
UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA
E.T.S.I.A.M.
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA

TESIS DOCTORAL

"Avocado somatic embryogenesis: maturation and germination of somatic embryos, characterization and cryopreservation of embryogenic cultures"

Doctorando:

Eva Guzmán García

Directora:

Dra. Carolina Sánchez Romero

Abril 2012

TÍTULO: Avocado somatic embryogenesis: maturation and germination of somatic embryos, characterization and cryopreservation of embryogenic cultures

AUTOR: Eva Guzmán García

© Edita: Servicio de Publicaciones de la Universidad de Córdoba. 2012
Campus de Rabanales Ctra. Nacional IV, Km. 396 A
14071 Córdoba

www.uco.es/publicaciones

publicaciones@uco.es

Carolina Sánchez Romero, Profesora del Departamento de Biología Vegetal de la Universidad de Málaga

CERTIFICA:

Que la memoria de Tesis titulada "Avocado somatic embryogenesis: maturation and germination of somatic embryos, characterization and cryopreservation of embryogenic cultures", presentada por Eva Guzmán García, ha sido realizada bajo mi dirección y supervisión y autorizo su presentación para ser defendida en el Departamento de Genética de la Universidad de Córdoba.

Málaga, 9 de Abril de 2012

Fdo. Carolina Sánchez Romero

Luis Miguel Martín Martín, Catedrático del Departamento de Genética de la Universidad de Córdoba,

Acredita que: en la Tesis Doctoral titulada "Avocado somatic embryogenesis: maturation and germination of somatic embryos, characterization and cryopreservation of embryogenic cultures", que presenta Dña. Eva Guzmán García para optar al Título de Doctor, ha actuado como tutor y responsable de la línea de investigación 'Recursos genéticos en mejora vegetal', y autoriza la presentación de esta tesis doctoral.

Córdoba, 9 Abril 2012

Fdo. Luis Miguel Martín Martín

El doctorando ha disfrutado de una beca predoctoral del Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera (IFAPA) cofinanciada por la Junta de Andalucía y fondos FEDER y de una STSM de la COST-Action Fa0603 Plant Proteomics in Europe.

A mis padres

Las casualidades o antojos del destino pueden provocar, o al menos favorecer, la elección de un camino determinado que hasta entonces permanecía oculto. Aunque hay muchos más motivos, se podría decir que, gracias a un encuentro casual en Madrid con una pareja estupenda, empecé mi camino en el mundo de la investigación, que hoy tiene como fruto la presentación de esta Tesis Doctoral. Durante estos años, el hecho de haber pasado por momentos complicados, me ha servido enormemente para aprender y crecer como persona, pero sobretodo, para poder apreciar y valorar la colaboración, ayuda, cariño, apoyo y amistad de mucha gente a la que hoy me gustaría mostrar mi agradecimiento.

En primer lugar, a Luis Miguel Martín por guiarme en este "deporte de caballeros" enseñándome siempre la parte más positiva. El ser partícipe del entusiasmo e ilusión con la que vives tu trabajo, el espíritu de colaboración de tu equipo, caracterizado por una gran humildad y sin discriminaciones académicas ni de otro tipo, consiguieron contagiarme de inmediato y decidirme a intentar tener en un futuro un trabajo con el que disfrutar y aprender cada día algo nuevo. Gracias además, a ti y a Concha por acogerme en Córdoba durante los cursos de doctorado y el resto de visitas que desde entonces he realizado a la ciudad que me vio nacer. Desde el primer día me sentí, y me sigo sintiendo, con vosotros, como en casa.

A Fernando Pliego por haber sido un jefe excepcional, sabiendo mantener el equilibrio perfecto entre el respeto y las obligaciones de cada uno, propiciando al mismo tiempo que hubiera una muy buena relación personal. Ha sido una suerte poder trabajar a tu lado, y gracias a eso creo haber aprendido muchísimo, tanto a nivel profesional, como personal.

A Araceli Barceló tendría que agradecerle tantas cosas que su relación sería interminable y por ello solo destacaré lo más importante para mí. Gracias por hacerme sentir parte de un grupo, de un equipo, en todos los sentidos. Tampoco puedo olvidar que siempre has estado disponible, con una paciencia y calma infinita, para todo tipo de consultas.

A todos mis compañeros del IFAPA de Churriana, con los que he compartido laboratorio, despacho o desayunos, incluyendo a su director, J. Manuel López Aranda, a la gente de administración (Julia, Nani), y al personal de los invernaderos y del resto de laboratorios. Cada uno ha colaborado en este trabajo de formas muy distintas y complementarias. De forma particular no me gustaría olvidarme de mis compis de *in vitro*, Marta, Isa Padilla, Isa Vidoy y como no de Eli, que siempre sonriente me ha enseñado todo lo que sé del laboratorio y en los últimos años mis primeros pinitos en el invernadero, sin

olvidar algunos bailes muy divertidos en los congresos. Con el resto de becarios que empezaron conmigo, Yasmin, Edu, Rafa, David, Auri, Clara (maravilloso viaje juntas que nunca olvidaré, ¿empanadas?) he pasado también momentos estupendos, y también con los recién incorporados como Enrique, Julio, Borja o Yanet, pero es de justicia dejar un hueco muy especial para mi compañera y amiga Mayte. Con ella, he mantenido debates científicos discutiendo mis experimentos, he aprendido con sus clases magistrales de estadística, y además me ha prestado su ayuda incondicional en todo lo que he necesitado. Todo eso unido a la ilusión desbordante con la que ella participa en la investigación, hacen que una parte de esta tesis se la deba a ella, ¡gracias!

A toda la gente del Departamento de Fisiología Vegetal de la UMA, por acogerme como una más del equipo trabajando allí y compartiendo esos maravillosos desayunos. De forma especial a Elena, Sergio y Fatiha, a los que me une la técnica de esta tesis, y que cuidaron de mis "preciosos" callos durante mi estancia en Bélgica.

A Nico y a Candela, y a todo el Departamento de Biología de Sistemas de la Universidad de Oviedo que hicieron que mi estancia allí fuera muy interesante y satisfactoria.

I would like to show my deepest gratitude to Bart Panis for accepting me in his laboratory. Among all the virtues I would highlight that he is able to bring up the best of everyone. I am also especially grateful to Sebastien Carpentier for his patience during my beginning with proteomics. He helped me a lot during my stage and afterwards. I want also say thank you to Yves with whom I shared my first gels and Annelies an excellent mate and friend. To all the people for the Laboratory Tropical Crop Improvement, thanks! In my love to Belgium there are also good friends I cannot forget, Romina, Sandra, Pablo and Gemma.

A todas las personas que en este tramo final me han ayudado directamente con la elaboración de este manuscrito: Elsa, Susan, Eva, Dani y Franci, con amigos así esto ha sido mucho más fácil, ¡mil gracias a todos!

A mis amigos del Norte, la biokuadri fundada por Sendoa y en la que hoy siguen participando Mario, María, Iker, Yiyi, Lide, Inés, Gari, Aitana, Pipe, Terete, Eli, Dani, con los que empecé en esta locura de la biología y con los que afortunadamente sigo compartiendo vivencias en el ámbito de la investigación, y fuera de ella. A mi gente del sur, destacando mis amigas de la infancia, Carmen y María, mis cómplices de salidas nocturnas o veladas gastronómicas, que últimamente han pasado a segundo plano, Vito, Aida, Dani, Ana, Frasco, Javi, Boni, M^a Santi, Antonio, Jesús. No me gustaría olvidar mis amigos más

recientes a los que me he "arrimado", siendo JARA la asociación que nos une a todos. Entre ellos quiero destacar el cariño y paciencia de M^a José. Además, las charlas acaloradas con Zapelia sobre la biotecnología y el punto de vista de intrépidos agricultores, como Bartolo, en el que se mezclan una sabiduría tradicional con la inquietud de conocer los nuevos avances, han provocado en mí un debate interno sobre la forma de hacer, pero sobre todo de comunicar el trabajo que llevamos a cabo hoy en día los investigadores.

A Juan Antonio, más conocido como Cansino, porque aunque él no quiere ver su nombre escrito aquí, es la persona que más de cerca ha compartido esta tesis conmigo, y todo lo que ha conllevado. Gracias por creer en mí y en todo lo que estoy haciendo, por valorarme, por respetar mis sacrificios y encierros en el despacho durante tanto tiempo, mi agotamiento, pero sobre todo por hacerme sonreír cada día, y cada noche.

A toda mi familia, pero especialmente a mis tíos Salvador y Santi que han sido como unos padres para mí desde que me independicé en Coín hace ya más de 10 años, y con los que he compartido mis decepciones e ilusiones todo este tiempo. Aunque siempre he sido bastante autónoma, vuestro cariño familiar ha completado de lleno mi vida aquí, ¡gracias!

A mi hermano Carlos, que a pesar de ser más pequeño, es el hermano mayor de la investigación del cual tengo mucho que aprender. Gracias por tus consejos y advertencias, y por hacerme ver que todo es posible.

Para el final he dejado a las dos personas que sin duda alguna más han contribuido a este trabajo, mis padres Miguel y Juli. A ellos les debo el haber podido dedicarme a este proyecto. En primer lugar por su apoyo económico, siendo imprescindibles las subvenciones de la "Fundación Guzmán" hasta que llegaron las becas o contratos o cuando éstos escasean. Aún así, lo que considero más importante destacar es, que a pesar de la distancia han sabido apoyarme y sobre todo escucharme pacientemente en los momentos más difíciles, convenciéndome siempre de seguir hacia delante. Desde pequeña siempre me enseñaron que el esfuerzo y la lucha tienen siempre recompensa, aunque esta a veces se haga esperar. Son esos mismos valores los que me han estado recordando durante estos años. Además, yo he tenido la gran suerte de que ellos sí saben y comparten conmigo lo bonito y entusiasmante que podría ser la dedicación futura a la investigación y eso unido al orgullo que he visto en ellos al hablar de su hija, o el imaginármelos sentados el día de la defensa sonriendo y muy nerviosos, me ha impulsado a creer más en mí y a sacar la fuerza necesaria para terminar este proyecto, por eso ¡muchas gracias!

INDICE

ABREVIATURAS/ABBREVIATIONS	i
RESUMEN/SUMMARY	I
GENERAL INTRODUCTION	1
OBJECTIVES	13
CAPÍTULO I. EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA	17
Introducción	19
Inducción de cultivos embriogénicos	20
Mantenimiento y proliferación de cultivos embriogénicos	24
Desarrollo de embriones somáticos	25
Germinación de embriones somáticos	30
Material y métodos.....	33
Condiciones generales	33
Inducción de cultivos embriogénicos	35
Mantenimiento y proliferación de cultivos embriogénicos	36
Desarrollo de embriones somáticos blanco-opacos	37
Germinación de embriones somáticos	42
Resultados	45
Inducción de cultivos embriogénicos	45
Mantenimiento y proliferación de cultivos embriogénicos	46
Desarrollo de embriones somáticos blanco-opacos	48
Germinación de embriones somáticos	66
Discusión	69
Inducción de cultivos embriogénicos	69
Mantenimiento y proliferación de cultivos embriogénicos	74
Desarrollo de embriones somáticos blanco-opacos	75
Germinación de embriones somáticos	82
CAPÍTULO II. CARACTERIZACIÓN DE LÍNEAS EMBRIOGÉNICAS SE Y PEM	85
Introducción	87
Desarrollo del embrión somático	88
Expresión génica durante la embriogénesis somática	91
Papel de las proteínas en el proceso de embriogénesis somática	93

Regulación hormonal del proceso de embriogénesis somática	94
Factores acondicionadores que regulan el proceso de embriogénesis somática.....	95
Material y Métodos.....	99
Material vegetal y condiciones de cultivo	99
Evaluación de la capacidad morfogénica en callo de líneas tipo SE y PEM.....	100
Caracterización de cultivos tipo SE y PEM	101
Influencia de factores acondicionadores sobre el desarrollo de embriones somáticos blanco-opacos en líneas SE y PEM	102
Análisis proteómico.....	105
Cuantificación de los niveles endógenos de ácido indolacético.....	109
Resultados.....	111
Evaluación de la capacidad morfogénica en callo de líneas tipo SE y PEM.....	111
Caracterización de cultivos tipo SE y PEM	111
Influencia de factores acondicionadores sobre el desarrollo de embriones somáticos blanco-opacos en líneas SE y PEM	117
Análisis proteómico.....	121
Cuantificación de los niveles endógenos de ácido indolacético.....	124
Discusión.....	127
Caracterización de cultivos tipo SE y PEM	127
Influencia de factores acondicionadores sobre el desarrollo de embriones somáticos blanco-opacos en líneas SE y PEM	129
Análisis proteómico.....	131
Cuantificación de los niveles endógenos de ácido indolacético.....	139
CHAPTER 3. CRYOPRESERVATION.....	141
Introduction.....	143
Cryopreservation theory.....	144
Cryopreservation techniques	145
Artificial cryoprotection.....	153
Recovery.....	154
Physiological state of plant material	156
Genetic stability after cryopreservation.....	156
Applicability of cryopreservation to somatic embryogenesis systems	158
Cryopreservation of avocado.....	159
Material and Methods.....	161

Plant material and culture conditions.....	161
Cryopreservation experiments	161
Influence of cryopreservation on somatic embryogenesis and applicability of the cryopreservation protocol.....	167
Data taken and statistical analysis.....	167
Results	169
Cryopreservation experiments	169
Influence of cryopreservation on somatic embryogenesis and applicability of the cryopreservation protocol.....	189
Discussion.....	195
Cryopreservation experiments.....	195
Influence of cryopreservation on somatic embryogenesis and applicability of the cryopreservation protocol.....	202
CONCLUSIONES	205
REFERENCES	209

ABREVIATURAS/ABBREVIATIONS

ABA	Ácido abscísico/Absciscic acid
AFLP	Polimorfismos en la longitud de fragmentos amplificados/Amplified fragment length polymorphism
AG	Arabinogalactano/Arabinogalactan
AGP	Arabinogalactano proteínas/Arabinogalactan proteins
ANOVA	Análisis de la varianza/Analysis of variance
BAP	6-Bencilaminopurina/6-Benzylaminopurine
α GalY	Reactivo de Yariv α -D-galactosil/ α -D-galactosyl Yariv reagent
β GlcY	Reactivo de Yariv β -D-glucosil/ β -D-glucosyl Yariv reagent
BO	Blanco-opaco/White-opaque
B5m	Medio MS con los macronutrientes de Gamborg et al. (1968)/MS medium with the macronutrients of Gamborg et al. (1968)
B5m6a	Medio B5m gelificado con 6 g l ⁻¹ de agar/B5m medium gellified with 6 g l ⁻¹ agar
B5m10a	Medio B5m gelificado con 10 g l ⁻¹ de agar/B5m medium gellified with 10 g l ⁻¹ agar
B56A60saaJ	Medio B5m6a suplementado con 30 g l ⁻¹ de sacarosa y los aminoácidos de Jensen (1977)/B5m6a medium supplemented with sucrose at 30 g l ⁻¹ and Jensen (1977) aminoacids.
2,4-D	Ácido 2,4-diclorofenoxiacético/2,4-dichlorophenoxyacetic acid
2D-DIGE	Electroforesis bidimensional diferencial en gel/Two dimensional difference gel electrophoresis
DMSO	Dimetilsulfóxido/Dimethyl sulphoxide
ES	Embrión somático/Somatic embryo
ESBO	Embrión somático blanco-opaco/White-opaque somatic embryo
Est	Embrión somático traslúcido/Traslucent somatic embryo

