

EMBRIOGENESIS SOMATICA EN TRES CULTIVARES DE AGUACATE (*Persea americana* Mill.)

SOMATIC EMBRYOGENESIS IN THREE AVOCADO (*Persea americana* Mill.) CULTIVARS

Isidro E. Suárez¹, Richard E. Litz² y Juan D. Jaraba³

RESUMEN

Cultivos embriogénicos fueron inducidos a partir del nucelo de tres cultivares de aguacate en un medio de cultivo compuesto por las sales mayores B5 suplementado con las sales menores de Murashige y Skoog (MS), 0.41 μ M de picloram y (en mg L⁻¹) tiamina HCl (0.4), myo-inositol (100), sacarosa (30.000) y TC-agar (8.000). Los tejidos fueron transferidos a medio de mantenimiento de MS con 0.41 μ M de picloram y (en mg L⁻¹) tiamina HCl (0.4), myo-inositol (100), sacarosa (45.000) y TC-agar (8.000). La proliferación en medio líquido ocurrió en una modificación de MS con 15 mM NH₄NO₃ y 30 mM KNO₃ y 0.41 μ M de picloram y (en mg L⁻¹) tiamina HCl (0.4), myo-inositol (100) y sacarosa (45.000). Los embriones somáticos desarrollaron en MS suplementado con (en mg L⁻¹) sacarosa (30.000), myo inositol (100) y Gel Gro (6.000), y las plantas fueron recuperadas a partir de estos en MS3:1N suplementado con 1.0 μ M de benzyladenina y 10 μ M de ácido giberélico. Los resultados del estudio mostraron que no hubo diferencias estadísticamente ($p > 0.05$) significativas entre los cultivares con relación a los porcentajes de inducción y diferentes estructuras embriogénicas producidas en medio de mantenimiento; sin embargo, si hubo diferencias significativas ($p < 0.001$) con relación al número total de embriones somáticos desarrollados. Solo el cultivar 'Vero Beach' SE2 desarrolló plantas a partir de los embriones somáticos, indicando que es posible recuperar clones de aguacate mediante el cultivo de tejidos nucelares en una técnica que puede utilizarse como una forma alternativa de conservación de germoplasma.

Palabras Claves: Nucelo, tejido embriogénico, MPEs, embriones somáticos.

ABSTRACT

Embryogenic cultures were induced from the nucelli of three avocado cultivars on B5 medium supplemented with MS minor salts, 0.41 μ M picloram and (in mg L⁻¹) thiamina HCl (0.4), myo-inositol (100), sucrose (30.000) and TC-agar (8.000). The tissues were maintained on MS medium supplemented with 0.41 μ M picloram and (in mg L⁻¹) thiamina HCl (0.4), myo-inositol (100), sucrose (45.000) and TC-

¹Ph.D. Departamento de Ingeniería Agronómica y Desarrollo Rural - Universidad de Córdoba. Carrera 6 No. 76-103 Montería-Colombia. isuarez@sinu.unicordoba.edu.co

²Ph.D. TREC-University of Florida. 18905 SW 280th St. Homestead, FL 33031. relitz@ifas.ufl.edu

³M.Sc. Departamento de Agronomía-Universidad de Córdoba. Carrera 6 No. 76-103 Montería-Colombia. jjaraba@sinu.unicordoba.edu.co

agar (8.000). The suspension cultures were inoculated in a modification of MS with 15 mM NH_4NO_3 and 30 mM KNO_3 supplemented with 0.41 μM picloram and (in mg L^{-1}) thiamina HCl (0.4), myo-inositol (100) and sucrose (45.000). The somatic embryos developed on MS supplemented with (in mg L^{-1}) sucrose (30.000), myo inositol (100) and Gel Gro (6.000), and plants were recovered from developed somatic embryos on MS3:1N supplemented with 1.0 μM benzyladenine y 10 μM de gibberelic acid. The statistical analyses showed that there were no significant differences ($p > 0.05$) among the cultivars with respect to frequencies of induction and number of PEMs, HHE and Total SEs; however, there were significant differences ($p < 0.001$) with respect to the number of somatic embryos developed. Only the cultivar 'Vero Beach' SE2 recovered plant from the developed somatic embryos indicating the possibility of rescue avocado clones from nucellar tissue.

