, H.A., & Young, N. (1996).** Requirement for genes with homology to ABC transport systems for attachment and virulence of *Agrobacterium tumefaciens*. *Journal of Bacteriology* 178(17): 5302-5308.
- Méndez-Zúñiga, S.M., Corrales-García, J.E., Gutiérrez-Grijalva, E.P., García-Mateos, R., Pérez-Rubio, V., & Heredia, J.B. (2019).** Fatty acid profile, total carotenoids, and free radical-scavenging from the lipophilic fractions of 12 native Mexican avocado accessions. *Plant Foods for Human Nutrition* 74(4): 501-507.
- Mohamed-Yasseen, Y. (1993).** *In vitro* propagation of avocado (*Persea americana* Mill.). *California Avocado Society Yearbook* 77: 107–111.
- Mokhtari, A., Alizadeh, H., Samadi, B.Y., Omid, M., Otroshy, M., & Moeini, Z. (2013).** Effect of plant growth regulators on direct shoot regeneration of wheat immature embryonic explants. *Journal of Agricultural Engineering and Biotechnology* 1(3): 74-80.
- Moreno-Vázquez, S., Larrañaga, N., Uberhuaga, E.C., Braga, E.J.B., & Pérez-Ruiz, C. (2014).** Bacterial contamination of *in vitro* plant cultures: confounding effects on somaclonal variation and detection of contamination in plant tissues. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)* 119(3): 533–541.
- Mooney, P.A., & Van Staden, J. (1987).** Induction of embryogenesis in callus from immature embryos of *Persea americana*. *Canadian Journal of Botany* 65: 622-626.

- Munkvold, G.P., Hellmich, R.L., & Rice, L.G. (1999).** Comparison of fumonisin concentrations in kernels of transgenic Bt maize hybrids and non-transgenic hybrids. *Plant Disease* 83(2): 130-138.
- Mushke, R., Yarra, R., & Bulle, M. (2016).** Efficient *in vitro* direct shoot organogenesis from seedling derived split node explants of maize (*Zea mays* L.). *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology* 14(1): 49-53.
- Muoma, J., Muluvi, G., & Machuka, J. (2008).** *In vitro* regeneration by indirect organogenesis of selected kenyan maize genotypes using shoot apices. *Biotechnology* 7(4): 732-738.
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962).** A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473–497.
- Naaz, A., Hussain, S.A., Naz, R., Anis, M., & Alatar, A.A. (2019).** Successful plant regeneration system via de novo organogenesis in *Syzygium cumini* (L.) Skeels: an important medicinal tree. *Agroforestry Systems* 93(4): 1285-1295.
- Navarro-García, N., Martínez-Romero, D., & Pérez-Tornero, O. (2016).** Assessment of the impact of ethylene and ethylene modulators in citrus limon organogenesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)* 127(2): 405-415.
- Nair, S., Gupta, P.K., Shirgurkar, M.V., & Mascarenhas, A.F. (1984).** *In vitro* organogenesis from leaf explants of *Annona squamosa* Linn. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)* 3(1): 29-40.
- Nair, A.R., Ravichandran, P., & Bejoy, M. (2018).** Direct shoot regeneration from male immature flower buds of *Musa paradisiaca* Linn. cv. Poovan (AAB). *Plant Science Today* 5(4): 142-148.
- Nhut, D.T., Thi, N.N., Khiet, B.L.T., & Luan, V.Q. (2008).** Peptone stimulates *in vitro* shoot and root regeneration of avocado (*Persea americana* Mill.). *Scientia Horticulturae* 115: 124-128.
- Orantes-Ramos, H.A., & López-Ventura, Y.E. (2019).** Evaluación de medios de inducción *in vitro* a callo vegetal en explantes foliares de *Annona diversifolia*