FDA	Acetato de fluoresceína/Fluorescein diacetate
GST	Glutación-S-transferasa/Glutathione-S-transferase
HSP	Proteínas de choque térmico/Heat shock proteins
IAA	Ácido indolacético/Indolacetic acid
IPG	Gradiente de pH inmovilizado/Immobilized pH gradient
LEA	Abundantes en la embriogénesis tardía/Late embryogenic abundant
LN	Nitrógeno líquido/Liquid nitrogen
LS	Solución de carga/Loading solution
MA	Medio acondicionado/Conditioned medium
MS	Medio de Murashige y Skoog (1962)/Murashige and Skoog (1962) medium
MSP	Medio MS suplementado con 0,1 mg l ⁻¹ de picloram/MS medium supplemented with 0.1 mg l ⁻¹ picloram
MSPA	Medio MSP gelificado con 6 g l ⁻¹ de agar/MSP medium gellified with 6 g l ⁻¹ agar
M1	Medio de Skene y Barlass (1983)/Skene and Barlass (1983) medium
PCA	Análisis de componentes principales/Principal component analysis
PC1	Componente principal 1/Principal component 1
PC2	Componente principal 2/Principal component 2
PCBER	Fenilcumaran benzyleter reductasa/Phenylcoumaran benzylic ether reductase
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa/Polymerase chain reaction
PEG	Polietilenglicol/Polyethylene glycol
PEMs	Masas proembriogénicas/Proembryogenic masses
PGDH	3-fosfogliceratodeshidrogenasa/3-phosphoglycerate dehydrogenase
PF	Peso fresco/Fresh weight

PM	Material de proliferación/Proliferation material
PRR	Podredumbre radicular de <i>Phytophthora</i> / <i>Phytophthora</i> root rot
PS	Peso seco/Dry weight
RAPD	ADN polimórfico amplificado al azar/Random amplified polymorphic DNA
ROS	Especies reactivas de oxígeno/Reactive oxygen species
SF	Congelación lenta/Slow freezing
SSR	Secuencias simples de repetición/Simple sequence repeat
SOD	Superóxido dismutasa/Superoxide dismutase
TTC	Cloruro de trifenil tetrazolium/Triphenyltetrazolium chloride
TDZ	Tidiazurón/Thidiazuron
VCS	Volumen celular sedimentado/Sedimented cell volume
ZE	Embrión zigótico/Zygotic embryo

RESUMEN

El aguacate (*Persea americana* Mill.) es una especie arbórea perteneciente a la familia *Lauraceae*, que se distribuye principalmente en áreas tropicales y subtropicales. Es un árbol originario de América Central cuyo cultivo comercial se ha incrementado notablemente en los últimos años hasta llegar a establecerse en países como Estados Unidos, Brasil, Sudáfrica, Indonesia, Israel, Chile o España (Ray 2002). En nuestro país, su cultivo se da principalmente en las zonas costeras de Málaga y Granada, las cuales ofrecen un microclima adecuado, similar al clima tropical de su lugar de origen.

La importancia de esta especie se ha revalorizado en los últimos años gracias a la calidad nutritiva de sus frutos, que proporcionan un aporte equilibrado de proteínas, carbohidratos, minerales y vitaminas (Ray 2002). Estas circunstancias han provocado un aumento de la superficie cultivada de aguacate en Andalucía hasta alcanzar las 8.776 ha (CAP 2010), lo cual, combinado con una elevada producción y exportación de sus frutos, convierten a esta especie en un recurso agronómico de alto interés económico para el desarrollo de la región.

Sin embargo, la productividad de este cultivo se ve limitada por una serie de problemas que se han convertido en los objetivos de los programas de mejora que se desarrollan en la actualidad en esta especie.

El principal factor limitante a nivel mundial en el cultivo del aguacate es la enfermedad causada por el patógeno *Phytophthora cinnamomi*, la cual afecta a la raíz y provoca gravísimas pérdidas económicas en el sector del aguacate en todo el mundo (Litz et al. 2005). La utilización de patrones resistentes es considerada la estrategia más adecuada para controlar esta y otras enfermedades. De hecho, en la actualidad, se vienen desarrollando programas de mejora destinados a la obtención de patrones tolerantes a *Phytophthora cinnamomi* en Sudáfrica (Kremer-Köhne y Mukhumo 2003), Estados Unidos (Whiley et al. 2007), Australia (Smith et al. 2011) y México (Andrade-Hoyos et al. 2011).

Sin embargo, cuando la mejora tradicional se aplica a especies leñosas 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. Una solución alternativa se encuentra en el uso de herramientas biotecnológicas como complemento a la mejora tradicional. Estos métodos pueden ser utilizados para ampliar la base genética (a través de la transformación genética, la

mutagénesis *in vitro* o la hibridación somática), la propagación clonal masiva de plantas en un periodo de tiempo muy corto o la crioconservación de germoplasma de valor (Sánchez-Romero et al. 2006). La transformación genética de cultivos embriogénicos de aguacate con genes relacionados con la tolerancia a *Phytophthora cinnamomi*, tales como el gen de la proteína antifúngica (Raharjo et al. 2008) o genes de glucanasas y quitinasas (Gomez-Lim y Litz 2004), y genes involucrados en la maduración del fruto, como el de la SAM hidrolasa (Efendi 2003), son algunas de las estrategias biotecnológicas en las que se está trabajando en la actualidad.

Sin embargo, la aplicación de dichas técnicas requiere la disponibilidad de un protocolo eficiente de regeneración *in vitro*. En especies leñosas, como el aguacate, el método de regeneración utilizado normalmente es la embriogénesis somática (Gupta et al. 1993).

La embriogénesis somática es el proceso por el cual células somáticas se desarrollan a través de estados de la embriogenia para dar lugar a plantas completas sin fusión gamética. Este proceso consta de varias fases: inducción de cultivos embriogénicos, mantenimiento y proliferación de los mismos, maduración de embriones somáticos, germinación y aclimatación de las plantas obtenidas. Para que cada una de estas etapas transcurra adecuadamente y el proceso final resulte con éxito, determinados tratamientos químicos y físicos deben ser aplicados en el momento adecuado (von Arnold et al. 2005).

En aguacate, la embriogénesis somática fue descrita por primera vez por Pliego-Alfaro (1981), utilizando embriones zigóticos inmaduros como material de partida. La inducción de cultivos embriogénicos a partir de este tipo de explanto tiene lugar sin problemas y con una tasa aceptable. Una vez establecidos, los cultivos embriogénicos de aguacate son bastante heterogéneos, estando compuestos por estructuras nodulares, masas proembriogénicas y embriones somáticos en diferentes estadios de desarrollo. Junto con el material de características claramente embriogénicas, también se observa en la mayoría de los genotipos, callo gris y amorfo, no embriogénico. Los cultivos embriogénicos proliferan sin dificultad en el mismo medio y condiciones de cultivo utilizadas para la fase de inducción. Sin embargo, y a pesar de la buena calidad de los cultivos, la conversión de los embriones somáticos en plantas presenta muchas dificultades y las tasas de germinación que se obtienen son bajas (Litz et al. 2005; Márquez-Martín 2007). Este hecho, común en muchos sistemas de embriogénesis somática (Janick 1993), se ha atribuido a dos causas fundamentales: pobre calidad de los embriones somáticos formados y maduración

deficiente (Ammirato 1987). La fase de maduración constituye, por tanto, al igual que en otras especies, uno de los pasos limitantes en el proceso de embriogénesis somática de aguacate.

La maduración se caracteriza por la acumulación de sustancias de reserva. Esta acumulación provoca que los embriones somáticos translúcidos se transformen en blanco-opacos (Cailloux et al. 1996). Este cambio morfológico ha sido utilizado en diferentes especies, incluida el aguacate (Márquez-Martín et al. 2011; Márquez-Martín et al. en prensa; Perán-Quesada et al. 2004; Witjaksono y Litz 1999b), como indicador de la eficiencia de los distintos tratamientos aplicados para favorecer el desarrollo y maduración de embriones somáticos.

Existen numerosos trabajos enfocados a mejorar la maduración de embriones somáticos en diversas especies y que se han centrado en el estudio de diversos factores tales como el papel del ácido abscísico como inductor de la expresión de genes que regulan la acumulación de sustancias de reserva durante la embriogénesis somática (Attree et al. 1995; Obendorf y Wettlaufer 1984; Xu et al. 1990); los suplementos de nitrógeno, como requerimiento indispensable para la histodiferenciación y desarrollo del embrión (Merkle et al. 1995); los suplementos de carbohidratos, como la sacarosa, utilizados para mejorar la maduración de embriones somáticos (Perán-Quesada et al. 2004), y el uso de agentes osmóticos, como el polietilenglicol, el manitol o el sorbitol, con efectos positivos sobre la maduración de embriones somáticos (Misra et al. 1993). En este sentido, las relaciones hídricas entre el embrión y el medio de cultivo han demostrado ejercer un papel fundamental en el proceso (Adams y Rinne 1980), con una relación inversamente proporcional entre la disponibilidad de agua en el medio de cultivo y el número de embriones somáticos blanco-opacos formados (Márquez-Martín et al. 2011; Witjaksono y Litz 1999b). Experimentos sobre la influencia del ambiente gaseoso durante la maduración de embriones somáticos indican que bajas concentraciones de oxígeno y etileno aumentan el número de embriones formados y disminuyen los porcentajes de germinación precoz (Carman 1988). Otros estudios sobre las condiciones ambientales indican que tanto la intensidad de la luz, como la longitud de onda, afectan al número de embriones somáticos maduros y al contenido de ácido abscísico de los mismos (Tremblay y Tremblay 1991).

En aguacate se han realizado múltiples experimentos de maduración, siendo el tipo de agente gelificante y la concentración del mismo los factores que de manera más positiva han influido en el proceso (Márquez-Martín et al. 2011). La inclusión de una fase de cultivo

en suspensión, previa al desarrollo de embriones somáticos, también tiene un efecto significativo sobre la posterior capacidad de los cultivos para dar lugar a embriones somáticos maduros (Márquez-Martín et al. en prensa).

En algunas especies, los cultivos embriogénicos han sido clasificados en distintos tipos en base a sus características morfológicas y a una capacidad morfogénica diferencial. Líneas celulares con estas características han sido utilizadas como modelo para estudiar el proceso de embriogénesis somática en especies como *Picea abies* (Egertsdotter y von Arnold 1993; Find et al. 1998a; Jalonen y von Arnold 1991), *Pinus caribaea* (Laine y David 1990), *Carya illinoensis* (Burns y Wetzstein 1997) o *Gentiana pannonica* (Mikula et al. 2002).

En aguacate, los cultivos embriogénicos han sido divididos en dos tipos de acuerdo con su morfología en presencia de auxina: tipo SE, caracterizados por la presencia de embriones somáticos en diferentes estadios de desarrollo y baja frecuencia de masas proembriogénicas, y tipo PEM, compuestos mayoritariamente por masas proembriogénicas con escasa frecuencia de embriones somáticos y proembriones (Witjaksono y Litz 1999a). Además, ambos tipos de cultivo muestran una capacidad morfogénica diferencial; mientras las líneas SE presentan tasas elevadas de producción de embriones somáticos en estadios avanzados de desarrollo, las líneas PEM raramente producen embriones maduros (Márquez-Martín et al. en prensa). Por consiguiente, dichos cultivos podrían ser utilizados como modelo para estudiar los factores que intervienen en la formación del embrión somático en esta especie.

Una vez establecidos, los cultivos embriogénicos requieren ser mantenidos a través de subcultivos periódicos. Sin embargo, el mantenimiento *in vitro* durante periodos de tiempo prolongados puede provocar alteraciones genéticas y la pérdida del potencial embriogénico (Bhatti et al. 1997), limitando así el proceso. Los últimos avances en conservación de órganos y tejidos vegetales en nitrógeno líquido son una excelente alternativa para el mantenimiento a largo plazo de cultivos embriogénicos (Lambardi et al. 2008). La utilización de técnicas basadas tanto en la congelación lenta como en la vitrificación, es una realidad en cultivos embriogénicos de distintas especies (Engelmann 2004; Panis y Lambardi 2005).

El objetivo general de esta tesis doctoral ha sido optimizar la regeneración de aguacate vía embriogénesis somática. Este objetivo se ha dividido en los siguientes objetivos específicos: 1) optimizar el protocolo de embriogénesis somática en aguacate estudiando el efecto de diferentes factores de cultivo sobre las distintas fases del proceso, 2)

investigar la regulación de la capacidad morfogénica en aguacate a través de la caracterización de los dos tipos de cultivo descritos en esta especie y 3) poner a punto un protocolo de crioconservación que permita la preservación a largo plazo de los cultivos embriogénicos.

Para abordar el primer objetivo, se llevaron a cabo experimentos en las distintas etapas en las que se divide el proceso de embriogénesis somática, prestando especial atención a la fase de desarrollo y maduración de embriones somáticos, paso fundamental para aumentar la tasa de conversión a plantas, y principal cuello de botella en este sistema de regeneración.

En la fase de inducción se evaluó el uso de distintos reguladores de crecimiento y de la intensidad de la luz. El efecto de la luz fue también evaluado durante la fase de proliferación de los cultivos. Dentro de la fase de desarrollo de embriones somáticos, se estudió la influencia de factores tales como la inclusión de una fase de predesarrollo, la adición al medio de cultivo de sacarosa, ácido abscísico o los aminoácidos de Jensen, la densidad del inóculo inicial y el tamaño del mismo, la intensidad lumínica, el recipiente de cultivo y el material subcultivado. Teniendo en cuenta que el objetivo de la maduración es conseguir embriones somáticos bien formados y con los productos de reserva necesarios para poder germinar y dar lugar a plantas, la efectividad de los distintos tratamientos se evaluó determinando tanto la producción de embriones somáticos maduros como la posterior capacidad de germinación de los mismos. En experimentos realizados directamente sobre la fase de germinación, se estudió la capacidad de germinación de distintos tipos de embriones así como la influencia del agente gelificante.

Los resultados obtenidos pusieron de manifiesto un aumento en la tasa de inducción de cultivos embriogénicos utilizando ácido 2,4-diclorofenoxiacético y tiazurón. También se comprobó que la intensidad lumínica ejercía una importante influencia sobre la inducción de la embriogénesis somática. Este proceso se vio significativamente favorecido en condiciones de oscuridad mientras que disminuía drásticamente a $40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Una respuesta semejante se observó en la fase de proliferación, donde los mejores resultados también se obtuvieron en oscuridad.

La inclusión de una fase de predesarrollo no mejoró la producción de embriones somáticos blanco-opacos. El inóculo utilizado para iniciar la fase de maduración tuvo una influencia significativa en el rendimiento del proceso, obteniéndose los valores de producción más elevados utilizando 0,100 g de la fracción más pequeña (de tamaño menor

o igual a 2 mm). No obstante, densidades de cultivo más bajas (0,025-0,050 g) favorecieron ligeramente el desarrollo de embriones somáticos de alta calidad (blanco-opacos e iguales o mayores de 4 mm). La tasa de germinación fue significativamente más elevada en embriones formados a partir de la fracción más pequeña y se vio ligeramente favorecida cuando la fase de maduración se inició con 0,050 g de inóculo. El recipiente de cultivo también influyó significativamente en la maduración de embriones somáticos, obteniéndose valores de producción significativamente más altos cuando se utilizaron frascos. Sin embargo, no se observaron diferencias en la germinación de los embriones formados en los distintos recipientes. Finalmente, se evaluó el efecto de la luz, quedando patente que las condiciones de oscuridad eran las idóneas para llevar a cabo el desarrollo y maduración de embriones somáticos de aguacate.