Key Word: Nucellus, embryogenic tissue, PEMs, somatic embryo.

INTRODUCCIÓN

El aguacate (*Persea americana* Mill.) es una especie frutal originaria de Centro América donde ha sido cultivada desde la antigüedad (Popenoe, 1920; Purseglove, 1968). Debido a su valor nutricional (Colquhoun, 1990), su uso como materia prima para diversos productos y su producción mundial (>2 millones de Ton año⁻¹ (Knight, 2002), el aguacate es considerado uno de los cultivos frutales mas importantes del mundo. De acuerdo con FAOSTAT (2002), Colombia aparece como el tercer productor mundial de aguacate con una producción de 205,000 Ton de fruta fresca por año, las mismas estadísticas mencionan a Chile como el de mayor crecimiento en ha entre 1998 y 2002.

El desarrollo de métodos y procedimientos de cultivo *in vitro* de aguacate ha comprendido aspectos como el cultivo de células a partir de tejidos del fruto (Desjardins, 1958; Schroeder, 1961), cultivo de protoplastos (Blickel *et al.*, 1986), cultivo de meristemos (Schroeder, 1980), microinjertación (Pliego-Alfaro *et al.*, 1987) y transformación genética (Cruz-Hernández *et al.*, 1998) entre otros. El primer reporte de producción de plantas de aguacate a través de la producción de embriones somáticos fué obra de Pliego-Alfaro (1981), seguido por Mooney y Van Staden (1987) y mas recientemente Witjaksono y Litz (1999b). Sin embargo, en

estos estudios, los explantes utilizados para la inducción del material embriogénico han consistido de embriones zigóticos inmaduros, los cuales no garantizan la conservación de las características genotípicas ni mucho menos el fenotipo en las plantas recuperadas. Con el fin de superar esta limitante y tratar de mantener al máximo la fidelidad genética, en el presente estudio se evaluó la capacidad de recuperación de plantas mediante el uso de la embriogénesis somática en tres cultivares de aguacate utilizando tejido somático de origen nucelar como explante inicial.

MATERIALES Y METODOS

Inducción de cultivos embriogénicos

Frutos <0.5 cm de diámetro fueron tomados de los cultivares 'Vero Beach' SE2, 'Vero Beach' 1 y 'Yama' 381 plantados en el Repositorio Nacional de Germoplasma de Aguacate en Miami, FL. Los frutos fueron lavados durante 1 hora con agua a temperatura ambiente, esterilizados superficialmente en una solución al 1.25% (v/v) de hipoclorito de sodio con 5 gotas de Tween 20® por 15 minutos y enjuagados con tres cambios de agua esterilizada. Posteriormente, los frutos fueron bisectados dentro de una cámara de flujo laminar, el embrión zigótico y el endospermo fueron removidos y descartados, y los integumentos

con el nucelo adherido fueron inoculados en medio para inducción de cultivos embriogénicos de aguacate (MIA) (Witjaksono y Litz, 1999a). El MIA consistió de las sales mayores B5 (Gamborg *et al.*, 1968) y fué suplementado con las sales menores de Murashige y Skoog (MS) (Murashige y Skoog, 1962), 0.41 μ M de picloram y (en mg L⁻¹) tiamina HCl (0.4), myo-inositol (100), sacarosa (30.000) y TC-agar (8,000) (Carolina Biological Supply). El medio de cultivo fué esterilizado en un autoclave y distribuido en alicotas de 10 ml en platos de Petri® plásticos (60 x 15 mm). Cuatro explantes, 1 mitad de nucelo cada uno, fueron inoculados en cada plato, estos fueron sellados con Parafilm® y almacenados en cajas plásticas en la oscuridad a una temperatura de 25°C durante 4 a 6 semanas. El total de explantes inoculados fue el siguiente: 464 de 'Vero Beach' SE2, 80 de 'Vero Beach' 1 y 328 de 'Yama' 381. El número de cultivos embriogénicos inducidos fué registrado y los porcentajes de inducción fueron calculados 6 semanas después de la inoculación.