- Safford (Magnoliales: Annonaceae). *Revista Científica Multidisciplinaria de la Universidad de El Salvador-Revista Minerva* 2(1): 22-30.
- Osorio-Montalvo, P., De-la-Peña, C., Oropeza, C., Nic-Can, G., Córdova-Lara, I., Castillo-Castro, E., & Sáenz-Carbonell, L. (2020).** A peak in global DNA methylation is a key step to initiate the somatic embryogenesis of coconut palm (*Cocos nucifera* L). *Plant Cell Reports* 39(10): 1345-1357.
- Oster, J.D., Stottlmyer, D.E., & Arpaia, M.L. (2007).** Salinity and water effects on 'Hass' avocado yields. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 132(2): 253-261.
- Padgett, S.R., Kolacz, K.H., Delannay, X., Re, D.B., LaVallee, B.J., Tinius, C.N., Rhodes, W.K., Otero, Y.I., Barry, G.F., Eichholtz, D.A., Peschke, V.M., Nida, D.L., Taylor, N.B., & Kishore, G.M. (1995).** Development, identification, and characterization of a glyphosate-tolerant soybean line. *Crop Science* 35(5): 1451-1461.
- Palomo-Ríos, E., Barceló-Muñoz, A., Mercado, J.A., & Pliego-Alfaro, F. (2012).** Evaluation of key factors influencing *Agrobacterium*-mediated transformation of somatic embryos of avocado (*Persea americana* Mill.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)* 109(2): 201-211.
- Palomo-Ríos, E., Cerezo, S., Mercado, J.A., & Pliego-Alfaro, F. (2017).** *Agrobacterium*-mediated transformation of avocado (*Persea americana* Mill.) somatic embryos with fluorescent marker genes and optimization of transgenic plant recovery. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)* 128(2): 447-455.
- Panis, B., Van Wauwe, A., & Swennen, R. (1993).** Plant regeneration through direct somatic embryogenesis from protoplasts of banana (*Musa* spp.). *Plant Cell Reports* 12(7-8): 403-407.
- Parrott, W.A., Merckle, S.A., & Williams, E.G. (1991).** Somatic embryogenesis: potential for use in propagation and gene transfer systems. En *Advances Methods in Plant Breeding and Biotechnology*, pp 158-200. CAB International. Wallingford, Reino Unido.

- Palei, S., Dash, D.K., & Rout, G.R. (2019).** Standardization of *in vitro* protocol for plant regeneration of *Carica papaya* cv. Co8 through indirect organogenesis. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry* 8(3): 1954-1956.
- Palukaitis, P., Hatta, T., Alexander, D.M., & Symons, R.H., (1979).** Characterization of a viroid associated with avocado sunblotch disease. *Virology* 99: 145–151.
- Pawar, K.R., Wagh, S.G., Daspute, A.A., Avhad, G.B., Choudharee, P.D., & Harke, S.N. (2019).** *In vitro* regeneration of potato (*Kufri pukhraj*). *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry* 8(5): 515-518.
- Perán-Quesada R., Sánchez-Romero, C., Barceló-Muñoz, A., & Pliego-Alfaro, F. (2004).** Factors affecting maturation of avocado somatic embryos. *Scientia Horticulturae* 102:61-73.
- Pliego-Alfaro, F., López-Encina, C., & Barceló-Muñoz, A. (1987).** Propagation of avocado rootstocks by tissue culture. *South African Avocado Growers' Association Yearbook* 10: 36-39.
- Pliego-Alfaro, F., & Murashige, T. (1987).** Possible rejuvenation of adult avocado by graftage onto juvenile rootstocks *in vitro*. *HortScience* 22: 1321-1324.
- Pliego-Alfaro, F., & Murashige, T. (1988).** Somatic embryogenesis in avocado (*Persea americana* Mill.) *in vitro*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture (PCTOC)* 12: 61-66.
- Ploetz, R.C., Schaffer, B., Vargas, A.I., Konkol, J.L., Salvatierra, J.P., & Wideman, R. (2015).** Impact of laurel wilt, caused by *Raffaelea lauricola*, on leaf gas exchange and xylem sap flow in avocado, *Persea americana*. *Phytopathology* 105: 433-440.
- Pola, S., Mani, N.S., & Ramana, T. (2009).** Long-term maintenance of callus cultures from immature embryo of *Sorghum bicolor*. *World Journal of Agricultural Sciences* 5(4): 415-421.