En lo que se refiere a la fase de germinación, el tipo de embrión utilizado demostró ser un factor determinante, germinando sólo los embriones somáticos blanco-opacos y con un tamaño mínimo de 4 mm. El uso de agar en vez de gelrite supuso un aumento de la germinación, aunque el efecto producido no fue significativo.

De acuerdo con los resultados obtenidos, el rendimiento de la embriogénesis somática podría ser mejorado en aguacate a través de la incorporación de algunos aspectos que han demostrado tener una influencia significativa en las distintas fases del proceso. En la inducción de cultivos embriogénicos de acuerdo con el protocolo de Pliego-Alfaro y Murashige (1988), la auxina picloram podría ser sustituida por una combinación de ácido 2,4-diclorofenoxiacético y tidiazurón para aumentar la tasa de inicio. La alta efectividad del ácido 2,4-diclorofenoxiacético ha sido demostrada en numerosas especies (Gaj 2004). Esta eficiencia puede deberse a la doble acción que ejerce como auxina y agente estresante, activando la ruta embriogénica en plantas (Feher et al. 2003). La fase de desarrollo y maduración de embriones somáticos es aconsejable iniciarla utilizando como inóculo la fracción menor de 2 mm y una densidad de cultivo de 0,050 g, para favorecer el desarrollo de embriones somáticos de alta calidad. La efectividad de la sincronización de cultivos embriogénicos y posterior cultivo selectivo de determinados tamaños ha sido comprobada en diversas especies (Ibaraki y Kurata 2001; Kurata y Fuyata 1992). La densidad de cultivo idónea para la formación de embriones somáticos depende del balance en el medio de cultivo entre sustancias estimuladoras e inhibidoras, excretadas por los cultivos, más que de una limitación física o nutricional (Higashi et al. 1998; Kobayashi et al. 1999). Esta fase debe realizarse en oscuridad y utilizando frascos como recipiente de cultivo. El recipiente

de cultivo determina el microambiente gaseoso, que se considera un factor importante en la formación de embriones somáticos (Bomal y Tremblay 1999). En relación a la fase de germinación, se ha comprobado que ésta debe iniciarse con embriones somáticos blanco-opacos y con un tamaño mínimo de 4 mm. La utilización de agar como agente gelificante también supone una mejora en la germinación de los embriones somáticos de aguacate. De acuerdo con Beruto et al. (1999), este efecto podría deberse a que distintos agentes gelificantes provocan diferencias en las propiedades fisicoquímicas de los medios de cultivo, dando lugar a cambios en la disponibilidad de agua y de nutrientes. Al igual que en otras especies como *Quercus robur* (Martínez et al. 2008; Sánchez et al. 2003), *Picea abies* (Jalonen y von Arnold 1991), soja (Moon y Hildebrand 2003) o *Juniperus communis* (Helmersson y von Arnold 2009), el genotipo tuvo una influencia determinante en la conversión a plantas.

Para llevar a cabo el segundo objetivo, se seleccionaron cuatro líneas embriogénicas representativas de los dos tipos de cultivo que se distinguen en aguacate y se caracterizaron utilizando distintas aproximaciones. En primer lugar, se llevó a cabo un estudio de su composición estructural y su cinética de crecimiento a lo largo de un ciclo de cultivo en medio de mantenimiento. Al mismo tiempo, se realizaron una serie de experimentos encaminados a comprobar si la baja capacidad morfogénica característica de las líneas PEM podía ser aumentada a través de la adición de distintas sustancias cuyo papel estimulador de la embriogénesis somática ha sido comprobado en otras especies (Ben-Amar et al. 2007). En un primer experimento se utilizó medio acondicionado obtenido de suspensiones altamente morfogénicas (líneas SE) para el establecimiento de las suspensiones con las que se inicia el desarrollo de embriones somáticos. Posteriormente se realizó un experimento en el que se añadió arabinogalactano de madera de alerce en dos etapas distintas del proceso: la fase de suspensiones y la de desarrollo de embriones somáticos. Además, se evaluó el efecto del reactivo de Yariv β -D-glucosil, compuesto que se une de forma específica a las arabinogalactano proteínas inhibiendo su actividad. Paralelamente, se realizó un estudio proteómico con el objetivo de comparar los patrones de proteínas de ambos tipos de cultivo e identificar proteínas asociadas a la capacidad de maduración. En último lugar, se cuantificaron los niveles endógenos de ácido indolacético.

Los resultados obtenidos pusieron de manifiesto diferencias significativas en la composición estructural y el patrón de proliferación de ambos tipos de cultivo. Como proponen Jalonen y von Arnold (1991) en *Picea abies*, la diferente apariencia observada en

cultivos embriogénicos de aguacate podría reflejar diferencias en el estado de desarrollo en el que las líneas se mantienen en proliferación.

El uso de medio acondicionado al 50% en la fase de suspensiones embriogénicas mejoró el posterior desarrollo de embriones somáticos en las líneas SE pero no tuvo una influencia significativa en las PEM. La adición de arabinogalactano de madera de alerce a las suspensiones embriogénicas provocó un descenso significativo en la posterior capacidad de los cultivos para formar embriones somáticos maduros, tanto en las líneas SE como en las PEM. Sin embargo, la adición de este compuesto en la fase de maduración, no tuvo efecto alguno. Aunque es un hecho comprobado que las arabinogalactano proteínas juegan un papel regulador en la embriogénesis somática de diversas especies (Samaj et al. 2008), la gran variabilidad y carácter específico de las mismas conlleva que, tal y como demostraron Toonen et al. (1997) en zanahoria, tipos distintos de arabinogalactano proteínas puedan ser capaces tanto de incrementar como de disminuir el potencial embriogénico de los cultivos.

La adición del reactivo de Yariv β -D-glucosil al medio de cultivo de suspensiones embriogénicas suplementado con medio acondicionado, provocó un descenso de la proliferación de los cultivos durante la fase de desarrollo, así como una disminución en la producción de embriones somáticos blanco-opacos. Teniendo en cuenta que este reactivo provoca una inhibición específica de las arabinogalactano proteínas (Guan y Nothnagel 2004), su efecto podría ser atribuido a una perturbación de las mismas, poniendo así de manifiesto la participación en ambos procesos de este tipo de proteínas.

En el estudio proteómico se detectaron numerosas proteínas (1790). El análisis de componentes principales puso de manifiesto la existencia de diferencias significativas entre los proteomas de los dos tipos de cultivo, encontrándose múltiples proteínas con una abundancia significativamente diferencial en ambos tipos de líneas. Tras la identificación de las proteínas se puede establecer que la principal característica que distingue a las líneas SE es la presencia de numerosas proteínas relacionadas con la protección frente al estrés y de una forma más concreta al estrés oxidativo. El papel inductor de determinados tipos de estrés en la embriogénesis somática es un hecho contrastado (Feher et al. 2003). Al igual que ocurre en aguacate, en *Medicago truncatula* también se comprobó que una gran parte de proteínas relacionadas con la respuesta al estrés se encontraban diferencialmente expresadas en líneas con distinta capacidad morfogénica (Imin et al. 2005).

La cuantificación de los niveles endógenos de ácido indolacético reveló que las líneas SE contenían niveles más elevados de esta auxina que las tipo PEM. No obstante, no pudo

establecerse una correlación entre el contenido endógeno de esta hormona y la capacidad de los cultivos para formar embriones somáticos maduros. Por lo tanto, en cultivos embriogénicos de aguacate el contenido endógeno de ácido indolacético no podría ser utilizado como marcador de una mayor capacidad morfogénica.

El tercer objetivo de esta tesis doctoral, fue el establecimiento de un protocolo de crioconservación para cultivos embriogénicos de aguacate.

Hasta la fecha solo se han publicado dos trabajos sobre crioconservación de cultivos embriogénicos de aguacate (Efendi 2003; Efendi y Litz 2003). En ellos se abordó este objetivo utilizando dos protocolos distintos, uno basado en el enfriamiento lento y otro en la vitrificación. Aunque los resultados demuestran la recuperación de cultivos embriogénicos, el genotipo tuvo un efecto drástico en la supervivencia del material crioconservado. De esta forma, ninguno de los protocolos aplicados permitió la recuperación de todas las líneas embriogénicas testadas y en algunas de ellas el porcentaje de supervivencia estuvo muy por debajo del mínimo recomendado para el mantenimiento a largo plazo de germoplasma (Uchendu and Reed 2008). Esto plantea la necesidad de poner a punto un protocolo de crioconservación que pueda ser aplicado de modo general a cultivos embriogénicos de esta especie.

Con este objetivo, en primer lugar se realizó una comparación de tres protocolos de crioconservación aplicados con éxito a cultivos embriogénicos de otras especies: un método de congelación lenta (Panis et al. 1990), el protocolo basado en la vitrificación de Sakai et al. (1990) y el de vitrificación en gota sobre tiras de aluminio (Panis et al. 2005). Para la realización de este experimento se utilizaron dos líneas embriogénicas, representativas de los dos tipos de cultivos que se distinguen en aguacate (SE y PEM). Como resultado de este estudio se eligió el método de vitrificación en gota como el más adecuado para llevar a cabo la crioconservación de cultivos embriogénicos de aguacate. Dicho método proporcionó valores de recuperación muy elevados en ambas líneas embriogénicas (77,78-100%). La eficacia de la técnica de vitrificación en gota (Panis et al. 2005) está basada en un enfriamiento y descongelación muy rápidos, que aumentan la probabilidad de conseguir un estado vitrificado durante la congelación y evitan la desvitrificación durante la descongelación. Una vez seleccionado dicho método, se comprobó que 60 min era el periodo de incubación en PVS2 adecuado, ya que fue en el que se observó una mayor proliferación de los cultivos tras la congelación. La selección de un periodo adecuado de incubación en PVS2 es imprescindible en los protocolos de vitrificación (Sakai y Engelmann

2007). Su importancia radica en encontrar el balance que permita una deshidratación adecuada de los explantos, imprescindible para sobrevivir a la congelación, sin que la toxicidad de las soluciones repercuta negativamente en los mismos (Panis et al. 2005).

Una vez establecidas las variables básicas del protocolo, en una segunda fase se estudió la influencia de otros factores como el tipo de explanto, el método de cultivo (modo en el que se mantienen los cultivos antes de ser criopreservados (en medio sólido o líquido)), la fase del ciclo de cultivo en la que se seleccionan los explantos o el precultivo en altas concentraciones de sacarosa.

Los resultados obtenidos indicaron que la combinación de callo y embriones somáticos de pequeño tamaño era el explanto más adecuado para la criopreservación. En *Musa* también se ha demostrado que los explantos pequeños sobreviven mejor a la congelación. Esto puede deberse a una mayor eficiencia en el intercambio de calor que se produce durante la congelación y descongelación, o a una mayor presencia de células hidratadas y vacuoladas en los explantos grandes, que aumenta el riesgo de formación de cristales de hielo (Panis et al. 2005). También se observó una interacción entre la fase de crecimiento del material utilizado como explanto y el medio de procedencia (sólido o líquido). Así, cuando el cultivo era en medio líquido los mejores resultados se obtuvieron con material procedente de la fase exponencial, mientras que cuando el cultivo se había realizado en medio sólido los valores de supervivencia más altos se obtuvieron con material procedente de la fase estacionaria. Esta influencia del método de cultivo y de la fase de crecimiento de los explantos seleccionados para la criopreservación ha sido demostrada en otras especies. De forma general se asume que los cultivos procedentes de medio líquido, al presentar una mayor homogeneidad, sobreviven mejor a la congelación (Heine-Dobbernack et al. 2008). En relación a la fase de crecimiento, los trabajos realizados en medio líquido normalmente seleccionan cultivos en la fase exponencial (Levitt 1980; Luo y Widholm 1997; Moran et al. 1999; Panis et al. 1990; Sakai y Larcher 1987). Según nuestra información, este es el único trabajo en el que se evalúa el efecto de la fase de crecimiento en la criopreservación utilizando medio sólido. El precultivo con sacarosa no tuvo un efecto significativo sobre la supervivencia o recuperación de los cultivos de aguacate. Sin embargo, provocó un adelanto de la respuesta inicial después de la congelación y un aumento de la tasa de proliferación de los cultivos. Los mejores resultados se obtuvieron en cultivos tratados con sacarosa durante 7 ó 14 días, ya que tanto la tasa de recuperación embriogénica, como la proliferación tras la congelación, alcanzaron los valores más

elevados. El papel de la sacarosa se basa, entre otros, en su capacidad para mantener la integridad de las membranas (Crowe et al. 1984) y en permitir una mayor reducción del contenido hídrico celular (Panis et al. 2005).

Para comprobar la aplicabilidad del método puesto a punto, se evaluó el efecto del mismo sobre las distintas fases del proceso de embriogénesis somática de aguacate. Para ello, cinco meses después de la descongelación, se comparó el comportamiento de cultivos crioconservados y cultivos control, no congelados, en las fases de proliferación, desarrollo de embriones somáticos y germinación.

A pesar de la similitud morfológica entre cultivos crioconservados y controles, la proliferación de cultivos embriogénicos se vio afectada de forma negativa por la crioconservación, obteniéndose valores de incremento de peso significativamente más bajos en los cultivos que habían sido previamente congelados. En ambos casos se desarrollaron embriones somáticos blanco-opacos, pero los embriones iguales o mayores de 4 mm fueron menos abundantes en cultivos crioconservados. Sin embargo, la germinación se vio ligeramente favorecida en aquellos embriones que procedían de cultivos crioconservados, con un 13,63% de germinación frente a un 5,88% en embriones procedentes de cultivos control. Aunque en la mayoría de los estudios que evalúan el efecto de la crioconservación en la capacidad embriogénica de los cultivos se observó un efecto beneficioso de la misma (Aguilar et al. 1993; Mikula et al. 2011; Wang et al. 2002b; Winkelmann et al. 2004), probablemente debido a la selección preferencial de células embriogénicas durante la congelación (Mathur et al. 2003; Winkelmann et al. 2004); hay trabajos en los que, como ocurre en nuestro caso, el efecto observado fue negativo (Lardet et al. 2007; Martínez et al. 2003). Tal y como señalaron Lardet et al. (2007) y Salaj et al. (2011b), la proliferación y recuperación de la capacidad embriogénica de los cultivos crioconservados podría mejorarse aumentando el tiempo de proliferación en medio de mantenimiento después de la congelación.

Finalmente, se comprobó la aplicabilidad del método puesto a punto a un número elevado de líneas embriogénicas, pertenecientes a dos cultivares distintos y entre las que se incluían cultivos tipo SE y tipo PEM. El protocolo de crioconservación utilizado permitió la recuperación embriogénica en todas las líneas testadas, con valores que oscilaban entre el 80 y el 100%. Aunque con diferencias entre líneas, en todos los casos los cultivos mostraron buen aspecto y tasas de crecimiento aceptables después de la congelación.

SUMMARY

The avocado (*Persea americana* Mill.), a tree species belonging to the family *Lauraceae*, is mainly distributed in tropical and subtropical areas. This species, originated in Central America, has progressively gained significant importance in international trade and nowadays, the avocado is grown in several countries such as United States, Brazil, South Africa, Indonesia, Israel, Chile and Spain (Ray 2002). In our country, this fruit crop is cultivated in the coast of Malaga and Granada provinces, areas with a suitable microclimate, similar to the tropical climate of its place of origin.

