

ARTÍCULO ORIGINAL

CALLOS EMBRIOGÉNICOS INDUCIDOS EN TALLOS DE *Persea americana* Mill. “PALTO” CON DIFERENTES COMBINACIONES DE REGULADORES DEL CRECIMIENTO

EMBRYOGENIC CALLUS INDUCED ON STEMS OF *Persea americana* Mill. "AVOCADO" WITH DIFFERENT COMBINATIONS OF GROWTH REGULATORS

Omar Gálvez Tuesta & Julio Chico-Ruíz

Laboratorio de Cultivos Celulares. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Nacional de Trujillo-Perú.
ogaltu_92@hotmail.com, jchico@unitru.edu.pe

RESUMEN

En la actualidad, *Persea americana* Mill. “palto” se produce en la mayor parte de los países latinoamericanos, siendo un cultivo de agroexportación muy importante. Su producción necesita mejoras en su propagación, resistencia a enfermedades y calidad en la maduración de los frutos. Una técnica de cultivo *in vitro* que puede ayudar es la embriogénesis somática, ya que posee mayores ventajas que las técnicas convencionales, pero previamente hay que conocer el explanto que presente respuesta embriogénica, en especial la formación de un callo. Por eso, se evaluó la inducción de callos embriogénicos a partir del tallo de *Persea americana* Mill. var. Hass “palto”, utilizando 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), bencilaminopurina (BAP) y thidiazuron (TDZ). El diseño experimental fue completamente al azar (DCA) y se logró determinar que el tratamiento VII (TDZ y 2,4-D 0.2/1 ppm) es el mejor inductor de callos, mostrando diferencias significativas con respecto a los otros tratamientos en los parámetros de incremento de masa y promedio del número de callos por explante.

Palabras clave: *Persea americana*, callos embriogénicos, reguladores del crecimiento.

ABSTRACT

At present, *Persea americana* Mill. "avocado" is produced in most of the Latin American countries, being a very important agro-export crop. Its production needs improvements in its propagation, resistance to diseases and quality in the ripening of the fruits. An *in vitro* culture technique that can help is somatic embryogenesis, since it has greater advantages than conventional techniques, but you must first know the explant that has an embryogenic response, especially the formation of a callus. Therefore, the induction of embryogenic calli was evaluated from the stem of *P. americana* Mill. var. Hass "avocado", using 2,4-dichlorophenoxyacetic (2,4-D), benzylaminopurine (BAP) and thidiazuron (TDZ). The experimental design was completely random (DCA) and it was possible to determine that treatment VII (TDZ and 2,4-D 0.2 / 1 ppm) is the best callus inducer, showing significant differences with respect to the other treatments in the parameters of mass increase and average number of calluses per explant.

Keywords: *Persea americana*, embryogenic callus, growth regulators.

Recibido: 26 Julio 2017.

Aceptado: 10 Setiembre 2017.

Publicado online: 30 Diciembre 2017.

INTRODUCCIÓN

Persea americana Mill. “palto o aguacate”, Lauraceae, se encuentra distribuida en áreas tropicales y templadas de todo el mundo (Zanis *et al.*, 2002; Judo *et al.*, 2002; Soltis, 2005). Esta familia comprende 50 géneros y un número indefinido de especies que oscila entre 2.500 y 3.000, en las cuales existen especies de importancia económica, como la “canela” (*Cinnamomum verum*), el “laurel” (*Laurus nobilis*) o el “alcanfor” (*Cinnamomum camphora*) siendo la más importante el “aguacate” (Alcaraz, 2009, Buzgo *et al.*, 2007; Campos-Rojas *et al.*, 2007).

Tradicionalmente, se han descritos varios ecotipos geográficos o variedades botánicas adaptadas a diferentes condiciones climáticas y que se consideran de interés agronómico: Mejicana [*P. americana* var. *drymifolia* (Schlecht. & Cham.) Blake], guatemalteca (*P. americana* var. *guatemalensis* L. Wms.) y Antillana (*P. americana* var. *americana* Mill.) (Chanderbali *et al.*, 2008). La mayoría de los cultivares comerciales son híbridos entre razas obtenidas a partir de semillas de los cuales el genotipo más cultivado a nivel mundial es 'Hass', que se trata de un híbrido Guatemalteco x Mejicano (Alcaraz, 2009, Bernal & Díaz, 2005; Gutiérrez-Díez *et al.*, 2009).

La propagación convencional de este frutal presenta una serie de problemas como el caso de la var. *Hass*, que cuando se aplica la mejora tradicional surgen una serie de inconvenientes adicionales, tales como el largo periodo juvenil o el bajo establecimiento del fruto, que provocan que tanto la transferencia de los genes de interés, como su expresión y posterior evaluación en campo se prolongue durante años, retrasando la obtención de resultados (Kremer-Kohne & Mukhumo, 2003). Así mismo existe una gran demanda por mejorar los caracteres cualitativos de interés en las variedades de agro exportación como la forma, color, facilidad de pelado del fruto, y adoptar estrategias para controlar la maduración del fruto teniendo en cuenta dos principales objetivos, prolongar la vida en los estanques o reservorios y extender el almacenamiento sobre el árbol del fruto maduro; al mismo tiempo, buscar genotipos resistentes a diferentes enfermedades como en el caso de la "mancha solar" que ataca a las hojas y frutos causada por un viroide, lo cual con lleva a disminuir la producción (Guzmán, 2012).