Mantenimiento de cultivos embriogénicos

Los cultivos embriogénicos que desarrollaron en el MIA, fueron transferidos a medio de mantenimiento semi sólido de acuerdo con los protocolos de Wijaksono y Litz (1999a) donde proliferaron. El medio de mantenimiento consistió de las sales mayores y menores de MS suplementado con 0.41 μ M de picloram y (en mg L⁻¹) tiamina HCl (0.4), myo-inositol (100), sacarosa (45.000) y TC-agar (8.000). El medio fué esterilizado y distribuido similarmente a lo indicado para MIA.

Cuatro semanas después del establecimiento en medio semi sólido, el número de masas proembriogénicas (MPEs), proembriones, embriones hiperhídricos (EHH) y embriones somáticos totales fueron registrados y

analizados con ANOVA usando el siguiente modelo estadístico: $Y_i = \mu + a_i + e_i$; donde Y_i corresponde al número de tejidos embriogénicos (MPEs, proembryos, o ESs), i = cultivar, e_i = error experimental. Las transferencias periódicas de los cultivos a un medio fresco de la misma composición se hicieron mensualmente.

Después de tres subcultivos en el medio semi sólido de mantenimiento, los tejidos fueron establecidos en suspensión utilizando aproximadamente 200 mg de tejido e inoculándolos en medio líquido MS:31N (Witjaksono *et al.*, 1999a). MS3:1N consistió de una modificación de MS que contiene 15 mM NH₄NO₃ y 30 mM KNO₃ y suplementado con 0.41 μ M de picloram y (en mg L⁻¹) tiamina HCl (0.4), myo-inositol (100) y sacarosa (45.000). El medio fue esterilizado, distribuido en cantidades de 40 ml en erlenmeyers de 125 ml, cubiertos con papel aluminio y sellados con Parafilm. Los cultivos fueron colocados en un agitador horizontal a 120 rpm, en un ambiente semioscuro a 25°C y fueron subcultivados a medio fresco cada dos semanas.

Desarrollo de embriones somáticos

Los tejidos cultivados en medio líquido fueron filtrados a través de un tamiz esteril de 1.8 mm de diámetro y los tejidos más pequeños colectados e inoculados en medio de desarrollo de embriones somáticos (MDES) (Witjaksono y Litz, 1999b). El MDES consistió de MS suplementado con (en mg L⁻¹) sacarosa (30.000), myo inositol (100) y Gel Gro® (6.000) (Carolina Biological Supply). El medio fué esterilizado en un autoclave y distribuido en porciones de 20 ml en platos de Petri (100 x 20 mm). Los tejidos fueron distribuidos uniformemente sobre la superficie del medio, los platos fueron sellados con Parafilm y posteriormente almacenados en la oscuridad a 25°C. Para cada cultivar, un total de 50 platos de Petri fueron independientemente inoculados con

tejidos embriogénicos consistentes mayoritariamente de MPEs. El número de embriones somáticos fué registrado 3-4 meses después de la inoculación y los datos analizados con ANOVA.

Recuperación de plantas

Los embriones somáticos con un diámetro >0.5 cm fueron inoculados en medio de germinación de embriones somáticos (MGES) desarrollado por Witjaksono y Litz (1999b). El MGES consistió de MS3:1N suplementado con 1.0 μ M benzyladenina (BA) y 10 μ M de ácido giberélico (GA_3) y fué distribuido como se indicó para el MDES. Un total de 7 embriones somáticos opacos fueron inoculados en cada plato de cultivo, los platos fueron sellados con Nescofilm® y almacenados en cajas plásticas translúcidas con una intensidad lumínica de 40 μ mol m⁻² s⁻² a una temperatura de 25°C. El número de embriones somáticos que formaron meristemos apicales, raíces o ambos órganos fué registrado aproximadamente 3-4 meses después de la inoculación en MGES. Los embriones somáticos que desarrollaron meristemos apicales en MGES fueron transferidos individualmente a frascos de vidrio conteniendo 20 ml de medio básico de MS suplementado con (en mg L⁻¹) sacarosa (30.000), myo-inositol (100) y Gel Gro (2.000). Los recipientes fueron cubiertos con tapas plásticas Nalgene®, sellados con Nescofilm y almacenados a las condiciones mencionadas anteriormente. El número final de plantas recuperadas fué registrado para cada cultivar.