The worldwide recognition of this species has increased during last years due to the excellent nutritional value of its fruits, which provide a well balanced supply of proteins, carbohydrates, minerals and vitamins (Ray 2002). These circumstances have led to an increase of avocado orchards in Andalusia, reaching at this moment an area of 8,776 ha (CAP 2010). This increase, combined with a high production and export value of their fruits, has converted this crop into an economically important resource, suitable for the development of this region.

However, the productivity of this crop is limited by several factors, which are the current objectives of different breeding programmes.

The main limiting factor for avocado production is the disease caused by the pathogen *Phytophthora cinnamomi* affecting the root and causing drastic economic losses in most avocado-producing countries (Litz et al. 2005). The utilization of resistant rootstocks has been considered as the most effective strategy against this and other root diseases. In fact, nowadays, extensive breeding programmes are focused on finding resistant rootstocks to *Phytophthora cinnamomi* in South Africa (Kremer-Köhne and Mukhumo 2003), United States (Whiley et al. 2007), Australia (Smith et al. 2011) and Mexico (Andrade-Hoyos et al. 2011).

Nevertheless, when conventional breeding techniques are applied to woody species, several additional limitations, such as their long juvenile period or poor fruit setting, provoke that specific gene transfer and its subsequent field evaluation will last several years, delaying the obtainment of useful results. Thus, the use of biotechnological tools, as a complementary technology to traditional breeding programmes, provides promising alternatives to improve breeding and management. These methods can allow the widening of the genetic basis (by genetic transformation, *in vitro* mutagenesis or somatic hybridization), mass clonal propagation within a short period of time or cryopreservation

of valuable germplasm (Sánchez-Romero et al. 2006). Genetic transformation of avocado embryogenic cultures with genes encoding the antifungal protein (Raharjo et al. 2008), glucanases and chitinases (Gomez-Lim and Litz 2004) or genes involved in fruit ripening as *SAMase* (Efendi 2003), are some of the biotechnological strategies currently used.

Nevertheless, the application of these techniques requires the availability of an efficient *in vitro* regeneration system. In woody species, such as the avocado, somatic embryogenesis is the regeneration method most commonly used (Gupta et al. 1993).

Somatic embryogenesis is the developmental process by which somatic cells generate embryogenic cells which result in the formation of somatic embryos capable of regenerating plants, without gametic fusion. This developmental pathway includes different phases: induction of embryogenic cultures, proliferation and maintenance of cultures, maturation of somatic embryos, germination and acclimation of plants. To execute this pathway efficiently, a number of critical physical and chemical treatments need to be applied with proper timing (von Arnold et al. 2005).

Avocado somatic embryogenesis was firstly described by Pliego-Alfaro (1981), using immature zygotic embryos as initial explant. Using this explant, induction of somatic embryogenesis takes place without limitations and at an acceptable rate. Once embryogenic cultures are established, they are very heterogeneous, being composed of nodular structures, proembryogenic masses and somatic embryos at different developmental stages. Besides the embryogenic tissue, grey amorphous and non-embryogenic tissue is also observed for most avocado genotypes. During the proliferation phase, embryogenic cultures are maintained in the same culture medium and conditions of the induction phase. However, and despite the high quality of the embryogenic cultures obtained, the germination rates of the somatic embryos are low and the final conversion into plantlets is a difficult task (Litz et al. 2005; Márquez-Martín 2007). This fact is of common occurrence in somatic embryogenesis (Janick 1993) and it has been mainly attributed to the poor quality and incomplete maturation of somatic embryos (Ammirato 1987). Thus, similarly to what has been observed in other species, the maturation phase is one of the most limiting steps in the somatic embryogenesis pathway for avocado.

Maturation is characterized by an increase of the storage product content. This accumulation causes the somatic embryos to change from translucent to white-opaque in colour (Cailloux et al. 1996). This morphological change has been used in different species, including avocado (Márquez-Martín et al. 2011; Márquez-Martín et al. in press; Perán-

Quesada et al. 2004; Witjaksono and Litz 1999b), as a marker to check the efficiency of different treatments applied to improve the development and maturation of somatic embryos.

The improvement of somatic embryo maturation has been achieved through the investigation of different factors such as abscisic acid, as inductor of genes involved in the storage of reserve substances (Attree et al. 1995; Obendorf and Wettlaufer 1984; Xu et al. 1990); nitrogen supplements, required for the histodifferentiation and maturation phases (Merkle et al. 1995); carbohydrate supplements such as sucrose, to improve maturation (Perán-Quesada et al. 2004), and osmotic agents, such as polyethyleneglycol, mannitol or sorbitol, also with beneficial effects on embryo maturation (Misra et al. 1993). In this sense, water relations between the somatic embryo and the culture medium have demonstrated to play a key role in this process (Adams and Rinne 1980), exhibiting a negative correlation between water availability from the culture medium and the number of white-opaque somatic embryos obtained (Márquez-Martín et al. 2011; Witjaksono y Litz 1999b). Studies conducted to evaluate the influence of the gaseous environment during maturation of somatic embryos revealed that low oxygen and ethylene levels increase the number of developing somatic embryos and decrease precocious germination (Carman 1988). Other studies on culture environment showed that both light quality and quantity affected the number of mature embryos, as well as their endogenous abscisic acid content (Tremblay and Tremblay 1991).

In avocado, multiple maturation experiments have been conducted, and the type and concentration of gelling agent proved to be essential factors with great influence on the process (Márquez-Martín et al. 2011). The inclusion of a previous growth phase of embryogenic cells as suspension cultures had also a significant effect on the subsequent capacity of the cultures to develop white-opaque somatic embryos (Márquez-Martín et al. in press).

In some species, embryogenic cultures have been classified in different types based on their morphological traits and morphogenic capacity. Cell lines exhibiting these attributes have been utilized as a model to study the somatic embryogenesis process in different species such as *Picea abies* (Egertsdotter and von Arnold 1993; Find et al. 1998a; Jalonen and von Arnold 1991), *Pinus caribaea* (Laine and David 1990), *Carya illinoensis* (Burns and Wetzstein 1997) or *Gentiana pannonica* (Mikula et al. 2002).

In avocado, two distinct embryogenic cultures types were recognized based on their morphological characteristics in the presence of auxin: SE-type, characterized by the presence of somatic embryos at different developmental stages and low frequency production of proembryonic masses, and PEM-type, mainly composed by proembryogenic masses with few somatic embryos and proembryos (Witjaksono and Litz 1999a). In addition, these types of cultures exhibit different morphogenic capacity; SE-type lines show high production of white-opaque embryos at advanced developmental stages, while in PEM cell lines mature embryos are rarely found (Márquez-Martín et al. in press). Hence, these cultures can be used as a model to investigate which factors influence the development of somatic embryos in this species.

Once embryogenic cultures are established, they require subculturing at regular intervals. However, loss of embryogenic potential and occurrence of genetic alterations in embryogenic lines due to long-term *in vitro* maintenance have frequently been reported (Bhatti et al. 1997). In this sense, recent advances in the cryostorage of organs and plant tissues in liquid nitrogen are an excellent alternative to long-term storage of embryogenic cultures (Lambardi et al. 2008). The utilization of techniques based either on slow cooling or vitrification has been shown to be useful for embryogenic cultures from various plant species (Engelmann 2004; Panis and Lambardi 2005).

The main objective of this thesis has been to optimize the regeneration of avocado by somatic embryogenesis. This objective has been divided into the following specific objectives: 1) to optimize the somatic embryogenesis protocol for avocado by studying the effect of several culture factors over different phases of the pathway, 2) to investigate the regulation of the morphogenic capacity in avocado through the characterization of the two types of embryogenic cultures described in this species and 3) to develop a cryopreservation protocol for the long-term storage of avocado embryogenic cultures.

To address the first objective, experiments were carried out at each stage of the embryogenic process, paying special attention to improve the development and maturation of avocado somatic embryos. This phase is a pivotal step to increase the conversion rate of somatic embryos into plantlets, which is the main bottleneck of this regeneration system.

During the induction phase, the effect of different growth regulators and light intensity were evaluated. The influence of light was also assessed at the proliferation phase. During the maturation phase, the influence of factors such as the inclusion of a predevelopmental phase, the use of culture medium supplemented with sucrose, abscisic

acid, or the Jensen's aminoacids, the density and size of the inoculum, the light intensity, the culture vessel and the type of subcultured material, were evaluated. Considering that the aim of the maturation phase is to achieve well formed somatic embryos containing the storage substances needed to successfully germinate, the effectiveness of the different maturation treatments was evaluated by determining both the production of mature somatic embryos and their subsequent germination capacity. In experiments conducted during the germination phase, the germination capacity of different types of somatic embryos and the influence of the gelling agent were also investigated.

The results obtained in this research revealed a higher efficiency of the combined use of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and thidiazuron in the initiation of avocado embryogenic cultures. The influence of the light intensity on the induction phase was also confirmed. This process was positively influenced in a dark environment while it was strongly decreased under $40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Similarly, during the proliferation phase, the best results were obtained under darkness.

The inclusion of a predevelopmental phase did not improve the maturation of somatic embryos. The inoculum used to initiate the maturation phase had a significant influence on the output of the process, higher production rates being obtained when using 0.100 g of the smallest fraction (equal to or smaller than 2 mm). Nevertheless, lower culture densities (0.025-0.050 g) slightly enhanced the development of high quality somatic embryos (white-opaque and equal or larger than 4 mm). Similarly, the germination capacity was significantly higher in somatic embryos obtained from the smallest fraction and it was slightly higher when maturation was initiated at a density of 0.050 g. The culture vessel also influenced this process, being mature embryo production significantly higher when flasks were used. However, the germination capacity of the somatic embryos obtained was not influenced by this parameter. Finally, the influence of light was also evaluated demonstrating that darkness was more adequate for development and maturation of avocado somatic embryos.

Regarding the germination phase, the type of embryo used proved to be a key factor, since only white-opaque somatic embryos with a length equal to or greater than 4 mm were able to germinate. The use of agar, instead of gelrite, led to an increase of the germination rate, although this effect was not significant.

Based on the results obtained here, the somatic embryogenesis could be improved in avocado by the incorporation of some factors which demonstrated to have a significant

influence on the different phases of the process. In the initiation phase according to Pliego-Alfaro and Murashige (1988), the auxin picloram could be substituted by a combination of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and thidiazuron in order to increase the induction rate. The efficiency of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid has been demonstrated in several species (Gaj 2004). This efficiency could be attributed to the double mode of action of this regulator, as an auxin analogue and as an effective stressor, switching on the embryogenic pathway (Feher et al. 2003). In order to enhance the development of high quality somatic embryos, it would be advisable to initiate the development and maturation of somatic embryos using as inoculum the smallest fraction with a culture density of 0.050 g. The synchronization of embryogenic cultures and subsequent culture of selected size fractions have been shown to be effective in several species (Ibaraki and Kurata 2001; Kurata and Fuyata 1992). The optimum culture density for development of somatic embryos depends on the balance between the inhibitory and stimulatory conditioning factors released into the medium, rather than on the physical limitation among cell clusters or depletion of medium nutrients (Higashi et al. 1998; Kobayashi et al. 1999). This phase should be carried out under darkness and flasks should be used as culture vessels. The culture vessel has a considerable influence on the gaseous microenvironment, which is a key factor for the development of somatic embryos. Regarding the germination phase, it was confirmed that only white-opaque somatic embryos, at least 4 mm long, should be selected. The utilization of agar as gelling agent also resulted in an increase of avocado somatic embryo germination. According to Beruto et al. (1999), this effect could be attributed to the fact that distinct gelling agents led to different physicochemical characteristics of culture media, giving rise to differences in water and nutrient availability. As previously shown in other species such as *Quercus robur* (Martínez et al. 2008; Sánchez et al. 2003), *Picea abies* (Jalonen and von Arnold 1991), *Glycine max* (Moon and Hildebrand 2003) or *Juniperus communis* (Helmersson and von Arnold 2009), the genotype has a great influence on the conversion of avocado somatic embryos into plantlets.

In order to address the second objective, four avocado embryogenic lines, representative of the two types of cultures that can be distinguished in avocado, were selected and further characterized using several approaches. Initially, their morphological composition and growth kinetics were monitored throughout a culture cycle in maintenance medium. At the same time, different experiments were carried out in order to check if the low morphogenic capacity typical of PEM cultures could be increased by the

addition of substances whose stimulant properties have been demonstrated in the somatic embryogenesis of other species (Ben-Amar et al. 2007). In the first experiment, conditioned medium obtained from embryogenic suspensions showing high morphogenic capacity (SE-type) was used for the establishment of the suspensions utilised to initiate the development of somatic embryos. Afterwards, arabinogalactan from larch wood was added in two different phases of the process: embryogenic suspensions and development of somatic embryos. The effect of the β -D-Glucosil Yariv reagent, which binds arabinogalactan proteins inhibiting their activity, was also studied. In parallel, a proteomic analysis was carried out to compare protein patterns of both types of cultures and to identify proteins associated to the cultures capacity to regenerate mature somatic embryos. Finally, the endogenous levels of indolacetic acid were quantified.

The results obtained revealed significant differences in the morphological composition and the proliferation pattern of both types of cultures. In agreement with Jalonen and von Arnold (1991), variations in appearance observed in avocado embryogenic cultures might reflect differences in the developmental stage at which the cell lines proliferate in maintenance medium.

The use of conditioned medium (50% of total volume) during the phase in which embryogenic cells were grown as suspension cultures, improved the subsequent development of somatic embryos in SE lines, but it had no significant influence on PEM lines. The addition of arabinogalactan to embryogenic suspensions provoked a significant decrease in the subsequent development of somatic embryos both in SE and PEM cultures. However, when arabinogalactan was added during the maturation phase, no effect was observed. Although the arabinogalactan proteins are known to regulate somatic embryogenesis in several species (Samaj et al. 2008), the wide variability and specificity of these substances make possible that different arabinogalactan proteins may stimulate or inhibit this process (Toonen et al. 1997).

The addition of β -D-Glucosil Yariv reagent to the conditioned medium of avocado embryogenic suspensions leads to a decrease in the proliferation of cultures and the production of white-opaque somatic embryos during the maturation phase. Considering that this reagent causes a specific inhibition of arabinogalactan proteins (Guan y Nothnagel 2004), its effect could be explained through interferences with these proteins action, revealing their involvement in both processes.

The proteomic approach allowed the detection of many proteins (1790). The principal component analysis revealed significant differences between the protein pattern of each type of culture. Several proteins were found to be differentially expressed in both types of lines. Following protein identification, it could be established that the most distinctive characteristic of the SE lines is the presence of a group of proteins associated with stress tolerance, and more precisely with oxidative stress. The role of several stresses as inducing agents of the somatic embryogenesis process is widely known (Feher et al. 2003). As found in avocado, in *Medicago truncatula* several proteins related to stress response were also differentially expressed in lines with different morphogenic capacity (Imin et al. 2005).

Quantification of endogenous indolacetic acid levels revealed that SE cell lines contained higher levels of this auxin than PEM-type lines. Nevertheless, the endogenous content of this hormone could not be correlated with the capacity of cultures to develop mature somatic embryos. Hence, in avocado embryogenic cultures, the indolacetic acid content can not be used as marker for morphogenic capacity.

The third objective of this thesis was to establish a cryopreservation protocol for avocado embryogenic cultures.

Up to date, only two studies have been published on cryopreservation of avocado embryogenic cultures (Efendi 2003; Efendi and Litz 2003). In those investigations, cryopreservation was performed using two different protocols, based on slow cooling or vitrification techniques. Although the results showed recovery of the embryogenic cultures, the survival was strongly dependent on the genotype. In this manner, none of the protocols applied allowed the recovery of all the embryogenic lines tested and, in some of them, the survival rate was lower than the minimum required for secure long-term storage of germplasm (Uchendu and Reed 2008). Thus, there is a need to develop a cryopreservation protocol widely applicable to avocado embryogenic cultures.