La baja producción es un problema que la biotecnología puede solucionar a través de la transformación con genes resistentes, la selección clonal y mutagénesis; no obstante, para utilizar estos mecanismos de mejoramiento genético *in vitro* se requiere tener previamente el sistema de regeneración de una planta completa a través de embriogénesis somática u organogénesis adventicia.

En el cultivo *in vitro* juegan un rol muy importante las fitohormonas que son producidas por las plantas y regulan su respuesta a estímulos ambientales como luz, temperatura y humedad, ayudando de esta manera a regular y coordinar los procesos esenciales para el desarrollo de las plantas (Doerner, 2000, Crozier *et al.*, 2000). Este tipo de sustancias se dividen en auxinas, giberelinas, citocininas, ácido abscísico, etileno, brasinoesteroides, poliaminas, ácido jasmónico y el ácido salicílico: Las auxinas y giberelinas promueven el alargamiento celular; pero, inhiben la diferenciación, mientras que las citocininas estimulan la división mediante la cual se producen nuevas células y también pueden evitar el envejecimiento celular (Calva y Pérez, 2005, Carpita & Mccann, 2000).

De las auxinas, el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) es la más usada para la inducción y mantenimiento de tejido calloso; debido, a que suprime severamente la organogénesis, y de las citocininas, la más activa es la 2-indolaminopurina (2iP); sin embargo, las más utilizadas en cultivo de células vegetales es la bencilaminopurina (BAP) y la kinetina (K) (Crozier *et al.*, 2000). El tidiuron (TDZ), es una fenilurea con alta actividad como citocinina y muy utilizada en el cultivo de tejidos de plantas leñosas, debido a que facilita la eficiencia de la micropapacion de muchas especies leñosas recalcitrantes. A bajas concentraciones (<1µM) pueden inducir una gran proliferación axilar en comparación con otras citocininas; sin embargo, puede inhibir la elongación de los brotes, en algunos casos es necesario transferir los brotes a un medio de elongación con bajo nivel de TDZ. A concentraciones mayores a 1µM, el TDZ puede estimular la formación de callos, brotes adventicios o embriones somáticos, y el subsiguiente enraizamiento de los microbrotes puede ser afectado o ligeramente inhibido por una exposición previa a TDZ (Benega *et al.*, 2000; Vidales, 2002).

En los últimos 40 años han ocurrido avances en el desarrollo de tecnologías para obtener embriones somáticos de un número cada vez mayor de especies, tener embriones somáticos disponibles permite destinarlos a programas de mejoramiento o a la propagación a gran escala de genotipos superiores, especialmente en cultivos perennes de alto valor (Silva *et al.*, 2005; Parrot, 2002). Para inducir embriones somáticos en forma indirecta previamente se tiene que obtener los

callos embriogénicos, el cual está demostrado para las especies forestales, como la vía de regeneración más adecuada ya que ofrece la posibilidad de una alta tasa de producción de propágulos, criopreservación, rejuvenilización, producción de semilla sintética y transformación genética (Peña *et al.*, 2011).

En “palto”, para la iniciación de callos se han empleado secciones del mesocarpo y tejido del cotiledón de semillas de frutos casi maduros (Seijo *et al.*, 2004). Por su parte Vidales *et al.* (2003) encontraron que a partir de tejido nucelar de “aguacate” cv. Hass se puede establecer el sistema de embriogénesis somática, se evita la necrosis de la nucela con el uso de ácido ascórbico y se genera callo embriogénico con las auxinas (2,4-D, picloram y AIB). Así mismo Suarez *et al.* (2004) indujeron callos embriogénicos y embriogénesis somática en tres cultivares de aguacate a partir de explantes nucleares.

Para aplicar todos estos avances biotecnológicos y alcanzar las diferentes metas descritas un requisito común altamente necesitado es disponer de un eficiente protocolo para la propagación de material vegetal de elite, mediante obtención de callos embriogénicos y embriogénesis somática, ya que esta técnica posee mayores ventajas como el gran número de embriones somáticos producidos por explante y la característica de bipolaridad que poseen estos embriones en la cual la raíz y el tallo se forman, generalmente, al mismo tiempo a diferencia de la organogénesis que necesita dos pasos para producir una planta completa, es una buena alternativa para empezar a implementar en la mejora y propagación de “palto” (Guzmán, 2012).