RESULTADOS Y DISCUSION

Inducción de cultivos embriogénicos

Los cultivos embriogénicos fueron inducidos entre la 2^a y 4^a semana después de la inoculación en MIA. Los tejidos se originaron a partir de la zona interior del explante en el área en contacto con el medio de cultivo

(Figura 1a). En el proceso de inducción no se observó la formación de callo y los porcentajes de inducción fueron de 2.5% 'Vero Beach' SE2, 6.25% para 'Yama' 381 y 6.25% para 'Vero Beach' 1. Debido al bajo porcentaje de inducción observado en cada uno de los cultivares en estudio no fué posible establecer ninguna correlación estadística para esta variable.

La recuperación de plantas a través de la producción de embriones somáticos a partir de tejidos nucelares ha sido previamente reportada en especies frutales como cítricos (Weathers y Calavan, 1959), *Carica pentágona* (Vega de Roja y Kitto, 1991) y *Maguifera indica* (Litz, 1984). El cultivo *in vitro* de tejidos nucelares y la posterior recuperación de plantas ha sido utilizado para obtener clones sanos a partir de plantas infectadas con diferentes agentes infecciosos como virus y viroides en plantas cítricas (Bitters *et al.*, 1972). En la presente investigación, se reporta la inducción y mantenimiento de cultivos embriogénicos, el desarrollo de embriones somáticos y la posterior recuperación de plantas a partir de tejidos nucelares cultivados en condiciones *in vitro*.

La inducción de cultivos embriogénicos se puede dar a través de dos formas diferentes: con la formación intermedia de un crecimiento calloso (Inducción Dirigida), o directamente a partir de células presentes en el explante sin una capa intermedia de callo (Inducción Permisiva) (Ammirato, 1987). En la presente investigación, los cultivos embriogénicos fueron inducidos directamente de células del explante sin la formación de un tejido de callo en una inducción de tipo permisivo, indicando que algunas células presente en el explante contenían potencial embriogénico, el cual fué expresado una vez estas fueron colocadas en el medio inductivo (Ammirato, 1987; Litz y Gray, 1995). Al comparar las frecuencias de inducción de los explantes nucelares utilizados en el presente trabajo con aquellas

obtenidas a partir de explantes consistentes de embriones zigóticos de otros trabajos (Pliego-Alfaro y Murashige, 1988; Mooney y Van Staden, 1987; Witjaksono y Litz, 1999a) se observa que el tejido nucelar puede tener una menor capacidad para producir tejidos embriogénicos que los embriones zigóticos inmaduros; sin embargo esta desventaja se ve compensada con la posibilidad de obtener clones, lo cual es imposible cuando se utilizan embriones sexuales.

Mantenimiento de cultivos embriogénicos

La tabla 1 muestra el número promedio y los errores estándares de los diferentes tipos de estructuras embriogénicas que proliferaron en medio de mantenimiento semisólido. Los resultados del análisis de varianza

demonstraron que no hubo diferencias estadísticamente significativas ($p > 0.05$) entre los cultivares con respecto a el número de masas proembriogénicas (MPEs), proembriones, y número total de somáticos. Aunque la mayoría de los tejidos consistentes de embriones somáticos degeneraron y murieron, algunos crecieron y proliferaron en forma de MPEs, mientras que los inducidos como MPEs y proembriones mantuvieron su morfología durante la multiplicación. Después de tres subcultivos, los tejidos multiplicados estaban compuestos mayoritariamente de MPEs (Figura 1b). Los cultivos proliferaron en medio líquido y mantuvieron la morfología predominante de MPEs. Al final del período de multiplicación (aproximadamente 4 meses después de la inoculación en medio líquido), las MPEs decrecieron un poco en tamaño pero conservaron su capacidad de proliferación.

Tabla 1. Promedio y errores standares (en paréntesis) de diferentes tipos de cultivos embriogénicos en medio de mantenimiento.