To address this objective, the first step was to perform a controlled comparison of three different cryopreservation protocols that previously proved to be useful for other species: a slow freezing method (Panis et al. 1990), the vitrification-based protocol of Sakai et al. (1990) and the droplet vitrification method on aluminium foil strips (Panis et al. 2005). In our investigation, two cell lines representative of the two types of embryogenic cultures that can be found in avocado were used. As result of this study, the droplet-vitrification method was selected as the most suitable to cryopreserve avocado embryogenic cultures. When applying this technique, very high recovery rates were obtained for both

embryogenic lines (77.78-100%). The efficiency of the droplet-vitrification technique (Panis et al. 2005) is based on higher cooling and thawing rates, increasing the chances to obtain a vitrified state during freezing and to avoid recrystallization during thawing. Following selection of this cryopreservation technique, 60 min was confirmed as the optimum incubation time in PVS2, since this period allowed to obtain the highest proliferation rates after freezing. An adequate exposure time to PVS2 solution is a critical step in all vitrification procedures (Sakai and Engelmann 2007). Its importance relies on finding the balance between appropriate explant dehydration, essential to withstand freezing, and chemical toxicity of the solutions, which is detrimental to embryogenic cultures (Panis et al. 2005).

Following establishment of the main variables of the procedure, in a second step, the influence of different factors, such as the characteristics of the plant material, the culture method (conditions at which cultures had been maintained prior to cryopreservation (in liquid or solid medium)), the growth phase at which explants were selected, or a high-sucrose preculture, on the success of the cryopreservation process were evaluated.

The results obtained showed that a mixture of calli and small somatic embryos was the best explant for cryopreservation. In *Musa*, also the smaller explants showed higher survival rates after freezing. This might be attributed to a less efficient heat exchange during freezing and warming or to the presence of more vacuolated cells in bigger explants, which led to a higher probability to form ice crystals (Panis et al. 2005). An interaction between the growth phase of explants and the culture method (solid or liquid) was also observed. In liquid medium the highest survival rates were obtained with cultures in the exponential phase while in solid medium, best results were achieved with cultures in the stationary phase. The influence of culture method and growth phase of explants selected for cryopreservation have been demonstrated in other species. In general, embryogenic tissues maintained in liquid medium survive better the freezing treatment due to a higher degree of homogeneity (Heine-Dobbernack et al. 2008). Regarding the growth phase, in studies carried out using liquid medium, selection of cultures at the exponential phase is usually recommended (Levitt 1980; Luo and Widholm 1997; Moran et al. 1999; Panis et al. 1990; Sakai and Larcher 1987). To our knowledge, the present investigation with avocado is the only one having evaluated the effect of the growth phase of cultures before cryopreservation using solid medium. Sucrose preculture did not have any significant influence on survival or recovery of avocado cell cultures. However, the use of sucrose

brought forward the initial response after freezing and increased the proliferation rate of cultures. The best results were obtained with 7 or 14 days of sucrose pretreatment, since higher embryogenic recovery and proliferation rates were achieved. The role of sucrose is based, among others, on its capacity to preserve membrane integrity (Crowe et al. 1984) and to lower the amount of freezable water (Panis et al. 2005).

To test the applicability of the cryopreservation protocol developed, the efficiency of the method was tested on different phases of the somatic embryogenic process. For this purpose, cryopreserved and unfrozen control cultures were compared during proliferation, maturation and germination phases, five months after thawing.

Despite the similar appearance of cryopreserved and control cultures, proliferation of embryogenic cultures was negatively influenced by the cryopreservation treatment with significantly lower growth rates in cultures established from cryopreserved explants. In both cultures, somatic embryos were able to develop but the number of somatic embryos equal to or larger than 4 mm, was lower in cryopreserved cultures. In contrast, the germination capacity was slightly improved in somatic embryos from cryopreserved cultures, with a 13.63% compared to 5.88% germination rate obtained in embryos from control cultures. Although the majority of studies evaluating the effect of cryopreservation on the embryogenic capacity showed a beneficial effect of cryopreservation (Aguilar et al. 1993; Mikula et al. 2011; Wang et al. 2002b; Winkelmann et al. 2004), probably due to a preferential selection of embryogenic cells during freezing (Mathur et al. 2003), there are also several studies in which, as in avocado, a negative effect of cryopreservation on somatic embryogenesis has been reported (Lardet et al. 2007; Martínez et al. 2003). As previously indicated by Lardet et al. (2007) and Salaj et al. (2011b), culturing cryopreserved tissues in maintenance medium for longer periods might be a solution to achieve proliferation and regeneration rates similar to those of control cultures.

Finally, the applicability of the cryopreservation protocol developed was evaluated in a high number of embryogenic lines from two different avocado cultivars, including SE and PEM-type cultures. The cryopreservation protocol allowed the recovery of the cell lines tested with rates in the range 80 to 100%. Although embryogenic lines varied in their response, in all cases cultures showed a good appearance and regrowth rates after cryopreservation were appropriate.

General introduction

INTRODUCTION

ORIGIN AND BOTANY

The avocado (*Persea americana* Mill.) is a tree species that apparently originated 9,000 years ago in a broad geographical area stretching from the eastern and central highlands of Mexico through Guatemala to the Pacific coast of Central America (Popenoe 1920; Smith 1969; Storey et al. 1986).

The Aztecs used the avocado as a sex stimulant and it was named as *ahuacaquahuit*, abbreviated as *ahuacatl*, meaning testicle (Fig. 1). This word later derived in *aguacate* when in 1519, Martín Fernández de Enciso (1470-1528) describes the avocado in his book 'Suma de Geografía que trata de todas las partidas del Mundo en especial de las Indias', the first published record of this species. In this book and in subsequent publications, avocado fruits were described as pleasant fruits with delicious butter inside (Fernández de Oviedo 1526; Hughes 1672). Since then, the avocado was disseminated from its origin to Spain and the rest of the American continent and, during the XIX century, it was grown in all continents.



Figure 1. The ancient pictograph depicting the avocado.

The avocado belongs to the family *Lauraceae*, genus *Persea* in which two subgenera can be distinguished: *Eriodaphne* and *Persea*, based on the morphology of their reproductive structures (Kopp 1966). While *Eriodaphne* consists of numerous species with small unmarketable fruits, subgenus *Persea* make up the commercial avocados. The members

within each subgenus are graft and sexually compatible, but they are incompatible with species of the other subgenus (Bergh and Ellstrand 1986; Bergh and Lahav 1996).

In the subgenus *Persea* three species are recognized: *P. shiedeana*, *P. parvifolia* and *P. americana* (Scora et al. 2002). The latter species includes eight subspecies adapted to different climatic conditions. Within these subspecies there are five varieties (*floccosa*, *zentmyerii*, *steyrmarkii*, *nubigena* and *tolimanensis*) with no economical importance and three (*drymifolia*, *guatemalensis* and *americana*) to which the edible avocados belong. In the popular literature, these three varieties are referred as the horticultural races 'Mexican', 'Guatemalan' and 'Antillean' based on their presumed centres of origin (Popenoe 1941) and described as semi-tropical, subtropical and tropical, respectively (Bergh 1976). Since there are no sterility barriers among the races, containing the same number of chromosomes ($2n=24$), these major races, which have distinctive adaptations, can be easily hybridized. The results of these inter-racial crossing are established trees with higher tolerance to colder and dryer climates, and improved agronomic traits (Whiley and Schaffer 1994).

Avocado is a fast growing evergreen tree, which can reach heights from 15 ('Mexican' race) to 30 m ('Guatemalan' and 'Antillean' races) in their native rainforest environments (Scora et al. 2002). However, orchard trees are kept to no more than 7 m (Fig. 2A/B) to provide an easy management and fruit harvesting. The root system is relatively shallow and not spreading much beyond the tree canopy (Whiley 1992). Flowers appear grouped in much-branched panicles. These inflorescences arise from terminal and sub-terminal buds and a single tree may have hundreds of panicles. Thus, a mature tree may have a million flowers (Bergh 1986). However, a high percentage are likely to be abnormal or sterile (Tomer and Gottreich 1978) and although a high number of fruitlets may set, a subsequent heavy drop is a normal occurrence (Bergh 1986). The avocado fruit is an oneseeded berry (Fig. 2C) and is very variable in size (from 50 g to 2 kg), shape (round, oval or pyriform) and colour (green, purple or black).

FRUIT COMPOSITION AND USES

The avocado fruit has excellent nutritional value (Purseglove 1968), although it depends on ecotype (subtropical or tropical), cultivar, degree of maturity of the fruit and growing conditions (Knight Jr 2002). The fruit is a traditional staple in Guatemala and nearby countries and an ingredient of widely consumed, traditional Mexican guacamole. In these countries avocado is named as 'poor man's butter'. However, it is a high-priced,

semi-luxury recent import, consumed in salads in metropolitan areas of European and North American countries (Knight Jr 2002). Avocado provides a well balanced supply of proteins (2 g/100 g), carbohydrates (6 g/100 g) and lipids (20 g/100 g). Despite its high fat content, this is largely monounsaturated and especially rich in oleic acid. Hence, these fats are health-promoting and have digestive, coronary and circulatory benefits. Furthermore, avocado pulp is a source of vitamins (carotene, niacin, pantothenic acid, pyridoxine, riboflavin, thiamine and folate) and minerals, such as potassium, phosphorous, magnesium and especially iron (Ahmed and Barmore 1980). All these healthy characteristics led to certification of avocado as a 'heart-healthy' fruit by the Australian Heart Foundation or to be quoted in the Guinness Book Records as 'the most nutritional fruit known to man'.

A growing use involves the employment of avocado oils in the cosmetic industry in order to soften the skin and improve its texture and appearance.



Figure 2. (A) Rows of avocado trees located in Coín (Málaga, Spain). (B) Avocado tree. (C) Avocado fruits. Pictures taken by Bartolo Briaes and Salvador Sánchez.

AVOCADO PRODUCTION AND MARKETING

World avocado production is around 3,853,930 t harvested from 436,280 ha (FAOSTAT 2009) being Mexico the main producer in the world followed by Indonesia, United States, Colombia and Brazil. Annual avocado production has been increasing approximately 3.3-fold over a 35-year period and Spain is where the greatest European increase production has occurred (Knight Jr 2002). Spain has an area of traditional avocado culture in the Canary Islands and a newer area in the Iberian Peninsula, in the coast of Andalusia (Fig. 2). In this region, avocado orchards have increased since the 80's, with 2,111 ha, reaching at this moment an area of 8,776 ha with a production of 69,532 t generating above 72 million euros (CAP 2010). Spain as well as the other main exporter countries, such as Mexico, Israel or Peru, exports the majority of fresh product to European Union countries (France, Holland, United Kingdom and Germany) and North America (United States and Canada); nevertheless, the Japanese market is getting important due to the use of avocado in sushi rolls.

BREEDING

Avocado breeding objectives have been directed toward improvement of the scion and the rootstock quality (Lahav and Lavi 2002).

Scion cultivars

Although in general avocado breeders are interested in high quality fruit not restricted to a specific colour, shape or size, the current mainstream objectives for avocado fruit can be summarized as follows: fruit size about 250-350 g, pyriform or ovate shape, green or black colour, easy-peeling or thicker skin, small seed relative to fruit size and tight in the pulp cavity, uniform and adequate ripening, resistance to fruit diseases and a slightly nutty taste. Avocado breeding programs focused on scion have been reported in Israel and California and have led to selections such as 'Gwen', 'Lamb Hass', 'Sir prize', 'Iriet' and 'Eden' (Lahav and Lavi 2002), but none of them have substituted 'Hass'.

Rootstocks

Adequate resistance to *Phytophthora cinnamomi*, which causes root rot, is the most desired trait throughout the avocado world. *Phytophthora* root rot (PRR) is the most destructive disease in this crop and it is considered as the main economically limiting factor

to successful avocado production in countries such as Australia, Mexico, South Africa and United States (Pegg et al. 2002). This pathogen kills large bearing avocado trees by destruction of the fine feeder roots. Feeder root death imposes severe water stress, foliage becomes chlorotic and wilted, leaves fall and branches rapidly die back depending on the severity of root rot (Pegg et al. 2002).

Extensive attempts to hybridize avocado with *Persea* species of subgenus *Eriodaphne*, resistant to the disease, have failed due to a graft- and sexually incompatibility between species of the two subgenera. Hence, the utilization of resistant rootstocks has been considered the most efficient strategy against this and other pathogens. Limited resistance to PRR is known in certain lines and some selections from them, such as 'Duke 7' and 'Thomas', have been clonally propagated in California to maintain the resistance level (Menge et al. 1992). In South Africa, two selections rootstocks, 'Merensky 2' and 'Merensky 3', tolerant to the root rot disease have also been obtained (Kremer-Köhne and Mukhumo 2003). The rootstock selection 'Merenski 2' also known as Dusa® outperformed 'Duke 7' with regard to tree health and yield (Kremer-Köhne 2011) and it has become a standard against which other PRR-resistant rootstocks should be compared (Smith et al. 2011). The genotypes of the 'Mexican' races 'Atlixco' and 'Tepeyanco' can also be promising tolerant-resistant rootstocks to PRR (Andrade-Hoyos et al. 2011). In Spain, a breeding program focused on obtaining tolerant rootstocks to *Rosellinia necatrix* has been initiated (Pérez-Jiménez et al. 2003).

Excessive vigour or very tall trees make fruit harvest expensive or impossible, hence dwarfing rootstock will be a major benefit for most avocado producers improving phytosanitary control, pruning, foliar irrigation and, at the same time, enhancing productivity (Lahav and Lavi 2002). Breeding for dwarfing rootstocks (Sánchez-Colin and Barrientos-Priego 1987) and rootstocks tolerance to salinity and calcareous conditions (Ben-Ya'acov and Michelson 1995) have been performed.

BIOTECHNOLOGY

Avocado breeding by conventional methods is slow due to heterozygosity and the long-life cycle of this species (Pliego-Alfaro and Bergh 1992) and biotechnological approaches could be useful to eliminate these limitations and help to develop new avocado cultivars. These biotechnological tools may provide the possibility of genetic

transformation, mass micropropagation of selected clones or *in vitro* mutagenesis followed by *in vitro* selection (Pliego-Alfaro et al. 2002).

Generation of transgenic avocado trees having the desired traits is obviously a major goal that will make avocado breeding much more efficient. In the first report related to avocado genetic transformation, Cruz-Hernandez et al. (1998) demonstrated that embryogenic cultures could be transformed with *Agrobacterium tumefaciens* (strain 9749 ASE2) containing a co-integrate vector pMON9749 with a selectable kanamycin-resistant marker (*NPTII*) and *GUS* genes under the control of the 35S CaMV promoter. This procedure utilized a two-step selection procedure, involving incubation of the putative transformed tissue in increasing concentrations of kanamycin. Transformed somatic embryos (ES) stained positive for GUS and the integration of *NPTII* and *GUS* into the avocado genome was confirmed by polymerase chain reaction (PCR) and Southern hybridization. Transgenic plants were not regenerated.