Por lo expuesto, el objetivo fue demostrar la inducción de callos embriogénicos en tallo de *Persea americana* Mill. variedad Hass “palto” utilizando las combinaciones de 2,4-D, BAP y TDZ.

MATERIAL Y MÉTODOS

Obtención y germinación del material biológico.

Las semillas de *P. americana* Mill. variedad Hass “palto” se obtuvieron de los mercados de la ciudad de Trujillo, las cuales fueron puestas a germinar en vasos plásticos de 250 ml conteniendo arena fina como sustrato. A los 60 días, con una altura aproximada de 25 a 30 centímetro, las plántulas fueron utilizadas para la experiencia.

Preparación del medio de cultivo Murashige y Skoog (1961, MS)

Los medios de cultivo contenían las sales de MS, sacarosa (3%), agar (0.8%), tiamina HCl (0.4 ppm), mio-inositol (100 ppm), carbón activado al 0.5% y suplementado con 2,4-D (3.0 ppm). También se prepararon medios de cultivo con diferentes concentraciones de 2,4-D, BAP y TDZ (Tabla 1). Luego se procedieron a dispensar en matraces y se autoclavaron a 121°C a 105 kPa durante 30 min.

Desinfección de los explantes.

Se procedió a separar el tallo joven (tercio superior de la plántula) y luego se realizó cortes longitudinales de 10 x 1 mm para luego ser introducidos en los diferentes tratamientos. Los explantes se lavaron con detergente comercial durante 30 minutos y se enjuagaron con agua destilada. Seguidamente, y dentro de la cámara de siembra, los explantes se desinfectaron en alcohol etílico al 90% por 30 segundos; para luego, ser introducidos en hipoclorito de sodio al 2.5 % durante 10 minutos; posteriormente, se realizaron tres enjuagues en agua destilada estéril.

Tratamiento con 2,4- D (3 ppm)

Cada unidad experimental tuvo diez secciones de tallo introducidas en una placa petri con medio de cultivo más 2,4-D. Se introdujeron un total de 300 explantes y se mantuvieron durante 10 días en condiciones de oscuridad, para luego ser cambiado de medio de cultivo.

Tratamientos con 2,4-D, BAP y TDZ

Se procedió a traspasar los explantes, previamente tratados con 2,4-D, a los tratamientos con las diferentes concentraciones de 2,4-D, BAP y TDZ los cuales fueron mantenidos a fotoperiodo de 12 :12 a temperaturas entre 23°C y 25°C, durante 40 días. Se introdujeron 20 explantes por tratamiento y se hicieron tres repeticiones (Tabla 1).

Evaluación y análisis estadístico

Se procedió a evaluar el color y forma del callo embriogénico; también, se pesaron los explantes al inicio y final de la experiencia para determinar su incremento de masa. Asimismo, se determinó el número de callos por tratamiento a los 40 días. Se aplicó un diseño experimental completamente al azar con tres repeticiones, con un total de siete tratamientos. Se aplicó promedios y análisis de varianza usando el software StatGraphics.

Tabla 1. Tratamientos propuestos con 2,4-D, BAP y TDZ para inducir callos embriogénicos en tallos de *P. americana* var. Hass.

Días	Pre tratamientos	2,4-D (ppm)		
		BAP	TDZ	2,4-D
10		3		
	Tratamientos			
40	I	1	0	0.1
	II	1	0	0
	III	5	0	0.1
	IV	5	0	0
	V	10	0	0.1
	VI	0	1	0
	VII	0	0.2	1

RESULTADOS

Los explantes, previamente tratados con 2,4-D a 3 ppm, después de 10 días fueron repartidos en los diferentes tratamientos (Tabla 2) encontrándose que en el tratamiento VII se presentó el mayor incremento de peso (0.053 g) con una alta concentración de 2,4-D (1ppm) y 0.2 ppm de BAP, en cambio el menor peso se encontró en el tratamiento V que tuvo baja concentración de 2,4-D (0.1 ppm) y 10 ppm de BAP.

Todos los tratamientos con las diferentes combinaciones de reguladores del crecimiento indujeron formación de callos de una textura laxa a partir del día 15 de a ver sido introducidos in vitro. La formación de callos se observó siempre en la zona de corte del explante (Tabla 3, Fig. 3). Habiendo introducido 60 explantes por tratamiento observamos que hay más de un callo por explante, como en el tratamiento VII con 186.3 callos en total haciendo una media de tres callos por explante. Otros tratamientos con elevado número de callos son el I (66.3) y el III (73.3) (Tabla 3)

La Tabla 5 describe la morfología y color de los callos embriogénicos a los 20 y 40 días de cultivo. Observamos que a los 20 días los callos toman colores muy variados que van de blanco, amarillo y marrón con formas amorfas a cóncavas. En cambio, a los 40 días el color de los mismos es marrón y manteniendo las formas antes descritas. Así mismo el tratamiento VI (TDZ 1ppm) mostró callos de color amarillo claro muy traslucidos muy hidratados a los 20 días (Fig, 3),

los cuales se tornaron marrones a los 40 días de ser evaluados. El tratamiento que mostró callos con una tonalidad blanquecina y textura laxa a partir de los 20 días fue el tratamiento VII (TDZ 0.2 ppm y 2,4-D 1 ppm), evidenciando un incremento de masa de los explantes y mostrando callos grandes en comparación con los demás tratamientos (Tabla 4).