Cultivar	Cultivos Embriogénicos		
	MPEs ¹	Proembriones	E S ² Totales
'Vero Beach' 1	1.000 (0.632)	1.800 (0.800)	5.40 (1.720)
'Vero Beach' SE2	0.818 (0.352)	1.181 (0.463)	5.181 (1.110)
'Yama' 381	1.00 (0.314)	2.142 (0.543)	6.642 (1.462)

¹Masas proembriogénicas

²Embiones somáticos

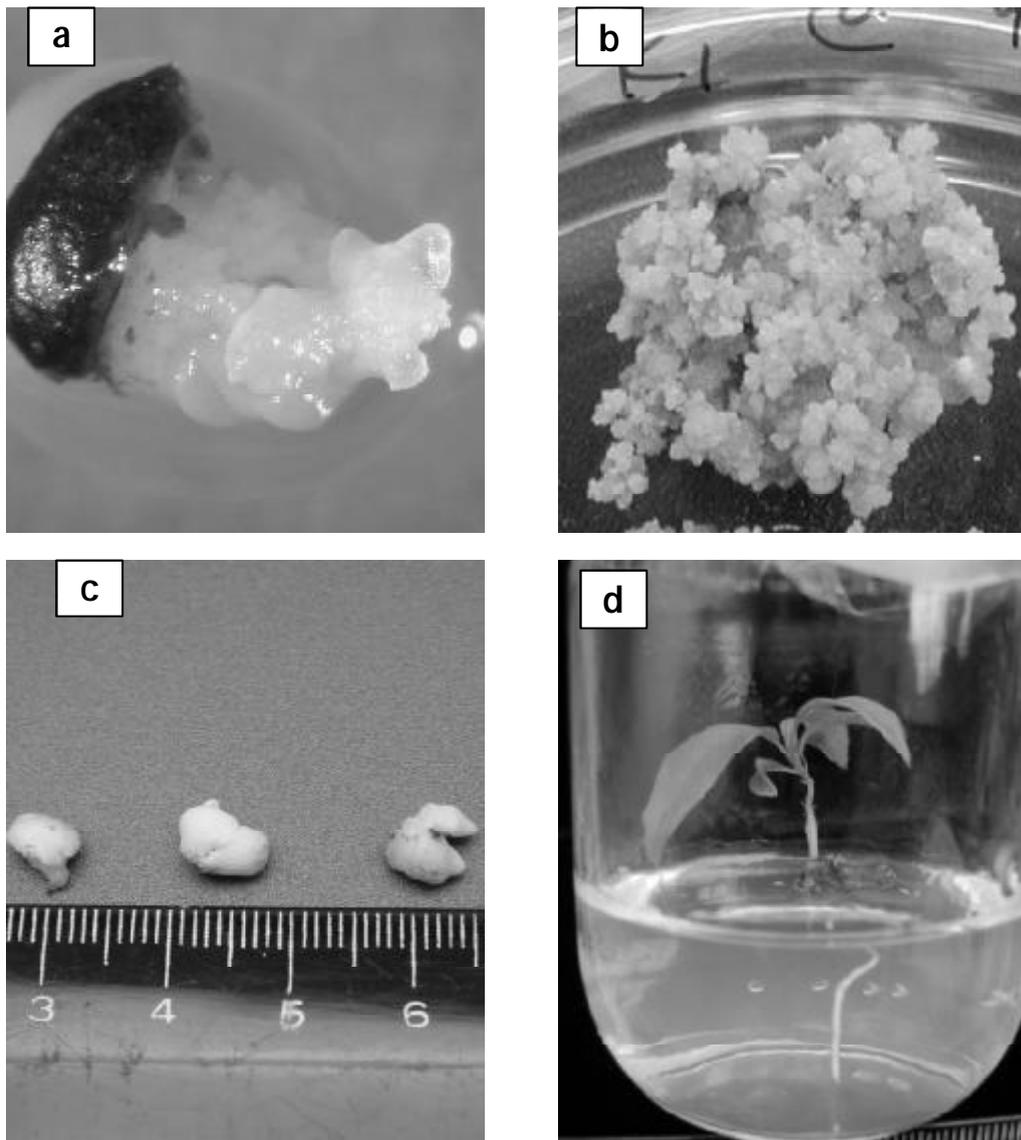


Figura 1. a: Inducción de cultivos embriogénicos, b: multiplicación de cultivos embriogénicos en medio semi sólido, c: embriones somáticos; d: planta recuperada.