Avocado fruit is strongly climateric (Kays 1997) and ethylene regulates fruit ripening by coordinating the expression of several genes. The strategy adopted for controlling avocado fruit ripening has two main objectives, to prolong avocado shelf-life and to extend the on-tree storage of mature fruit, and it is based upon blocking or lowering ethylene production by modifying the *SAMase* gene expression. This gene catalyzes the conversion of S-adenosyl-L-methionine to methylthioadenosine, a non-toxic by-product that it is not available to be converted into ACC (Good et al. 1994). In this manner, the biosynthesis of ethylene is blocked. Using a modification of the protocol of Cruz-Hernandez et al. (1998), Efendi (2003) reported transformation of avocado embryogenic cultures using *A. tumefaciens* (strain EHA101) and vector pAG4092 harboring the *SAMase* gene, in a construct under the control of an avocado fruit ripening-specific cellulase promoter with *NPTII* as a selectable marker. Plants were regenerated.

Due to the little or no defenses against pathogens within the species, genetic transformation is also considered as an important option for protecting avocado from the main diseases, such as PRR or avocado sunblotch (Litz et al. 2005).

In order to address the problem of PRR tolerance, avocado embryogenic cultures have been transformed with genes whose expression is associated with antimicrobial activity such as chitinase, β -1,6 glucanase and the antifungal protein (Raharjo et al. 2003). More recently, the same research group has achieved the transformation of avocado embryogenic cultures with the *PDF1.2* gene (Raharjo et al. 2008). The *PDF1.2* gene codes for

a defensin from *Arabidopsis thaliana*, which is induced by exposure to different phytopathogenic fungi, thus suggesting a role for this gene in the plant defense response to fungal infection. Transformation was mediated by *A. tumefaciens* (strain EHA105) and the *PDF1.2* gene was driven by the CaMV 35S promoter and cloned in a binary vector pGPTV, which also contained the *UIDA* reporter gene and the *BAR* gene for resistance to phosphinothricin, the active ingredient of the herbicide Finale®. Genetic transformation of embryogenic cultures, ES and regenerated plants was confirmed by PCR, Southern blot hybridization, the XGLUC reaction for *UIDA* and application of the herbicide Finale® to regenerated plants. In the regenerated plants, expression of the *PDF1.2* gene could be observed in leaves and roots.

Palomo-Ríos et al. (2007) have also successfully transformed avocado embryogenic cultures by using a different protocol. In this case, genetic transformation was carried out by utilizing *A. tumefaciens* (strain AGL1) with the marker genes *NPTII* and *GUS*. The selection was always performed in solid medium to avoid cultures degeneration and loss of embryogenic capacity, usual in liquid medium. Furthermore, regeneration of ES was carried out without the selection agent. The genetic transformation of ES was confirmed by *GUS* staining, PCR and Southern blot hybridization. The same working group has the aim to transform avocado embryogenic cultures with genes from *Trichoderma* spp. with chitinase and glucanase activity, in order to obtain resistance to the pathogen *Rosellinia necatrix*, the main limitant factor for avocado production in South Spain (Pliego-Alfaro et al. 2010).

The avocado sunblotch is caused by the avocado sunblotch viroid which replicates in chloroplasts (Semancik and Szychowsky 1994). The strategy for controlling viroid diseases involves genetic transformation with the *PAC1* gene from *Schizosaccharomyces pombe* (Sano et al. 1997), which has been demonstrated to be highly effective against the potato spindle tuber viroid. The objective is to transform avocado using a gene construct containing *PAC1* with a transit peptide gene that would result in the expression of the *PAC1* gene in the chloroplasts (Raharjo et al. 2003).

Appart from genetic transformation, other biotechnological approaches, such as *in vitro* mutagenesis and *in vitro* selection, can be utilized in breeding programs. In a preliminar study, Witjaksono and Litz (2004) reported the radiation sensitivity of embryogenic cultures of cultivars 'Fuerte' and 'T362'. The effects of radiation on embryogenic suspensions and ES development were described.

As previously indicated, the immunity to PRR, associated with species of subgenus *Eriodaphne*, is inaccessible to plant breeders due to graft and sexual incompatibility barriers between *Eriodaphne* and *Persea* species (Frolich 1951). However, it was suggested that somatic hybridization might be the way to achieve this crossing (Pliego-Alfaro and Bergh 1992). Witjaksono (1997) attempted somatic hybridization of avocado by fusion of protoplast from avocado embryogenic cultures with protoplasts from leaves of PRR-resistant species. However, the results reported were inconclusive. Later, Litz et al. (2005) reported recovery of somatic hybrids after the fusion of protoplasts from avocado embryogenic cultures with non-morphogenic protoplasts of *Persea* spp. belonging subgenus *Eriodaphne*. However, plants were not regenerated.

AVOCADO SOMATIC EMBRYOGENESIS

In order to apply all these biotechnological advances and achieve the different goals described, a common prerequisite is highly needed: the development of an efficient regeneration protocol. Regeneration methods include adventitious regeneration and somatic embryogenesis.

In avocado, adventitious shoot regeneration has been performed from internodal sections from *in vitro* germinated seedlings with a regeneration rate of 6% and 1-2 shoots per regenerating explant (Pliego-Alfaro et al. 2002). Using embryonic axes as initial explants similar results were obtained by Barringer et al. (1996) with an average of 3.5 shoots per explant and up to 10 shoots per explants were obtained by Ahmed et al. (1998).

Somatic embryogenesis involves regeneration from a single cell and has several important advantages such as the unicellular embryo origin or the production of bipolar structures. Due to this bipolar nature of the ES, shoot and root formation are generally induced at the same time from a single regenerative act, differing from the organogenesis which needs two steps to produce a complete plant (Lambardi et al. 2008).

In the avocado, somatic embryogenesis is the commonly used method for plant regeneration (Litz et al. 2005). In this species, embryogenic cultures have been induced from adult and juvenile explants. However, while initiation of embryogenic cultures from zygotic embryos (ZE) has been repeatedly reported (Márquez-Martín 2007; Mooney and Van Staden 1987; Perán-Quesada et al. 2004; Pliego-Alfaro and Murashige 1988; Witjaksono and Litz 1999a), induction from mature explants is a difficult task and it has been

occasionally reported only from nucellar explants (Suárez et al. 2006; Witjaksono et al. 1999).

Although the induction of embryogenic cultures from ZE and the development of ES occur with acceptable rates, the final conversion into plants is still difficult (Litz et al. 2005; Pliego-Alfaro et al. 2010). In order to establish an efficient somatic embryogenesis protocol for the application of biotechnological tools in avocado, the limitations of this regeneration system have to be solved. The low conversion rate is probably due to an inadequate maturation or morphologic anomalies of the ES (Ammirato 1987). Therefore, optimization of this phase is required. Nevertheless, changes in previous phases, such as induction or proliferation of embryogenic cultures, could also be important to improve the conversion of ES into plantlets (Find et al. 1998a).

In previous investigations performed by our group different strategies were applied. One of them was to use very immature ZE as a model to optimize the maturation phase (Márquez-Martín 2007; Perán-Quesada 2001). Apart from this approach, different factors influencing maturation of ES, such as abscisic acid (ABA), osmotic agents or different nitrogen sources, have been also investigated in avocado (Márquez-Martín 2007). However, only the increase of the concentration of agar significantly improved the development of ES in this species (Márquez-Martín et al. 2011). As a consequence, the maturation phase is still the main bottleneck in this embryogenic system. Nevertheless, the influence of other factors, such as environmental conditions, type and density of inoculum or the influence of conditioning factors remain unexplored.

CHARACTERIZATION OF EMBRYOGENIC LINES

Another alternative to improve development and maturation of avocado ES is to achieve a deep understanding and knowledge on this developmental pathway, unrevealing which are the main factors involved in the regulation of this process. This approach has been used in other species such as *Picea abies* (Jalonen and von Arnold 1991), pecan (Burns and Wetzstein 1997) or *Gentiana pannonica* (Mikula et al. 2002). In these cases embryogenic lines differing in its morphology and morphogenic capacity were utilized as a model.

In avocado, two types of embryogenic cultures have been distinguished based on their morphology in the proliferation phase: SE-type and PEM-type (Witjaksono and Litz 1999a). These morphological differences were later correlated with a different morphogenic capacity in maturation medium (Márquez-Martín et al. in press). A higher recovery of

white-opaque (BO) ES (ESBO) was obtained in SE-type lines. Moreover, ESBO at advanced developmental stages (5 mm or larger) only developed from this type of cultures. By contrast, PEM-type cultures were associated with low frequency of ESBO production.

In order to get a better understanding of the somatic embryogenesis process and find biochemical markers associated with high morphogenic capacity, characterization of SE and PEM-type cultures would be of great value. The characterization should be tackled from different points of view including basic aspects such as morphology or proliferation patterns, but also involving biochemical analyses such as proteomic studies or determination of endogenous indolacetic acid (IAA) levels.

In this manner, it would be feasible to early distinguish which lines are suitable to be regenerated, avoiding PEM-type lines or trying to transform them into cultures exhibiting a higher morphogenic potential.

CRYOPRESERVATION OF EMBRYOGENIC CULTURES

Once somatic embryogenesis is established as an efficient regeneration system for one species, a pivotal aspect is the maintenance of the embryogenic cultures while different studies or field evaluations are being performed. However, *in vitro* storage implies a labour-intensive maintenance with repeated subculturing, which increases the risk of losing the embryogenic cultures through contamination, human errors or technical failures (Lambardi et al. 2008). Cryopreservation is, so far, the only safe and cost-effective method for long-term conservation of embryogenic cultures (Lambardi et al. 2008).

The only cryopreservation studies performed in avocado up to date were reported by Efendi (2003) and Efendi and Litz (2003). Results obtained showed the possibility to cryopreserve embryogenic cultures of this species with either, slow cooling or vitrification techniques. However, the success of the cryopreservation was strongly related with the genotype and none of the protocols were feasible for all the embryogenic lines tested. Hence, the development of a new cryopreservation protocol, suitable to a wide number of embryogenic lines is needed.

Objectives

This study was addressed to achieve the general objective of optimizing the regeneration of avocado via somatic embryogenesis. This main aim has been divided in the following specific objectives:

1. To improve somatic embryogenesis in avocado by studying the effect of different factors on the phases of this developmental pathway.
2. To investigate the regulation of the morphogenic capacity in avocado cell lines by characterizing SE- and PEM-type cultures respect to their morphology, physiology, endogenous hormonal content and proteomic prolife.
3. To develop a cryopreservation protocol for avocado embryogenic cultures.

Capítulo I

Embriogénesis somática

INTRODUCCIÓN

La embriogénesis somática es una forma de reproducción asexual en la que células somáticas, bajo unas condiciones experimentales favorables, generan células embriogénicas. Estas células se desarrollarán a través de estados de la embriogenia sufriendo una serie de cambios morfológicos y bioquímicos hasta dar lugar a ES que generarán posteriormente plantas completas (Komamine et al. 2005; Schmidt et al. 1997; Zimmerman 1993). Este fenómeno no es un proceso artificial y está bastante extendido en la naturaleza, habiéndose observado en más de 60 familias diferentes (Pliego-Alfaro y Barceló-Muñoz 2001). El proceso de embriogénesis somática se basa en la denominada totipotencia celular, mediante la cual las células somáticas individuales pueden regenerar plantas completas. La embriogénesis somática constituye, por lo tanto, un sistema de regeneración y puede ser utilizado para hacer posible la aplicación de herramientas biotecnológicas.

Por otro lado, el hecho de que los ES se asemejen mucho a los ZE (Dodeman et al. 1997; Feher et al. 2003) conlleva que una de las utilidades de la embriogénesis somática sea su uso como modelo para el estudio de los procesos morfológicos, fisiológicos, moleculares o bioquímicos que tienen lugar durante el comienzo y desarrollo de la embriogénesis en plantas superiores (Yang y Zhang 2010). Además, los ES presentan la ventaja de ser fácilmente manipulables, sus condiciones de cultivo pueden ser alteradas y la falta de material no es un factor limitante para la experimentación (Kawahara y Komamine 1995). Sin embargo, al existir también varias diferencias importantes entre los dos tipos de embriogénesis (fertilización, diferenciación del endospermo, efecto del tejido materno, dormancia y desecación del embrión), hay un debate abierto sobre si el uso de la embriogénesis somática como modelo es del todo adecuado o no (Zimmerman 1993).

Desde un punto de vista tecnológico la embriogénesis somática puede dividirse en las siguientes fases: inducción de cultivos embriogénicos, mantenimiento y proliferación, maduración de ES, germinación de los mismos y aclimatación de las plantas obtenidas. Para que cada una de estas etapas transcurra adecuadamente y el proceso sea efectivo, se deben aplicar diversos tratamientos químicos y físicos en momentos críticos adecuados (von Arnold et al. 2002). A pesar de esta separación artificial de las distintas fases, hay que tener en cuenta que modificaciones o factores aplicados en una fase determinada pueden tener repercusiones en fases posteriores (Bozhkov et al. 2002).

Cada una de estas etapas está regulada por diversos factores, los cuales serán de mayor o menor importancia dependiendo del genotipo con el que se trabaje. De hecho, el

genotipo es uno de los factores más influyentes en todas y cada una de las fases de la embriogénesis somática. Dentro de una misma especie, los distintos genotipos pueden presentar diferencias muy notables en cuanto a su capacidad embriogénica (Parrott et al. 1991). Estas diferencias podrían reflejar una distinta capacidad para activar la ruta embriogénica (Merkle et al. 1995).

INDUCCIÓN DE CULTIVOS EMBRIOGÉNICOS

En la primera fase o fase de inducción debe producirse la interrupción de una expresión génica concreta y su sustitución por un programa embriogénico en determinadas células del explanto (von Arnold et al. 2002; Zeng et al. 2007). De esta forma, se producirá la desdiferenciación celular y las células somáticas se convertirán en células embriogénicas (Namasivayam 2007).

Esta reprogramación génica surge como una activación de los mecanismos de adaptación tras cambios drásticos en el ambiente celular (Lichtenthaler 1998). La transición de las células a un estado embriogénico puede ser inducida por lo tanto mediante situaciones de estrés que permitirán una respuesta celular, si las señales adecuadas son recibidas (Feher et al. 2003; Zavattieri et al. 2010). Como ejemplos de estreses que inducen dicha transición podemos citar el osmótico (Yu et al. 2001), el hídrico (Aoshima 2005) o el anaerobio (Potters et al. 2007). Con la adición de reguladores de crecimiento al medio de cultivo se consigue el mismo resultado (Pasternak et al. 2002; Thomas y Jiménez 2005).

Un factor importante en la inducción de la embriogénesis somática es la disrupción de la integridad del tejido celular que tiene como consecuencia el aislamiento físico de las células (Merkle et al. 1995). Este aislamiento se puede originar por necrosis en el tejido circundante (Trigiano et al. 1989; Williams y Maheswaran 1986), por separaciones celulares inducidas por auxina, que aumentan la friabilidad del callo (Evans et al. 1981), o por la deposición de callosa en las células (Dubois et al. 1990). Estos estudios sugieren que el aislamiento celular puede ser imprescindible para la inducción de nuevos eventos morfogénicos evitando interferencias de tejidos adyacentes, los cuales están determinados para otras rutas, distintas de la embriogénica (Williams y Maheswaran 1986). Es destacable señalar que el ZE también se desarrolla en aislamiento citoplasmático (Feher et al. 2003).

La inducción de la embriogénesis puede llevarse a cabo de forma directa, en la que los ES aparecen directamente sobre el explanto, o indirecta, en la cual hay un paso intermedio de formación de callo que será el que en fases posteriores dé lugar a los ES.