- Premkumar, A., Barceló-Muñoz, A., Pliego-Alfaro, F., Quesada, M.A., & Mercado, J.A. (2002).** Influences of exogenous sucrose on juvenile avocado during *in vitro* cultivation and subsequent ex vitro acclimatization. *Trees* 16(8): 569-575.
- Puchooa, D. (2004).** *In vitro* regeneration of lychee (*Litchi chinensis* Sonn.). *African Journal of Biotechnology* 3(11): 576-584.
- Qasrawi, H. (2019).** *In vitro* regeneration of avocado (*Persea americana*): West Indian rootstock cv. Lula. Doctoral dissertation, Palestine Technical University-Kadoorie. Tulkarm, Cisjordania, Palestina.
- Quintero-Jiménez, A., Espinosa-Huerta, E., Acosta-Gallegos, J.A., Guzmán-Maldonado, H.S., & Mora-Avilés, M.A. (2010).** Enhanced shoot organogenesis and regeneration in the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)* 102(3): 381-386.
- Quiroz-Figueroa, F.R., Rojas-Herrera, R., Galaz-Avalos, R.M., & Loyola-Vargas, V.M. (2006).** Embryo production through somatic embryogenesis can be used to study cell differentiation in plants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)* 86(3): 285-301.
- Raghuvanshi, S. S., & Srivastava, A. (1995).** Plant regeneration of *Mangifera indica* using liquid shaker culture to reduce phenolic exudation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)* 41(1): 83-85.
- Raharjo S.H.T. & R.E. Litz (2005).** Micrografting and *ex vitro* grafting for somatic embryo rescue and plant recovery in avocado (*Persea americana*). *Plant Cell Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 82:1-9.
- Raharjo, S.H., Gomez-Lim, M.A., Padilla, G., & Litz, R.E. (2008).** Recovery of avocado (*Persea americana* Mill.) plants transformed with the antifungal plant defensin gene PDF1. 2. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* 44(4): 254-262.
- Rai, I.N., Sudana, I.M., Astawa, I.N.G., Dwiyani, R., & Fitriani, Y. (2019).** Direct organogenesis *in vitro* propagation of local Balinese banana with thidiazuron. *International Journal of Life Sciences* 3(3): 32-40.

- Raviv, A., Avenido, R., Tisalona, L., Damasco, O., Mendoza, E., Pinkas, Y., & Zilkah, S. (1998). Callus and somatic embryogenesis of *Persea* species. *Plant Tissue Culture and Biotechnology* 4: 196-206.
- Raza, G., Singh, M.B., & Bhalla, P.L. (2017). *In vitro* plant regeneration from commercial cultivars of soybean. *BioMed Research International* 2017(1): 1-9.
- Rendón-Anaya, M., Ibarra-Laclette, E., Méndez-Bravo, A., Lan, T., Zheng, C., Carretero-Paulet, L., Pérez-Torres, C.A., Chacón-López, A., Hernández-Guzmán, G., Chang, T.H., Farr, K.M., Barbazuk, W.B., Chamala, S., Mutwil, M., Shivhare, D., Álvarez-Ponce, D., Mitter, N., Hayward, A., Fletcher, S., Rozas, J., Sánchez-García, A., Kuhn, D., Barrientos-Priego, A.F., Salojärvi, J., Librado, P., Sankoff, D., Herrera-Estrella, A., Albert, V.A., & Herrera-Estrella, L. (2019). The avocado genome informs deep angiosperm phylogeny, highlights introgressive hybridization, and reveals pathogen-influenced gene space adaptation. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 116(34): 17081-17089.
- Restrepo Osorio, C., Gómez Velásquez, F.A., Gil Correal, A., Torres Bonilla, J.M., & Urra Trujillo, A.I. (2018). *In vitro* propagation of avocado (*Persea americana* Mill.) cv. Hass through morphogenesis. *Acta Agronómica* 67(1): 160-167.
- Rincón-Hernández, C.A., Sánchez Pérez, J.D.L.L., & Espinosa-García, F.J. (2011). Caracterización química foliar de los árboles de aguacate criollo (*Persea americana* var. *Drymifolia*) en los bancos de germoplasma de Michoacán, México. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 82(2): 395-412.
- Rohim, F.M., Wanas, W.H., Aziz, A.B.A., El-Hamid, A.A., & El-Moniem, E.A.A. (2013). *In vitro* rescue and regeneration of zygotic embryos of avocado (*Persea americana* Mill.) cv. Hass. *Journal of Applied Sciences Research* 9(7): 4132-4141.
- Rohwer, J.C. (1993). Lauraceae. En *The Families and Genera of Flowering Plants*. vol. 2, pp. 366–391. Springer-Verlag. Berlin.