Los cultivos embriogénicos tienen la capacidad de desarrollar diferentes morfologías y estructuras en diversos grados de desarrollo de manera simultánea (Cristianson, 1987); esta particularidad fue observada en el presente trabajo. Sin embargo, las observaciones realizadas difieren de los resultados presentados por Witjaksono y Litz (1999a), quienes afirman que la morfología (MPEs o embriones somáticos) observadas durante la inducción son controladas genotípicamente manteniéndose esta durante todo el período

del cultivo. Con relación a este punto se sugiere realizar estudios más detallados, ya que a pesar de haber observado que al momento de la inducción varios cultivos desarrollaron en forma de embriones somáticos (Datos no mostrados), después de varios subcultivos en medio líquido la gran mayoría de estos estaban conformados por MPEs, indicando una variación de la morfología presentada al momento de la inducción, lo cual no está completamente de acuerdo con lo afirmado en el trabajo en mención.

Desarrollo de embriones somáticos

La figura 2 muestra el promedio y los errores estandares del número promedio de embriones somáticos desarrollados en cada plato por cada uno de los cultivares. Los resultados del análisis de estadístico ($p < 0.001$) muestran que el cultivar 'Vero Beach' SE2 desarrolló un número total mayor de embriones somáticos (~750) con un promedio de 15 embriones somáticos por cada plato inoculado. EL cultivar 'Vero Beach' 1 produjo el segundo mayor número de embriones somáticos (~140) con un promedio aproximado de 2.7 embriones por cada plato inoculado mientras que el cultivar 'Yama' 381 no desarrolló embriones. En estudios previos la capacidad de desarrollar embriones

somáticos en condiciones *in vitro* ha sido sugerida como el resultado de una característica controlada genotípicamente (Witjaksono y Litz, 1999b). Los resultados obtenidos en el presente soportan esto, ya que se observa una marcada diferencia entre los cultivares en estudio con relación a la formación de embriones somáticos. Esto puede significar que para aquellos cultivares que son recalcitrantes a la formación de embriones somáticos se deben ensayar nuevas estrategias para inducir la formación de estas estructuras y en caso de insistir en la producción masiva de plantas es preferible aplicar formas alternativas de micropropagación tales como el cultivo de yemas apicales y laterales o microinjertos.

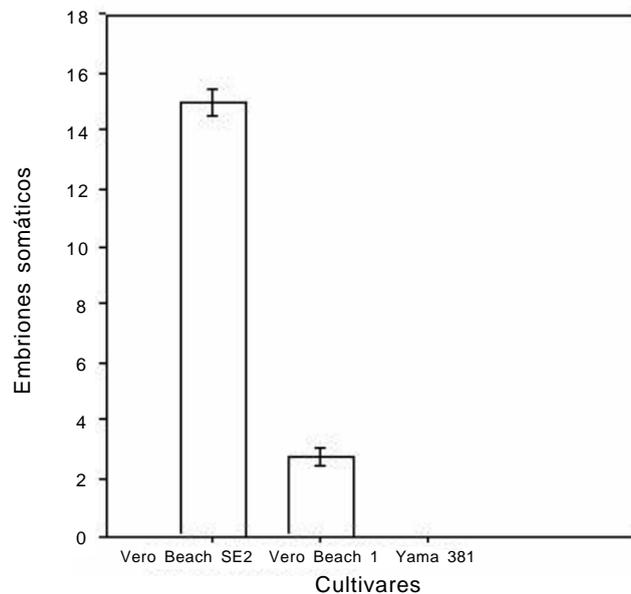


Figura 2. Promedio del número de embriones somáticos por plato de Petri desarrollado por cada cultivar sus respectivos errores estandares.

Recuperación de plantas

Solo los embriones somáticos del cultivar 'Vero Beach' SE2 mostraron desarrollo de órganos tales como apices caulinares, raíces o ambos (Figura 1e). De un total de 520 embriones somáticos opacos transferidos a medio de germinación 6 desarrollaron sólo meristemos apicales, 6 formaron sólo raíces y 4 formaron ambos órganos. Únicamente

aquellos embriones somáticos que desarrollaron meristemos apicales y raíces en la misma estructura tuvieron la capacidad de convertirse en plantas, lo cual representa menos de un 1% de conversión. La conversión de embriones somáticos en plantas es una de las mayores limitantes que posee el proceso de micropropagación a través de la embriogénesis somática (Gray,