Los callos inducidos mostraron evidencias de ser callos embriogénicos, y se comprobaron al realizar cortes histológicos donde se pudo evidenciar la presencia de tejido desdiferenciado (meristemoides) (Fig. 4).

Tabla 2. Incremento de masa en los callos de *P. americana* var. Hass cuando fueron expuestos a los diferentes tratamientos con BAP, 2,4-D y TDZ. Los resultados son promedios de tres repeticiones.

Tratamientos	Incremento de masa (gr)			
	R			
	1	2	3	x
I	0.023	0.015	0.015	0.017
II	0.028	0.011	0.017	0.018
III	0.031	0.028	0.022	0.027
IV	0.029	0.025	0.025	0.026
V	0.001	0.002	0.001	0.001
VI	0.017	0.016	0.015	0.016
VII	0.032	0.058	0.07	0.053

Tratamientos

I: 2,4-D/BAP (0.1/1 ppm); II: 2,4-D/BAP (0/1 ppm); III: 2,4-D/BAP (0.1/5 ppm); IV: 2,4-D/BAP (0/5 ppm); V: 2,4-D/BAP (0.1/10 ppm); VI: TDZ (1 ppm); VII: 2,4-D/TDZ (1/0.2 ppm)

R: Repeticiones X: Promedio

Tabla 3. Número total de callos embriogénicos obtenidos en tallos de *P. americana* var. Hass en los diferentes tratamientos con 2,4-D, BAP y TDZ a los 40 días. Se realizaron tres repeticiones.

Tratamientos	Explant.	callos embriogénicos			
		R			
		1	2	3	x
	60	62	70	67	66.3
II	60	33	11	15	19.7
III	60	70	64	86	73.3
IV	60	10	54	65	43
V	60	5	10	8	7.7
VI	60	86	17.4	44	49.1
VII	60	136	279	144	186.3

Tratamientos

I: 2,4-D/BAP (0.1/1 ppm); II: 2,4-D/BAP (0/1 ppm); III: 2,4-D/BAP (0.1/5 ppm); IV: 2,4-D/BAP (0/5 ppm); V: 2,4-D/BAP (0.1/10 ppm); VI: TDZ (1 ppm); VII: 2,4-D/TDZ (1/0.2 ppm)

R: Repeticiones X: Promedio

Tabla 4. ANOVA para porcentaje de callos por tratamiento

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	6.76088	6	1.12681	6.08	0.0026
Intra grupos	2.59438	14	0.185313		
Total (Corr.)	9.35526	20			

Puesto que el valor-P de la prueba-F es menor que 0.05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de porcentaje de callos entre un nivel de Tratamientos y otro, con un nivel del 95.0% de confianza.

Tabla 5. Morfología de los callos embriogénicos de *P. americana* var. Hass tratados con 2,4-D, BAP y TDZ evaluados a los 20 y 40 días.

Día	Luz	Tratamientos	Callo	
			Color	Forma
20	Presente	I	Marrón	Amorfa
		II	Marrón	Amorfa
		III	Blanco	Cóncava con bordes sinuosos
		IV	Marrón	Cóncava con bordes sinuosos
		V	Marrón	Amorfa
		VI	Amarillo	Cóncava con bordes sinuosos
		VII	Blanco	Cóncava con bordes sinuosos
40	Presente	I	Marrón	Amorfa
		II	Marrón	Amorfa
		III	Marrón	Cóncava con bordes sinuosos
		IV	Marrón	Cóncava con bordes sinuosos
		V	Marrón	Amorfa
		VI	Marrón	Amorfa
		VII	Marrón	Cóncava con bordes sinuosos

Tratamientos

I: 2,4-D/BAP (0.1/1 ppm); II: 2,4-D/BAP (0/1 ppm); III: 2,4-D/BAP (0.1/5 ppm); IV: 2,4-D/BAP (0/5 ppm); V: 2,4-D/BAP (0.1/10 ppm); VI: TDZ (1 ppm); VII: 2,4-D/TDZ (1/0.2 ppm).