En la embriogénesis indirecta pueden producirse dos tipos de callo: embriogénico y no embriogénico. Distinguir entre ambos tipos de callo es un paso clave para pasar de la fase de inducción a la de proliferación de cultivos. De esta manera, aunque de forma general se asume que el éxito en establecer una línea competente para obtener plantas dependerá de la habilidad en reconocer el tipo celular adecuado, existe cierta controversia a la hora de elegir en qué factores basarse para discriminar las células embriogénicas de las que no lo son.

Según Nomura y Komamine (1985), determinadas características morfológicas distinguen claramente a las células embriogénicas, las cuales se caracterizan por ser pequeñas, isodiamétricas, con un gran núcleo y un citoplasma denso. Estas mismas características fueron observadas en células embriogénicas de alfalfa, mientras que las células no embriogénicas se diferenciaron por presentar una forma más elongada y un gran número de vacuolas (Bögre et al. 1990; Dudits et al. 1991; Feher et al. 2002; Pasternak et al. 2002). La presencia de una pared celular engrosada (Williams y Maheswaran 1986) y una mayor actividad metabólica (Bajaj 1995) son otras características comunes a las células embriogénicas (Quiroz-Figueroa et al. 2006).

Además, en diversas especies se ha observado que el callo no embriogénico suele ser traslúcido y friable mientras que el embriogénico presenta un color más amarillento y oscuro y su consistencia es más dura (Ikeda-Iwai et al. 2002; Jiménez y Bangerth 2001abc; Quiroz-Figueroa et al. 2006). En el caso del café, la correlación entre el aspecto del callo y su capacidad embriogénica se ha confirmado histológicamente (Quiroz-Figueroa et al. 2002).

No obstante, la identificación de la capacidad embriogénica en las células no puede ser distinguida todavía en base a un marcador estructural o fisiológico que sea universal y potencialmente aplicable a varias especies (Namasivayam 2007). Como alternativa a estos marcadores morfológicos, en varios estudios se ha intentado identificar marcadores genéticos o moleculares para la embriogénesis somática. Numerosos genes se han aislado durante este proceso tales como *LEC1* (Lotan et al. 1998) o *LEC2* (Stone et al. 2001) pero solo uno, *SERK* (Schmidt et al. 1997), puede considerarse como un marcador específico responsable de la activación de la ruta embriogénica en suspensiones celulares de zanahoria (Namasivayam 2007). Este gen identifica células competentes para iniciar el proceso de embriogénesis somática y de forma general se asume que juega un papel muy importante en la adquisición de la competencia embriogénica en células somáticas (Feher et al. 2003; Rose y Nolan 2006; Sharma et al. 2008).

Factores influyentes

Explanto

Entre los factores determinantes en la inducción de cultivos embriogénicos se encuentra el explanto. El tipo de explanto utilizado, así como el estadio de desarrollo del mismo, han resultado ser factores determinantes en numerosas ocasiones. Los explantos juveniles, como el ZE, que es el explanto más utilizado en especies leñosas (Raemakers et al. 1999), suelen presentar mayor capacidad morfogénica que explantos de origen adulto. En muchos tejidos el estado 'no embriogénico' es irreversible, lo que podría estar asociado con la ausencia de receptores de auxina en este tipo de tejidos (Jacobsen 1991). Además, puede ocurrir que dentro del mismo explanto solo una parte del mismo responda a la embriogénesis, como es el caso del guisante (Kysely y Jacobsen 1990), o que la orientación del explanto en el medio de cultivo sea un factor determinante (Hartweck et al. 1988).

En aguacate se han usado como explantos para la inducción de la embriogénesis somática ZE inmaduros (Márquez-Martín 2007; Perán-Quesada 2001; Pliego-Alfaro y Murashige 1988) o nucelas de semillas inmaduras (Suárez et al. 2006; Witjaksono 1997). El tamaño óptimo de los ZE fue establecido en 0,6-0,8 mm, 21-28 días después de la polinización (Pliego-Alfaro y Murashige 1988). Los porcentajes de inducción oscilaron entre 0-25%, dependiendo estrictamente del cultivar (Perán-Quesada 2001; Witjaksono y Litz 1999a).

Factores hormonales

El uso de reguladores de crecimiento para inducir el proceso de embriogénesis somática es bastante frecuente en la mayoría de los protocolos de regeneración. Tanto el tipo de regulador de crecimiento como la concentración a la que se utilice, influyen en la inducción.

Las auxinas son el regulador de crecimiento más utilizado en esta fase y en su presencia se forman masas proembriogénicas (PEMs) a partir de células competentes presentes en el explanto. Grupos de células meristemáticas se desprenden de la capa superficial de las PEMs y continúan proliferando activamente (Merkle et al. 1995). Aunque se ha utilizado una gran diversidad de auxinas en la inducción de embriogénesis somática, el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) es sin duda el más utilizado y el que presenta una mayor efectividad. Su alta eficiencia, encontrada en diferentes sistemas de cultivo *in vitro* así como en distintas especies, sugiere un carácter único y exclusivo de este regulador de

crecimiento que podría deberse al doble papel que juega en la inducción embriogénica, como auxina y como agente estresante (Feher et al. 2002), aumentando así la respuesta embriogénica.

Además del 2,4-D, otras auxinas utilizadas con menor frecuencia en los distintos protocolos de embriogénesis somática son el ácido naftalenacético, IAA, ácido indolbutírico y picloram (Jiménez 2005). Además del uso de auxinas, para llevar a cabo este proceso también se ha descrito la utilización de citoquininas (Sagare et al. 2000) o una combinación de auxinas y citoquininas (Zhang et al. 2007).

Otros reguladores de crecimiento, tales como oligosacarinas, jasmonatos, poliaminas o brasinoesteroides, también están siendo utilizados con éxito en la inducción de embriogénesis somática en varias especies (von Arnold et al. 2002).

No obstante, la influencia de los factores hormonales en el éxito de la inducción embriogénica no solo está determinada por la aplicación exógena en el medio de cultivo sino por los niveles endógenos de los mismos en los explantos. Estos niveles son un factor fundamental a la hora de determinar la especificidad de las respuestas celulares (Feher et al. 2003).

Además, se han descrito casos donde no fue necesaria la aplicación de reguladores de crecimiento (Choi et al. 1998) o donde inductores no hormonales, como el estrés por metales pesados (Pasternak et al. 2002) o por altas temperaturas (Kamada et al. 1994), desencadenaron la respuesta embriogénica. En estos casos, la embriogénesis suele ser directa, sin formación de callo (Feher et al. 2003).

En aguacate, la inducción de embriogénesis somática se lleva a cabo normalmente mediante la aplicación de la auxina picloram y su concentración, $0,1 \text{ mg l}^{-1}$, se considera un factor crítico en el rendimiento del proceso (Mooney y Van Staden 1987; Pliego-Alfaro 1981).

Condiciones ambientales

Las condiciones ambientales adecuadas para el inicio de la respuesta embriogénica dependen de las necesidades de cada especie y es muy difícil establecer unas premisas universales. Así, algunos cultivos embriogénicos requieren luz para su inducción (Gleddie et al. 1983) mientras que otros solo lo hacen en oscuridad (Michler y Bauer 1991). A pesar de que dichas condiciones juegan un papel determinante, en pocas ocasiones se hacen estudios sistemáticos para evaluar su influencia a la hora de establecer un nuevo protocolo.

En aguacate, la inducción de cultivos embriogénicos se ha llevado a cabo de forma indistinta en luz o en oscuridad (Pliego-Alfaro 1981; Pliego-Alfaro y Murashige 1988), aunque actualmente se realiza en condiciones de oscuridad (Perán-Quesada et al. 2004; Witjaksono y Litz 1999a).

MANTENIMIENTO Y PROLIFERACIÓN DE CULTIVOS EMBRIOGÉNICOS

En la fase de proliferación, el callo embriogénico aumenta constantemente y de forma indefinida, dando lugar a cultivos embriogénicos derivados de un único explanto que se establecerán como líneas embriogénicas.

Las condiciones de cultivo se suelen mantener muy similares a las de inducción aunque la concentración de auxina utilizada en esta fase debe ajustarse de forma que permita la proliferación continua e indefinida de las PEMs, pero evitando que una aplicación excesiva tenga efectos negativos. Cuando la concentración de auxina es muy elevada, o los subcultivos a medio fresco se hacen muy frecuentemente, se puede perder eventualmente la capacidad embriogénica (Bhojwani y Razdan 1996). Por otro lado, una reducción excesiva de la concentración de auxina en el medio de cultivo permitirá la histodiferenciación de los ES.

Los cultivos pueden ser mantenidos en medio sólido, aunque para la propagación clonal se recomienda el uso de suspensiones celulares. Las principales ventajas del medio líquido son permitir una tasa de proliferación más elevada y favorecer la sincronización de los cultivos (George 2008). Durante el cultivo de suspensiones celulares se segregan al medio de cultivo determinados compuestos que pueden ser imprescindibles para la coordinación de la división celular y la morfogénesis (Warren y Fowler 1981). Entre este grupo de compuestos, algunos proceden de la pared celular mientras que otros provienen del interior de la célula. Sus funciones dentro del proceso de proliferación son tanto de inhibición como de inducción (Matthys-Rochon 2005; Quiroz-Figueroa et al. 2000; Van Engelen y De Vries 1992). Como ejemplos de inhibidores de la embriogénesis somática en suspensiones con una alta densidad celular se encuentran el 4-hidroxibenzil y el vanilil benzileter (Kobayashi et al. 2000; Umehara et al. 2005). En contraposición a estos inhibidores, existen proteínas segregadas al medio de cultivo, la mayoría glicoproteínas (Satoh et al. 1986), que actúan como estimuladores o inductores de la embriogénesis somática (Kreuger y Van Holst 1993).

El mantenimiento y proliferación de los cultivos embriogénicos de aguacate se lleva a cabo en las mismas condiciones indicadas para la fase de inducción: medio de Murashige y Skoog (MS) (1962) suplementado con 0,1 g l⁻¹ de picloram y gelificado con 6 g l⁻¹ de agar (MSPA) con incubación en oscuridad a 25 ± 1°C (Perán-Quesada et al. 2004; Pliego-Alfaro y Murashige 1988; Witjaksono et al. 1999). En condiciones de mantenimiento, los cultivos de aguacate son bastante heterogéneos, estando compuestos por estructuras nodulares, PEMs y ES en diferentes estadios de desarrollo. Junto con el material de características claramente embriogénicas, también se observa en la mayoría de los genotipos, callo gris y amorfo, no embriogénico. El subcultivo a medio fresco implica la discriminación del callo no embriogénico y la selección de PEMs y ES traslúcidos (ESt) en estadios tempranos de desarrollo.

Tanto la formulación del medio basal como el agente gelificante demostraron ser factores influyentes en la proliferación de cultivos embriogénicos de aguacate (Perán-Quesada 2001; Witjaksono y Litz 1999a). Así, el medio MSPA se estableció como el más adecuado para el mantenimiento de estos cultivos (Márquez-Martín 2007; Witjaksono y Litz 1999a), favoreciendo también el posterior desarrollo de ES maduros (Márquez-Martín et al. en prensa). La edad del callo es otro factor que influye en la proliferación de los cultivos (Márquez-Martín 2007). Estos aumentaron su tasa de crecimiento a lo largo de los años aunque de forma paralela su capacidad embriogénica se vio claramente reducida.

Los cultivos embriogénicos de aguacate también pueden ser mantenidos en medio líquido (Sánchez-Romero et al. 2006; Witjaksono y Litz 1999a). El establecimiento de las suspensiones suele llevarse a cabo siguiendo el protocolo de Witjaksono y Litz (1999a). Sin embargo, en medio líquido los cultivos se desorganizan más rápidamente por lo que no es conveniente mantenerlos en estas condiciones durante largos periodos de tiempo (Witjaksono y Litz 1999a). De forma rutinaria es preferible la proliferación de los cultivos en medio sólido, aunque de forma puntual se establezcan suspensiones en medio líquido para sincronizar los cultivos antes de la fase de desarrollo de ES (Sánchez-Romero et al. 2006).

DESARROLLO DE EMBRIONES SOMÁTICOS

Normalmente se utiliza un único medio de cultivo para llevar a cabo las fases de histodiferenciación y maduración de ES. Sin embargo, von Arnold et al. (2002) apuntaron que los embriones no deben ser expuestos a tratamientos de maduración antes de que hayan alcanzado el estado de desarrollo apropiado. De acuerdo con esto, estos autores

plantearon la separación de estas dos etapas, utilizando para cada una de ellas condiciones de cultivo diferentes. Así, para estimular el posterior crecimiento de los ES es necesario transferir los cultivos a una fase de predesarrollo o premaduración en medio sin auxina, ya que con la retirada de esta hormona se elimina el bloqueo de la expresión de genes necesarios para la transición al estadio corazón (Zimmerman 1993). En esta fase intermedia tendrá lugar la transición de las PEMs a ES, alcanzando estos un estadio de desarrollo en el que pueden ser transferidos al medio de maduración correspondiente con el fin de completar su diferenciación y maduración, y poder germinar posteriormente.

Cuando los cultivos embriogénicos son transferidos desde un medio de proliferación a otro para estimular el desarrollo de ES, estos cultivos suelen estar constituidos por una mezcla diversa de células y agregados celulares (von Arnold et al. 2002). En estas condiciones, se producen aberraciones con formación de embriones múltiples o morfológicamente anormales. La sincronización de dichos cultivos, como paso previo a la histodiferenciación y maduración de los embriones, puede favorecer el rendimiento final del proceso. Tanto la separación física (Bhojwani y Razdan 1996; Molle et al. 1993), mediante filtración de suspensiones celulares, como la utilización de reguladores de crecimiento que detengan el desarrollo de los embriones en un estadio determinado (Rugini y Baldoni 2005), son métodos adecuados para producir la sincronización de los cultivos.

En aguacate, la sincronización de los cultivos ha demostrado ser un aspecto importante y se realiza mediante la filtración de suspensiones embriogénicas, por lo que estas constituyen un paso previo en el desarrollo de ES en esta especie (Márquez-Martín et al. en prensa; Witjaksono y Litz 1999a).

Durante el proceso de maduración, los ES sufren una serie de cambios morfológicos y bioquímicos: se produce la acumulación de sustancias de reserva, se reprime la germinación y se adquiere tolerancia a la desecación (Thomas 1993). La acumulación de productos de reserva se da de forma similar a la producida en ZE, pero tanto las cantidades como las etapas en las que tiene lugar dicho almacenamiento pueden diferir entre ES y ZE (Merkle et al. 1995; Yeung 1995). Cailloux et al. (1996) describieron que como consecuencia de la acumulación de sustancias de reserva, los ESt se vuelven BO. Este carácter morfológico es utilizado en aguacate como indicador de calidad de los ES desarrollados (Márquez-Martín et al. 2011; Perán-Quesada et al. 2004; Witjaksono y Litz 1999b).

Los ES deben alcanzar tanto una madurez 'morfológica' como 'fisiológica' para que la posterior germinación se produzca adecuadamente (Stasolla y Yeung 2003). Sólo aquellos

embriones maduros que hayan acumulado suficientes sustancias de reserva y adquirido tolerancia a la desecación al final de la maduración, se desarrollarán como plantas.

Factores influyentes

Auxinas

De la misma forma que las auxinas eran casi imprescindibles para desencadenar el proceso de inducción, la retirada total de los reguladores de crecimiento del medio de cultivo favorece la histodiferenciación de los ES (Merkle et al. 1995; von Arnold et al. 2002). Así, para estimular el desarrollo de los ES, los cultivos embriogénicos deben transferirse a un medio sin auxinas en el que se favorece la expresión de los genes necesarios para el desarrollo embriogénico (Zimmerman 1993).