1996). Los resultados del presente trabajo sugieren que aunque a partir de tejidos nucelares es viable la producción de tejidos embriogénicos y la recuperación de plantas a partir de embriones somáticos desarrollados, se deben hacer esfuerzos considerables para alcanzar niveles de producción de plantas cercanos a aquellos obtenidos por semillas sexuales u otros métodos de micropropagación. No obstante, con relación a esta limitante, ya se están aplicando técnicas que pueden ayudar a incrementar el número de plantas originadas mediante embriogénesis somática. Utilizando una atmósfera controlada, Witjaksono *et al.* (1999) reportó que al usar un ambiente con un contenido incrementado de CO₂ se pueden obtener tasas mayores de multiplicación de ápices caulinares. En otro estudio tratando de incrementar el número de plantas obtenidas a partir de embriones somáticos, Raharjo y Litz (2003) usaron microinjertación de ápices desarrollados en embriones somáticos sobre plantas germinadas en condiciones *ex vitro*, logrando de esta manera aumentar considerablemente el número de individuos llevados a condiciones de casa malla.

CONCLUSION

La producción de plantas mediante la embriogénesis somática a partir de explantes nucelares se adiciona a la lista de avances biotecnológicos logrados en la planta de aguacate y que incluyen la transformación genética (Cruz-Hernández *et al.*, 1998), inducción de variabilidad mediante la aplicación de agentes mutagénicos (Witjaksono y Litz, 2004), conservación de germoplasma (Efendi *et al.*, 2002) y estudio de patógenos asociados con la especie (Suárez *et al.*, 2004a, b). Los resultados aquí obtenidos demuestran que si es posible recuperar plantas a partir de tejido nucelar para producir clones; sin embargo, se recomienda continuar los esfuerzos para aumentar la eficiencia del proceso principalmente en la fase de conversión de embriones somáticos en plantas, aunque los nuevos reportes de uso de técnicas complementarias como los microinjertos o la multilicación de ápices caulinares producidos por embriones somáticos vislumbran una solución cercana a esta limitante.

BIBLIOGRAFIA

- Ammirato, P. 1987. Organizational event during somatic embryogenesis. En: Green, C.; Somers, D.; Hackett, W. y Biesboer, D. (Ed). Plant Tissue and Cell Culture. ARS Liss, New York, p.57-81
- Bitters, W.; Murashige, T.; Rangan, T. y Nauer, E. 1972. Investigation on establishing virus free citrus plants through citrus culture. En: Proceedings of International Organization of Citrus Virologists. University of Florida Press, Gainesville, p.267-271
- Blickel, W.; Muhulbach, H. y Sanger, H. 1988. Conditions for the isolation of protoplast from callus cultures of avocado (*Persea americana*). VI Int Cong Plant Tissue and Cell Cult, Agosto 3-8, 1988. University of Minnesota, Minneapolis, p.357 (Abstract)
- Christianson, M. 1987. Causal events in morphogenesis. En: Green, C.; Somers, D.; Hackett, W. y Biesboer, D. (Ed). Plant Tissue and Cell Culture. A.R. Liss, New York. p.44-45