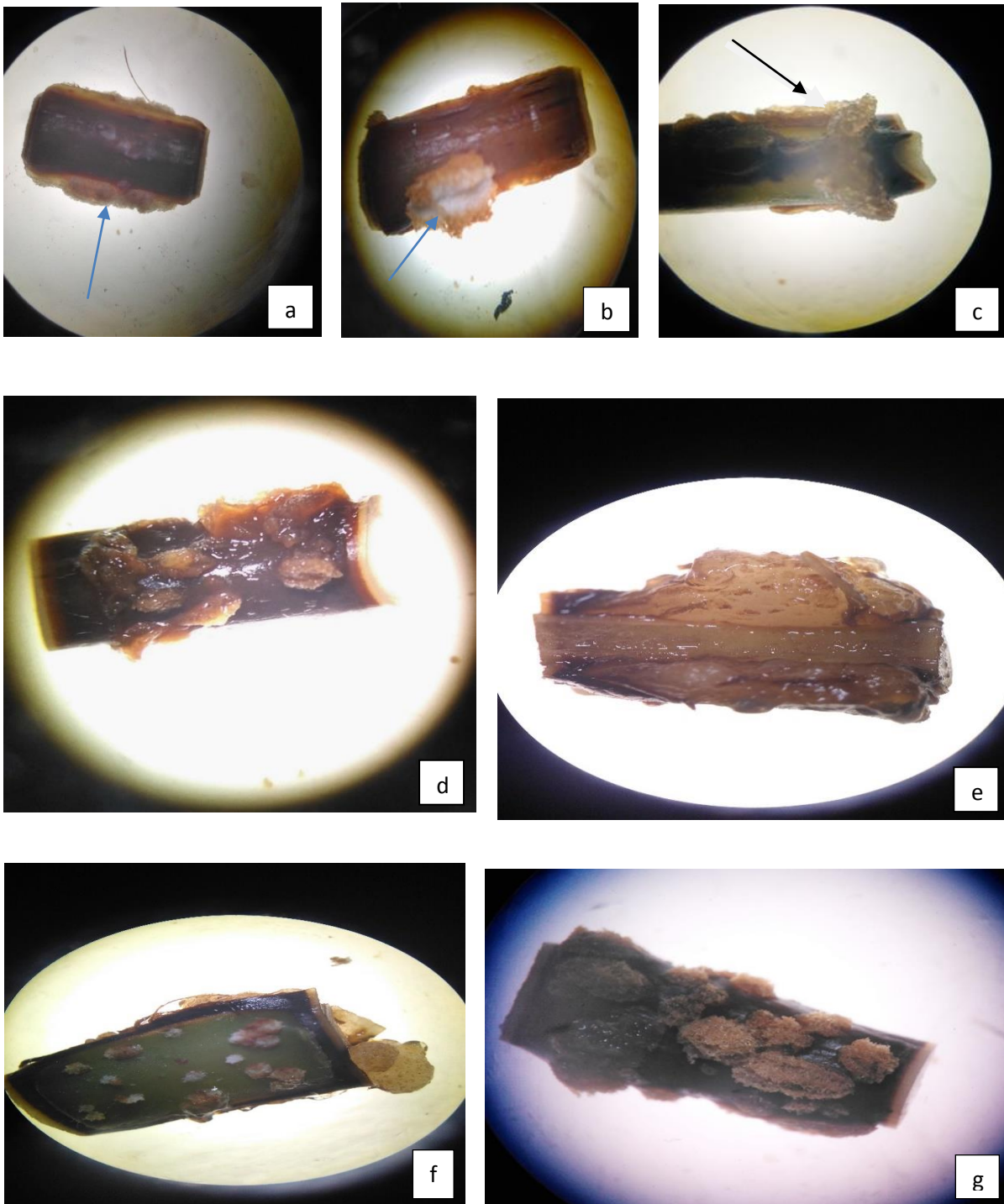


Fig. 3. Explante de *P. americana* var. *Hass* con callos embriogénicos del tratamiento I: 2,4-D/BAP (0.1/1 ppm) (a); tratamiento III: 2,4-D/BAP (0.1/5 ppm) (b); tratamiento VI: TDZ (1ppm) (c); tratamiento VII: 2,4-D (1ppm)-TDZ (0.2ppm), vista dorsal (d) y ventral (e). Numerosos callos por explante (f, g).