- SADER. Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural. (2019).** Reporte de Mercado de Aguacate. CDMX, México.
- Sajeva, M., Carra, A., de Pasquale, F., & Carimi, F. (2008).** Somatic embryogenesis and plant regeneration from pistil transverse thin cell layers of lemon (*Citrus limon*). *Plant Biosystems* 142(2): 199-203.
- Sánchez-Romero, C., Perán-Quesada, R., Márquez-Martín, B., Barceló-Muñoz, A., & Pliego-Alfaro, F. (2007).** *In vitro* rescue of immature avocado (*Persea americana* Mill.) embryos. *Scientia Horticulturae* 111(4): 365-370.
- SAS Institute Inc. (2012).** The SAS System for Windows. Release 9.1. SAS Institute Inc. Cary, N.C., USA.
- Schaffer B., Wolstenholme, B.N., & Whiley, A.W. (2013).** The avocado: botany, production, and uses. 2nd ed. CAB International. Wallingford, Reino Unido.
- Seijo, M. F., Fiquitiva, A. P. B., Kosky, R. G., Ramírez, Y. G., & Chávez, M. (2004).** Formación de callos de *Persea americana* Mill. cultivar Catalina a partir de segmentos de hojas de plantas *in vitro*. *Biotecnología Vegetal* 4(2): 85-90.
- Seldimirova, O.A., Kudoyarova, G.R., Kruglova, N.N., Zaytsev, D.Y., & Veselov, S.Y. (2016).** Changes in distribution of zeatin and indole-3-acetic acid in cells during callus induction and organogenesis *in vitro* in immature embryo culture of wheat. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* 52(3): 251-264.
- Shweta, S., Varanavasiappan, S., Kumar, K.K., Sudhakar, D., Arul, L., & Kokiladevi, E. (2020).** Protocol optimization for rapid and efficient callus induction and *in-vitro* regeneration in rice (*Oryza sativa* L.) cv. CO 51. *Electronic Journal of Plant Breeding* 11(03): 755-759.
- Shahzad, A., Parveen, S., Sharma, S., Shaheen, A., Saeed, T., Yadav, V., Akhtar, R., Ahmad, Z., & Upadhyay, A. (2017).** Plant tissue culture: applications in plant improvement and conservation. In *Plant Biotechnology: Principles and Applications*, pp. 37-72. Springer Nature. Singapore.
- Sharma G., Maymon, M. & Freeman, S. (2017).** Epidemiology, pathology and identification of *Colletotrichum* including a novel species associated with

- avocado (*Persea americana*) anthracnose in Israel. *Scientific Reports* 7: 15839.
- Shukla, M., Al-Busaidi, K.T., Al-Blushi, G.S., Al-Burashdi, A.H., Al-Hasani, H.D., Al-Jabri, M.H., & AL-Kalbani, B.S. (2016).** Nucellar embryogenesis and plantlet regeneration in monoembryonic and polyembryonic mango (*Mangifera indica* L.) cultivars. *African Journal of Biotechnology*, 15(52): 2814-2823.
- Schroeder, C.A. (1976).** Responses of avocado stem pieces in tissue culture. *California Avocado Society Year Book* 60: 160-163.
- SIAP, Servicio de Información y Estadística Agroalimentaria y Pesquera. (2018).** Consulta de indicadores de Aguacate. <http://infosiap.siap.gob.mx/gobmx/datosAbiertos.php>.
- Singh, J., & Tiwari, K.N. (2012).** *In vitro* plant regeneration from decapitated embryonic axes of *Clitoria ternatea* L.-An important medicinal plant. *Industrial Crops and Products* 35(1): 224-229.
- Skoog, F., & Miller, C. (1957).** Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured. *Symposia of the Society for Experimental Biology* 11: 118-130.
- Smith, N. J., Williams, J.T., Plucknett, D.L., & Talbot, J.P. (2018).** Tropical forests and their crops. Cornell University Press. Cornell, NY.
- Solórzano-Cascante, P., Sánchez-Chiang, N., & Jiménez, V.M. (2018).** Explant type, culture system, 6-benzyladenine, meta-topolin and encapsulation affect indirect somatic embryogenesis and regeneration in *Carica papaya* L. *Frontiers in Plant Science* 9: 1769.
- Soriano, M., Li, H., Jacquard, C., Angenent, G.C., Krochko, J., Offringa, R., & Boutilier, K. (2014).** Plasticity in cell division patterns and auxin transport dependency during *in vitro* embryogenesis in *Brassica napus*. *The Plant Cell* 26(6): 2568-2581.
- Suárez, I. E., Schnell, R.A., Kuhn, D.N., & Litz, R.E. (2006).** Recovery and indexing of avocado plants (*Persea americana*) from embryogenic nucellar