- Colquhoun, D. 1990. Comparison of the effect of an avocado enriched and American Heart Association diets on lipid levels. En: Proc Aust Avocado Growers' Fed Conference 90, Aust Avo Growers, Brisbane, p.43-44
- Cruz-Hernandez, A.; Witjaksono; Litz, R. y Gomez-Lim, M. 1998. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of embryogenic avocado cultures and regeneration of somatic embryos. Plant Cell Rep 17: 497-503
- Desjardins, P. 1958. Callus tissue growth on avocado stem segments cultured on artificial media. Cal Avo Soc Yrb 42: 99-101
- Efendi, D.; Litz, R. y Alorani, F. 2001. Cryopreservation of embryogenic avocado (*Persea americana* Mill.) cultures. In Vitro Cell Dev Biol 37:39A
- FAOSTAT Database. 2002 Food and Agricultural Organization, United Nations, Rome, <http://apps.fao.org/lim500/nph-wrap.pl> [Accessed 21 February 2003]
- Gamborg, O.; Miller, R. y Ojima, K. 1968. Plant cell cultures. I. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. Exp Cell Res 50:151-158.
- Gray, D. 1996. Nonzygotic embryogenesis. En: Trigiano, R. y Gray, D. (Ed.) Plant Tissue Culture Concepts and Laboratory Exercises. CRC Press, Boca Raton, p.133-147
- Knight, RJJr. 2002. History, Distribution and Uses. En: Whaley, A.; Schaffer, B. y Wostenholme, B. (Ed.). The Avocado, Botany Production and Uses. CAB International, Wallingford, p.1-15
- Litz, R. 1984. *In vitro* somatic embryogenesis from nucellar callus of monoembryonic *Mangifera indica* L. HortScience 19:715-717
- Litz, R. y Gray, D. 1995. Somatic embryogenesis for agricultural improvement. World J Microbiol Biotech 11:416-425
- Mooney, P. y Van Staden, J. 1987. Induction of embryogenesis from immature embryos of *Persea americana*. Can J Bot 65:622-626
- Murashige, T. y Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth of and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol Plant 15:473-497.
- Pliego-Alfaro, F. 1981. A morphogenetic Study of the Avocado (*Persea americana* Mill.) *in vitro*: I. Development of the Rooting Bioassay and its Application to Studying Restoration by Grafting of Rooting Competence in Adult Shoots; II. Somatic Embryogenesis in Callus. Ph.D. Dissertation, University of California, Riverside
- Pliego-Alfaro, F. y Murashige, T. 1987. Possible rejuvenation of adult avocado by graftage onto juvenile rootstock *in vitro*. HortScience 22:1321-1324
- Pliego-Alfaro, F. y Murashige, T. 1988. Somatic embryogenesis in avocado (*Persea americana* Mill.) Plant Cell Tiss Org Cult 12:61-66
- Popenoe, W. 1920. Manual of Tropical and Subtropical Fruits. McMillan, London, p.524
- Purseglove, J. 1968. Tropical Crops, Dicotyledons 1. John Wiley & Sons, Inc., New York, p.6

- Raharjo, S. y Litz, R. 2003. Rescue of genetically transformed avocado by micrografting. Memorias del V Congreso Mundial de Aguacate. Málaga, p.120-122
- Schroeder, C. 1961. Growth of avocado fruit tissue on artificial media. Cal Avo Soc Yrb 40:165-168
- Schroeder, C. 1980. Avocado tissue in vitro. Cal Avo Soc Yrb 64:139-141
- Suárez, I.; Litz, R. y Schnell, R. 2004. Microinjertación de plantas de aguacate (*Persea americana* Mill.) infectadas con el viroide de la mancha del sol (ASBVd). Memorias XXV Congreso de ASCOLFI. Asociación Colombiana de Fitopatología, Palmira, p.4
- Suárez, I.; Litz, R. y Schnell, R. 2004. Estudio del viroide de la mancha del sol (ASBVd) en cultivos embriogénicos y plantas nucelares de aguacate (*Persea americana* Mill.). Memorias Segundo Congreso Colombiano de Biotecnología. IBUN, Bogotá, p.65
- Vega de Rojas R. y Kitto S. 1991 Regeneration of babaco (*Carica pentagona*) from ovular callus. J Amer Soc Hort Sci 116:747-752
- Weathers, L.; y Calavan, E. 1959 Nucellar embryony as a means of freeing citrus clones of viruses In: Wallace JM (Ed). Citrus Virus Diseases, University of California Division of Agricultural Sciences, Berkeley, p.197-200
- Witjaksono y Litz R. 1999a. Induction and growth characteristics of embryogenic avocado cultures. Plant Cell Tiss Org Cult 59:19-29.
- Witjaksono y Litz, R. 1999b. Maturation of avocado somatic embryos and plant recovery. Plant Cell Tiss Org Cult 58:141-148
- Witjaksono y Litz, R. 2004. Effect of gamma irradiation on embryogenic avocado cultures and embryo development. Plant Cell Tiss Org Cult 77:139-147
- Witjaksono, Schaffer B, Colls A, Litz R. y Moon P. 1999a. Avocado shoot culture, plantlet development and net CO₂ assimilation in an ambient and CO₂ enhanced environment. In Vitro Cell Dev Biol-Plant 35:238-244