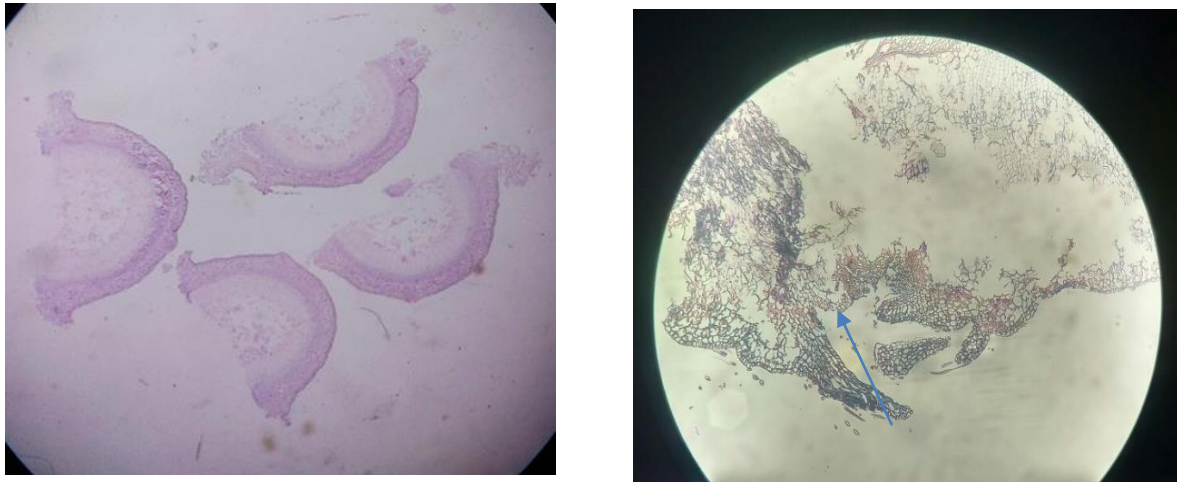


Fig. 4. Explantes antes de iniciar la experiencia (izquierda) y después de 40 días de tratamiento (derecha) se observa formación de células meristemáticas pequeñas y numerosas (masa multiembriogénica) con una doble epidermis que asemeja a una zona de abscisión, por donde posiblemente se separan los embriones en etapas más avanzadas de desarrollo. Además, no se observan las capas limitantes del tallo. Cortes al micrótopo. Coloración hematoxilina. 400x

DISCUSIÓN

Los explantes utilizados recibieron un pretratamiento con 2,4-D el cual es un elemento clave en la reprogramación genética de células somáticas durante la embriogénesis temprana y así inducir la desdiferenciación (Silveira *et al.*, 2013), además es señalado como el inductor de la inestabilidad. Esta auxina ejerce profundos efectos sobre la respiración celular, el consumo de azúcares y en el control de la multiplicación celular. Por ello, se especula acerca de su papel indirecto en la inducción de cambios en el metabolismo celular y tisular de plantas que crecen *in vitro*. Además, involucra un incremento sustancial en la transcripción que altera la estructura de la cromatina y con ello induce la desdiferenciación y este proceso sería el generador de los cambios (Pedroza, 2008, Sugimoto *et al.*, 2010)

En todos los tratamientos ensayados (Tabla 3) se han producido callos, lo cual es una masa de células desdiferenciadas que proliferan desorganizadamente en la cual hay probabilidad de una alta variación, según Pedroza (2008) cuando comienza la multiplicación celular a partir de tejidos diferenciados, que da origen a un callo, se incrementa el riesgo de inestabilidad cromosómica. Esta variación ocurre en los números cromosómicos en la primera fase de la inducción del callo será el resultado de la fragmentación nuclear seguida por la mitosis de los fragmentos nucleares, combinada con la mitosis normal de los núcleos intactos (núcleos euploides).

Las auxinas exógenas, en este caso 2,4-D a 0.1 y 1.0 ppm, son necesarias para inducir divisiones mitóticas y alargamiento celular durante la fase de inducción de callo, pero se deben eliminar del medio de cultivo, una vez que han ocurrido dichas divisiones celulares, para que proceda la morfogénesis embriogénica (Filippov *et al.*, 2006) o también puede crear un doble efecto, actuar como auxina o alterar el metabolismo del AIA endógeno para promover su producción, de esta forma incrementa la sensibilidad de las células al conferirle competencia embriogénica y comienza un proceso de división celular mitótico (Deo *et al.*, 2010, Sharma *et al.*, 2008)

Los diferentes combinaciones morfológicas de los callos en palto puede representar una amplia heterogeneidad morfológica relacionada con la capacidad regenerativa como sucede con *Oryza* (Kucherenko, 1993), reportes similares realizados por Moncada *et al.* (2005) mostraron la obtención de callos embriogénicos con diferentes concentraciones de BAP y 2,4-D en *Coffea arabica*, un fenómeno similar describe Velásquez *et al.* (2006) donde en la mayoría de callos de *Theobroma cacao* mostraron una apariencia friable y color crema; sin embargo, se pudo observar

callos hiperhídricos en los tratamientos que contenían las sales básicas de MS y altas concentraciones de 2,4-D. Al respecto, García *et al.* (2006) reportaron que en los medios de cultivo con diferentes concentraciones de TDZ, los explantes mostraron una coloración verde-amarillenta durante las dos primeras semanas de cultivo, posteriormente se formaron callos de color amarillo a pardo oscuro.

Se usó thidiazuron porque, es un regulador del crecimiento ampliamente utilizado en cultivos tejidos que promueve la división y el alargamiento celular (Murthy *et al.*, 1998). Además, opera en la regeneración y proliferación de meristemas y en combinación con otros reguladores, es utilizado para la formación y mantenimiento de callos gracias a su alta inducción de la división celular estimulando la síntesis de auxinas endógenas (De Melo *et al.*, 2006; Kokotkiewicz *et al.*, 2012). Otra ventaja adicional es el mantenimiento de la estabilidad genética, importante para obtener plantas sin variación somaclonal (Faisal *et al.*, 2014). Estos resultados concuerdan con Li *et al.*, 1998 que desarrollaron un método eficiente de producción de embriones somáticos a partir de explantes florales y combinaciones de (TDZ) y 2,4-D; Krivenki *et al.* (2008) también reportaron inducción de callos embriogénicos en *Stevia rebaudiana* utilizando concentración de 1.13 μM de 2,4-D y 0.45 μM de TDZ.