- cultures of an avocado sunblotch viroid-infected tree. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)* 84(1): 27-37.
- Sugimoto, K., Gordon, S.P., & Meyerowitz, E.M. (2011).** Regeneration in plants and animals: dedifferentiation, transdifferentiation, or just differentiation? *Trends in Cell Biology* 21(4): 212-218.
- Stevenson, F.F. (1956).** *The behavior of citrus tissues embryos in vitro*. Tesis doctoral. University of Michigan. Ann Arbor, MI.
- Stewart Jr, C.N., Adang, M.J., All, J.N., Boerma, H.R., Cardineau, G., Tucker, D., & Parrott, W.A. (1996).** Genetic transformation, recovery, and characterization of fertile soybean transgenic for a synthetic *Bacillus thuringiensis* cryIAc gene. *Plant Physiology* 112(1): 121-129.
- Szyp-Borowska, I., Ukalska, J., Wojda, T., Sułkowska, M., & Klisz, M. (2020).** Micropropagation and *in vitro* rooting of *Robinia pseudoacacia* L. recalcitrant genotypes. *Folia Forestalia Polonica* 62(1): 13-21.
- Taah, K.J., Alderson, P.G., Power, J.B., & Mayes, S. (2009).** Effects of auxin type, root length and shoot size on ex vitro survival of micropropagated avocado shoots. *Ghana Journal of Horticulture* 7: 18-25.
- Tharp, B. E., & Kells, J.J. (1999).** Influence of herbicide application rate, timing, and interrow cultivation on weed control and corn (*Zea mays*) yield in glufosinate-resistant and glyphosate-resistant corn. *Weed Technology* 13(4): 807-813.
- Teh, C.Y., Maziah, M., Shaharuddin, N.A., & Ho, C. (2018).** Efficient *in vitro* multiple shoots regeneration system from rice shoot apex in recalcitrant Malaysian Indica rice cultivars (*Oryza sativa* L.).
- Tuesta, O.G., & Chico-Ruiz, J. (2017).** Callos embriogénicos inducidos en tallos de *Persea americana* Mill. "palto" con diferentes combinaciones de reguladores del crecimiento. *Sagasteguiana* 4(1): 39-50.
- Tsoulpha, P., Alexandri, S., & Tsaktsira, M. (2018).** Critical factors affecting an efficient micropropagation protocol for *Pyrus spinosa* Forsk. *Journal of Applied Horticulture* 20(3): 190-195.

- van den Berg, N., Christie, J.B., Aveling, T.A.S., & Engelbrecht, J. (2018).** Callose and β -1, 3-glucanase inhibit *Phytophthora cinnamomi* in a resistant avocado rootstock. *Plant Pathology* 67(5): 1150-1160.
- van Staden, J., Fennell, C.W., and Taylor, N.J. (2004).** Plant stress *in vitro*: the role of phytohormones. En *Vth International Symposium on In Vitro Culture and Horticultural Breeding* 725: 55-62. Debrecen, Hungría.
- Van, K.T.T., & Van Le, B. (2000).** Current status of thin cell layer method for the induction of organogenesis or somatic embryogenesis. In *Somatic Embryogenesis in Woody Plants*, pp. 51-92. Springer. Dordrecht, Países Bajos.
- Vega, D.E.S. (1989).** Propagation *in vitro* of rootstocks of avocado. *California Avocado Society Yearbook* 73: 196-199.
- Verdeil, J.L., Alemanno, L., Niemenak, N., & Tranbarger, T.J. (2007).** Pluripotent versus totipotent plant stem cells: dependence versus autonomy? *Trends in Plant Science* 12(6): 245-252.
- Vives, K., Andújar, I., Lorenzo, J.C., Concepción, O., Hernández, M., & Escalona, M. (2017).** Comparison of different *in vitro* micropropagation methods of *Stevia rebaudiana* B. including temporary immersion bioreactor (BIT®). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)* 131(1): 195-199.
- Von Arnold, S., Sabala, I., Bozhkov, P., Dyachok, J., & Filonova, L. (2002).** Developmental pathways of somatic embryogenesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)* 69(3): 233-249.
- Wada, S., Niedz, R.P., DeNoma, J., & Reed, B.M. (2013).** Mesos components (CaCl₂, MgSO₄, KH₂PO₄) are critical for improving pear micropropagation. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* 49(3): 356-365.
- Wang, C., Burzio, L.A., Koch, M.S., Silvanovich, A., & Bell, E. (2015).** Purification, characterization and safety assessment of the introduced cold shock protein B in DroughtGard™ maize. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 71(2): 164-173.

- Wang, F.X., Shang, G.D., Wu, L.Y., Xu, Z.G., Zhao, X.Y., & Wang, J.W. (2020).** Chromatin accessibility dynamics and a hierarchical transcriptional regulatory network structure for plant somatic embryogenesis. *Developmental Cell* 54(6): 742-757.
- Wessels, H. (1996).** *In vitro* clonal propagation of avocado rootstocks. *South African Avocado Growers' Association Yearbook* 19: 59-60.
- Whiley, A.W., Köhne, J.S., Arpaia, M.L., & Bender, G.S. (1990).** Future prospects with new avocado cultivars and elite rootstocks. *South African Avocado Growers Association Yearbook* 13:16-20.
- Whiley, A.W. (1992).** *Persea americana* Miller. En *Plant Resources of Southeast Asia No. 2: Edible Fruits and Nuts*, pp. 249-254. PUDOC Publisher. Wageningen, Países Bajos.
- Wilson, D.F., Flint, H.M., Deaton, R.W., Fischhoff, D.A., Perlak, F.J., Armstrong, T.A., Fuchs, R.L., Berberich, S.A., Parks., N.J., & Stapp, B.R. (1992).** Resistance of cotton lines containing a *Bacillus thuringiensis* toxin to pink bollworm (Lepidoptera: Gelechiidae) and other insects. *Journal of Economic Entomology* 85(4): 1516-1521.
- Winkelmann, T. (2016).** Somatic versus zygotic embryogenesis: learning from seeds. En *In Vitro Embryogenesis in Higher Plants*, pp. 25-46. Humana Press, New York, NY.
- Witjaksono, & Litz, R. (1999)** Induction and growth characteristics of embryogenic avocado cultures. *Plant Cell Tissue and Organ Culture (PCTOC)* 58:19-29.
- Xena de Enrech, N., Vargas, T.E., Huérfano, A.A., & García, E.D. (2000).** Cytogenetic characterization of the process of indirect somatic embryogenesis on solid medium in *Solanum tuberosum* L. cv. Désirée. *Acta Botanica Venezuelica* 23(2): 97-104.
- Zirari, A., & Lionakis, S.M. (1992).** Effect of cultivar, explant type, etiolation pretreatment and the age of plant material on the *in vitro* regeneration ability of avocado (*Persea americana*). En *International Symposium on Current*

Developments in Mediterranean Tropical and Subtropical Fruit Production and Research 365, pp. 69-76. Nicosia, Chipre.

Zou, X., Li, D., Luo, X., Luo, K., & Pei, Y. (2008). An improved procedure for *Agrobacterium*-mediated transformation of trifoliolate orange (*Poncirus trifoliata* L. Raf.) via indirect organogenesis. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* 44(3): 169-177.

Zulfiqar B., Abbasi, N.A. Ahmad, T. & Hafiz, I.A. (2009). Effect of explant sources and different concentrations of plant growth regulators on *in vitro* shoot proliferation and rooting of avocado (*Persea americana* Mill.) cv. 'Fuerte'. *Pakistan Journal of Botany* 41: 2333-2346.