Para Ikeuchi *et al.*, (2013) los meristemas en las plantas son la fuente celular para todos los tejidos vegetales y las actividades que genera son apoyadas por el pool de las células madres que residen dentro de los meristemas y una fuerte activación, desdiferenciación con presencia de masas embriogénicas (Fig. 4), conduce a la inducción ectópica de los callos implicando además cambios masivos en la expresión de los genes para alterar el nivel de la diferenciación y desdiferenciación celular.

CONCLUSIONES

Se consiguió la inducción de callos embriogénicos en tallo de *Persea americana* Mill. Variedad Hass "palto", utilizando los reguladores de crecimiento 2,4-D, BAP y TDZ.

El tratamiento VII (TDZ y 2,4-D 0.2/1 ppm) fue el mejor inductor de callos embriogénicos mostrando diferencias significativas con respecto a los otros tratamientos en los parámetros de incremento de masa y número de callos por explante.

Los callos presentaron variadas morfologías, en su forma y color, lo que demuestra su rápida respuesta a la competencia y determinación celular.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alcaraz, L.** 2009. Biología reproductiva del aguacate (*Persea americana* Mill.). Implicaciones para la optimización del cuajado. Tesis Doctoral. Universidad de Málaga, España.
- Bernal, E. & C. Díaz.** 2005. Tecnología para el cultivo del aguacate (5° ed.). Antioquia: CORPOICA.
- Buzgo, M., et al.** 2007. Floral development morphology of *Persea americana* (avocado, Lauraceae): the oddities of male organ identity. *International Journal of Plant Sciences* 168(3), 261-284.
- Calva, G., & J. Pérez.** 2005. Cultivo de células y tejidos vegetales: Fuente de alimentos para el futuro. *Revista UNAM* 6(11).
- Campos-Rojas, E.; T. Terrazas & L. López-Mata.** 2007. *Persea* (avocados) phylogenetic analysis based on morphological characters: hypothesis of species relationships. *Genetic Resources and Crop Evolution* 54, 249–258.
- Carpita, N. & M. Mccann.** 2000. The cell wall. En: Buchanan B., Gruissem W., Jones R. (eds.) *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. USA: American Society of Plant Physiologists, pp. 52-108.

- Chanderbali, A. et al.** 2008 *Persea americana* (avocado): bringing ancient flowers to fruit in the genomics era. *Bioessays* 30: 386-396.
- Crozier, A.; Y. Aamiya; G. Bishop & T. Yokota.** 2000. Biosynthesis of hormones and elicitors molecules: Buchanan B., Grissem W., Jones R. (eds.) *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. USA: American Society of Plant Physiologists, pp. 850-929.
- De Melo, W., G. Barbante, J. Kraus, R. Pescador & R. Mamoru.** 2006. Thidiazuron influences the endogenous levels of cytokinins and IAA during the flowering of isolated shoots of *Dendrobium*. *Journal of Plant Physiology* 163(11): 1126-1134.
- Deo, P. et al.** 2010. Factors affecting somatic embryogenesis and transformation in modern plant breeding. *The South Pacific Journal of Natural and Applied Sciences* 28, 27-40.
- Doerner, P.** 2000. Cell division regulation: Buchanan B., Grissem W., Jones R. (eds.) *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. USA: American Society of Plant Physiologists, pp. 528-567.
- Faisal, M. et al.** 2014. Thidiazuron induced in vitro multiplication of *Mentha arvensis* and evaluation of genetic stability by flow cytometry and molecular markers. *Ind Crop Prod.* 62, 100-106.
- Filippov, M., D. Miroshnichenko, D. Vernikovskaya & S. Dolgov.** 2006. The effect of auxins, time exposure to auxin and genotypes on somatic embryogenesis from mature embryos of wheat. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 84, 213-222.
- García, I., J. Pérez, D. Torres, Y. Padron & C. Romero.** 2006. Influencia de reguladores del crecimiento en la formación de callos de *Phaseolus vulgaris* L cv. CIAP 7247, *Biotecnología Vegetal* 6(2), 73 – 77.
- Gutiérrez, A. et al.** 2009. Estudio de la diversidad genética del aguacate nativo en Nuevo León, México. *Rev. Fitotec. Mex* 32, 9-18.
- Guzmán, E.** 2012. Avocado somatic embryogenesis: maturation and germination of somatic embryos, characterization and cryopreservation of embryogenic cultures. Tesis Doctoral. Universidad de Córdoba, Argentina.
- Ikeuchi M.; K. Sugimoto & A. Iwase.** 2013. Plant callus: mechanisms of induction and repression. *The Plant Cell* 25: 3159-3173
- Judo, W., C. Campbell, E. Kellogg, P. Stevens, & M. Donoghue.** 2002. *Plant systematics: a phylogenetic approach*. Sinauer Associates, Inc., Sunderland, Massachusetts, USA.
- Kremer-Kohne, S., & M. Mukhomo.** 2003. Breeding and field evaluation of new rootstocks for increased 'Hass' yields and resistance to root rot in South Africa. *Proceedings of the VII Avocado World Congress, Vol II*, Malaga, Spain, 555-560.
- Kryvenki, M., R. Kosky, D. Guerrero, M. Dominguez & M. Reyes.** 2008. Obtención de callos con estructuras embriogénicas de *Stevia rebaudiana* Bert. en medios de cultivo semisólidos. *Biotecnología Vegetal* 8(2), 91 – 98.
- Kokotkiewicz, A. et al.** 2012. Micropropagation of *Cyclopia genistoides*, an endemic South African plant of economic importance. *Zurich Natur Sci.* 67, 65-76.
- Kucherenko, L. A.** 1993. Morphological heterogeneity in rice callus tissues and their regenerative capacity. *Russian J. Plant Physiol.* 40 (5): 797-801.
- Li, Z., A. Traore, S. Maximova & Gultinan, M.** 1998. Somatic embryogenesis and plant regeneration from floral explants of cacao (*Theobroma cacao* L.) using thidiazuron. *In vitro Cellular and Developmental Biology-Plant* 34(4):293-299.
- Moncada, E., M. Vielma & A. Mora.** 2005. Inducción in vitro de embriogénesis somática a partir de tejido foliar de *Coffea arábica* L. Variedad Catuaí Amarillo. *23 Academia*.

- Murashige, T. & F. Skoog.** 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant*, 15: 473-497.
- Murthy, S., S. Murch & P. Saxena.** 1998 Thidiazuron: A potent regulator of in vitro plant morphogenesis. *In vitro Cell Dev-PI* 34, 267-275.
- Parrot, W.** 2002. La embriogénesis somática en las angiospermas. VI Simposio Internacional de Biotecnología Vegetal. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Villa Clara, Cuba. Junio 17-21.
- Pedroza J.** 2008. Aplicaciones del cultivo de tejidos vegetales en condiciones in vitro. Universidad Distrital Francisco José de Caldas (Textos Universitarios). Colombia
- Peña Ramírez, Y. et al.** 2011. Induction of somatic embryogenesis and plant regeneration in the tropical timber tree Spanish red cedar [*Cedrela odorata* L.(Meliaceae)]. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 105, 203–209
- Seijo, M., A. Balsero, R. Gomez, Y. Garcia & M. Chavez.** 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.
- Sharma, S., S. Millam, P. Hedley, J. McNicol & G. Bryan.** 2008. Molecular regulation of somatic embryogenesis in potato: An auxin led perspective. *Plant Mol. Biol* 68, 185-201.
- Silva, J., S. Montes, L. Acosta, E. Arias. & A. García.** 2005. Embriogénesis somática: una alternativa para la propagación, mejoramiento y conservación de germoplasma en cacao. *Cuadernos de Biodiversidad* 16(2).
- Silveira, V. et al.** 2013. Morphological and polyamine content changes in embryogenic and non-embryogenic callus of sugarcane. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 114, 351-364.
- Soltis, D., P. Soltis, M. Chase & P. Endress.** 2005. Angiosperm Phylogeny and Evolution. Sinauer Associates. Sunderland.
- Suarez, I., R. Litz & J. Jaraba.** 2004. Embriogenesis somatica en tres cultivares de aguacate (*Persea americana* mill.). Memorias Segundo Congreso Colombiano de Biotecnología. IBUN, Bogotá p.44.
- Sugimoto K.; Y. Jiao; & E. Meyerowitz.** 2010. Arabidopsis regeneration from multiple tissues occurs via a root development pathway. *Developmental Cell* 18: 463-471
- Velásquez, R., Y. Sandra, C. Betancourt, J. Mata & F. García.** 2006. Embriogénesis somática en cultivares de cacao venezolanos. *Agronomía Trop* 56(1), 61-74.
- Vidales, I., D. Salgado, M. Gómez, E. Angel & H. Guillen.** 2003. Embriogénesis somática de aguacate (*Persea americana* mill. cv. Hass). Actas V Congreso Mundial del Aguacate, 89-95.
- Vidales, I.** 2002. Efecto de los reguladores de crecimiento en los procesos de organogénesis y embriogénesis somática de aguacate (*Persea americana* Mill.). Tesis Doctoral. Universidad de Colima, Colombia.
- Zanis, M., D. Soltis, P. Soltis, S. Mathews & M. Donoghue.** 2002. The root of the angiosperms revisited. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 99, 6848 6853.