En ocasiones, la transferencia de los cultivos a un medio sin auxinas no es suficiente para eliminar el efecto negativo de estos reguladores, que pueden disminuir la calidad de los embriones formados y su posterior capacidad de germinación. En estos casos, la adición de carbón activo, capaz de absorber el exceso de auxina (Ebert y Taylor 1990), favorece el desarrollo morfológico adecuado de los embriones y su posterior germinación (Becwar et al. 1989; Buchheim et al. 1989; Ho y Vasil 1983).

En aguacate, la transferencia de los cultivos embriogénicos desde el medio de mantenimiento a otro medio sin auxina estimula el desarrollo de ESBO (Sánchez-Romero et al. 2006).

Ácido abscísico

En algunas especies, y especialmente en coníferas, es necesaria la adición de ABA al medio de cultivo para inducir el proceso de maduración de los ES (Tautorus et al. 1991; von Arnold et al. 2002). En otras especies, sin embargo, el uso de ABA está encaminado a reducir el proceso de embriogénesis secundaria (Nuutila et al. 1991) o a inhibir la germinación precoz (Kermode 1995). El ABA también promueve la acumulación de sustancias de reserva (Cailloux et al. 1996; Liao y Amerson 1995) e induce el estado de dormancia (Gutmann et al. 1996).

Aunque el mecanismo preciso de acción del ABA no es completamente conocido, es evidente que este regulador de crecimiento regula la expresión de numerosos genes implicados en la maduración de embriones (Fischerova et al. 2008; García-Martín et al. 2005).

En embriogénesis somática es importante ajustar tanto la concentración de ABA como el período de tratamiento, ya que su aplicación mantenida en exceso en el tiempo puede repercutir negativamente en el posterior crecimiento de las plantas germinadas (Bozhkov y von Arnold 1998). El momento exacto dentro del proceso de embriogénesis somática en el que debe añadirse el ABA también es un factor crítico para obtener efectos positivos con esta hormona (von Arnold et al. 2005). El ABA no induce la transición de PEMs a ES, por lo que no es recomendable añadirlo inmediatamente después de la fase de proliferación. Sin embargo, una vez que los ES se han formado, la adición de ABA favorece que estos continúen su desarrollo anatómico e histológico de forma adecuada (von Arnold et al. 2005).

La desecación de ES mejora la calidad y eficiencia de la posterior germinación (Pond et al. 2002). Esta desecación está relacionada con un descenso de los niveles endógenos de ABA (Find 1997; Kermode et al. 1989) o cambios en la sensibilidad al ABA (Finkelstein y Somerville 1989). En semillas recalcitrantes, donde no es posible la desecación, se ha comprobado también que los niveles endógenos de ABA experimentan las mismas fluctuaciones.

En aguacate, Perán-Quesada et al. (2004) utilizaron ABA para la maduración de ES, pero a pesar de que se obtuvo una mayor producción de ES, su papel no quedó claramente definido. Cuando Márquez-Martín (2007) evaluó el efecto del ABA a distintas concentraciones en el desarrollo de ES de aguacate, comprobó que la adición de esta hormona afectó negativamente tanto a la regeneración, como al número de ESBO obtenidos por cultivo.

Fuentes de nitrógeno

La presencia de nitrógeno, ya sea en forma de nitrato, amonio, aminoácidos individuales o caseína, es un requerimiento indispensable para la histodiferenciación y maduración de los ES (Merkle et al. 1995). La adición de aminoácidos al medio de cultivo ha mejorado el desarrollo y maduración en muchas especies (Khlifi y Tremblay 1995; Litz y Raharjo 2005; Rao et al. 1995).

En aguacate, se probó el efecto de distintas fuentes de nitrógeno en el medio de desarrollo de ESBO (Márquez-Martín 2007). Así, se evaluó la influencia de los aminoácidos de la formulación de Jensen (Jensen 1977), la glutamina, la caseína hidrolizada y el extracto de levadura a diferentes concentraciones. El único tratamiento que mejoró los resultados

obtenidos fue el que incluyó los aminoácidos de Jensen consiguiéndose en este caso un aumento significativo de la regeneración de ESBO.

Agentes osmóticos

Las relaciones hídricas entre los embriones y su ambiente juegan un papel fundamental en el desarrollo embrionario, especialmente en la fase de maduración (Adams y Rinne 1980; Bradford 1994). Una de las estrategias comúnmente usadas para optimizar la maduración de ES, tanto en angiospermas como en gimnospermas, es la restricción de la cantidad de agua disponible en los medios de cultivo (Márquez-Martín et al. 2011). Mediante la adición de agentes osmóticos al medio de cultivo se puede modificar la cantidad de agua disponible. Existen dos grupos principales de agentes osmóticos: los agentes plasmolíticos, constituidos por sustancias de bajo peso molecular como sales inorgánicas, aminoácidos y azúcares, y los agentes no plasmolíticos, que incluyen compuestos de alto peso molecular como el polietilenglicol (PEG) y los dextranos (Stasolla et al. 2002).

El efecto del tipo (plasmolítico y no plasmolítico) y de la concentración de agente osmótico en el desarrollo de ES de aguacate fue evaluado por Márquez-Martín et al. (2011) utilizando sorbitol y PEG. Ninguno de los dos agentes osmóticos favoreció el desarrollo de ESBO. El PEG provocó, además, una drástica disminución en la regeneración de ESBO, incluso cuando fue suministrado a la concentración más baja (2,5% p/v).

Agentes gelificantes

Tanto el tipo como la concentración de agente gelificante influyen notablemente en la disponibilidad de agua (Owens y Wozniak 1991) y de nutrientes (Beruto et al. 1999) del medio de cultivo a los tejidos.

La influencia del tipo y concentración de agente gelificante en la maduración de ES ha sido estudiada en especies como *Pinus strobus* (Klimaszewska y Smith 1997; Klimaszewska et al. 2000) y aguacate (Márquez-Martín et al. 2011). Estos autores demostraron que ambos factores influyen de forma significativa en el desarrollo de ES maduros y en la posterior germinación de los mismos. Así, concentraciones elevadas de agente gelificante estimularon la maduración de ES de pino (Klimaszewska et al. 2000). La concentración de agente gelificante también demostró ser un factor clave para el desarrollo de ESBO de aguacate. Un incremento en la concentración de agar de 6 a 10 g l⁻¹ dio lugar a un aumento significativo del número de

ESBO formados por cultivo. Además, mejoró de forma significativa la calidad de dichos embriones (Márquez-Martín et al. 2011).

Un incremento en la concentración del agente gelificante provoca un aumento en la firmeza del gel, lo que ocasiona un descenso de la disponibilidad de agua (Klimaszewska y Smith 1997; Klimaszewska et al. 2000), factor que favorece la maduración de ES de distintas especies (Stasolla et al. 2002). No obstante, el tipo de agente gelificante también afecta la maduración de ES. Así, Márquez-Martín et al. (2011) encontraron diferencias significativas en la producción de ESBO cuando utilizaron distintos agentes gelificantes a concentraciones que daban lugar a firmezas del gel similares. Tal y como apuntaron previamente Beruto et al. (1999), estos resultados sugieren que son diversas las propiedades fisicoquímicas de los medios de cultivo que se ven afectadas por la utilización de diferentes agentes gelificantes a concentraciones distintas y que pueden influir directamente en la respuesta de los cultivos embriogénicos.

GERMINACIÓN DE EMBRIONES SOMÁTICOS

En la fase de germinación se obtiene el producto final de la embriogénesis somática que son las plantas. La supervivencia y el crecimiento de las mismas dependerá de las condiciones en que se hayan llevado a cabo las fases anteriores, y su establecimiento *ex vitro* será el indicador de la eficiencia final de todo el proceso.

Una de las principales diferencias entre la germinación de ZE y la de ES es la cinética de degradación de las sustancias de reserva. La falta de un tejido nutritivo que rodee al ES, como ocurre en el ZE, puede ser la principal causa de esta diferencia (Merkle et al. 1995).

De forma general, la germinación se lleva cabo en medio sólido, con frecuentes alteraciones en su formulación basal que generalmente se reduce a la mitad. La germinación puede producirse sin la necesidad de añadir hormonas al medio de cultivo (Stasolla y Yeung 2003), aunque el uso de citoquininas puede contrarrestar el efecto negativo de las auxinas durante la fase de histodiferenciación y promover la elongación del brote apical (Merkle et al. 1995). De forma general la germinación se produce en condiciones de luz (Webster et al. 1990).

En aguacate, los porcentajes de germinación oscilan entre el 0-17%, indicando que la conversión de ES en plantas es baja (Márquez-Martín 2007; Márquez-Martín et al. 2011; Raharjo et al. 2008; Sánchez-Romero et al. 2006; Witjaksono y Litz 1999b). Aunque se han utilizado distintos medios y condiciones de cultivo (Perán-Quesada et al. 2004; Witjaksono

y Litz 1999b) la germinación sigue siendo una fase limitante, probablemente debido a una maduración incompleta.

Cuando solo se produce la formación de pequeños brotes, estos pueden ser micropropagados siguiendo el protocolo de Barceló-Muñoz et al. (1990) para material juvenil de aguacate. Esta técnica proporcionó resultados muy satisfactorios, tanto en relación al posterior enraizamiento de los brotes (80%), como a la posterior aclimatación de las plántulas obtenidas (92%) (Perán-Quesada et al. 2004). La recuperación de brotes procedentes de ES también puede llevarse a cabo mediante microinjerto sobre patrones de semilla germinados *in vitro* (Raharjo y Litz 2005; Raharjo et al. 2008).

MATERIAL Y MÉTODOS

CONDICIONES GENERALES

Material vegetal

El material vegetal utilizado para la inducción de cultivos embriogénicos consistió en ZE inmaduros de aguacate (*Persea americana* Mill.) de 1-2 mm de longitud obtenidos de frutos de los cultivares 'Duke-7' y 'Anaheim' recolectados en la Estación Experimental La Mayora (Algarrobo-Costa, Málaga).

Medios de cultivo

Como medios de cultivo basales se utilizaron los medios MS, B5m, consistente en el medio MS con los macronutrientes del medio B5 de Gamborg (Gamborg et al. 1968), y M1 (Skene y Barlass 1983), consistente en la formulación MS a la mitad suplementada con 0,5 mg l⁻¹ de 6-bencilaminopurina (BAP). La composición específica de los distintos medios se representa en la tabla 1.

El pH de todos los medios se ajustó a 5,74 con NaOH (0,1 y 1N) y HCl (0,1 y 1N), tras lo cual se les añadió el agente gelificante. El agente gelificante se licuó tras 7 min de calentamiento en autoclave a 121°C y 0,1 MPa, y los medios se repartieron en alícuotas de 25 ml, en tubos de 25 x 150 mm (Bellco Glass) que se cubrieron con tapones de polipropileno (Bellco Glass INC. Kaputs). Los medios se esterilizaron en autoclave durante 15 min en las mismas condiciones de temperatura y presión citadas anteriormente.

Para la preparación de los medios de cultivo en placas de Petri, una vez ajustado el pH del medio y añadido el agente gelificante, se procedió a su licuación y esterilización en autoclave durante 20 min. Posteriormente, en condiciones de asepsia en una cabina de flujo laminar, se repartió el medio en alícuotas de 40 ml en placas de Petri de plástico estériles de 90 x 25 mm (Deltalab).

Para la preparación de las suspensiones embriogénicas, tras ajustar el pH y diluir hasta el volumen final, el medio de cultivo sin agente gelificante fue repartido en alícuotas de 40 ml en matraces Erlenmeyer de 100 ml. Los matraces fueron cubiertos con tapaderas de papel de aluminio y esterilizados en autoclave durante 20 min.

Tabla 1. Composición de los diferentes medios de cultivo utilizados.

	MS	B5m	M1
Macroelementos (mM)			
KNO ₃	18,80	24,73	9,40
NH ₄ NO ₃	20,61	-	10,30
MgSO ₄ · 7H ₂ O	1,50	1,01	0,75
KH ₂ PO ₄	1,25	-	0,62
NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O	-	1,08	-
CaCl ₂ · 2H ₂ O	2,99	1,02	1,50
(NH ₄) ₂ SO ₄	-	1,01	-
Microelementos (μM)			
H ₃ BO ₃	100	100	50,12
MnSO ₄ · 4H ₂ O	100	100	46,15
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	30	30	14,95
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	1,03	1,03	0,51
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0,10	0,10	0,05
CoCl ₂ · 6H ₂ O	0,10	0,10	0,05
KI	5,00	5,00	2,50
FeSO ₄ · 7H ₂ O	100	100	50
Na ₂ EDTA	127,6	127,6	63,81
Vitaminas (μM)			
Tiamina.HCl	0,30	0,30	0,15
Piridoxina.HCl	2,43	2,43	1,21
Ácido nicotínico	4,06	4,06	2,03
Aminoácidos (μM)			
Glicina	26,64	26,64	13,32
Azúcares (mM)			
Sacarosa	87,64	87,64	43,82
Polialcoholes (μM)			
mio-inositol	555	555	277,5
Reguladores de crecimiento (μM)			
BAP	-	-	2,22

Condiciones ambientales

Los cultivos se incubaron en una cámara de crecimiento con una temperatura constante de $25 \pm 1^\circ\text{C}$ y un fotoperiodo de 16 h de luz. Lámparas GroLux de Sylvania de espectro regular suministraron una irradiancia de $40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

La inducción y el mantenimiento de los cultivos embriogénicos, al igual que la maduración de los ES, se llevaron a cabo, salvo que se indique lo contrario, en condiciones de oscuridad. El cultivo de las suspensiones embriogénicas se realizó en condiciones de luz difusa ($5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) y la fase de germinación se llevó a cabo en condiciones estándar de iluminación.

Análisis estadístico

Los datos expresados como porcentajes fueron analizados por análisis de frecuencias utilizando el test de independencia $R \times C$ mientras que el resto de datos se analizaron mediante análisis de la varianza (ANOVA), estableciendo la diferencia entre medias con el test LSD. El nivel de significación fue 0,05 en todos los casos.

INDUCCIÓN DE CULTIVOS EMBRIOGÉNICOS

Los experimentos sobre inducción de cultivos embriogénicos se llevaron a cabo utilizando frutos de aguacate del cultivar 'Anaheim' de 1-2 cm de longitud. Siguiendo el protocolo de Pliego-Alfaro y Murashige (1988), tras retirar los sépalos y el pedúnculo, los frutillos fueron desinfectados en el interior de una cabina de flujo laminar sumergiéndolos durante 10 min en una solución de lejía comercial al 10% (v/v) con Tween 20 (2 gotas/100 ml). Posteriormente fueron enjuagados tres veces con agua destilada estéril y cortados longitudinalmente en condiciones de asepsia. Los ZE se extrajeron cuidadosamente de los frutillos (Fig. 3), separándolos del tejido endospermico del que estaban rodeados, y se cultivaron en medio de inducción MSPA, consistente en el medio MS suplementado con $0,1 \text{ mg l}^{-1}$ de picloram (MSP) y gelificado con 6 g l^{-1} de agar (A-1296 Sigma).

En los experimentos de inducción de cultivos embriogénicos se iniciaron 100 ZE por tratamiento. Tres subcultivos, de cinco semanas cada uno, después del inicio se tomaron datos de porcentaje de inducción de callo embriogénico y callo no embriogénico.



Figura 3. Fruto inmaduro de aguacate cortado longitudinalmente.

Efecto de la luz

En este experimento se evaluó el efecto de la intensidad de la luz en la inducción de cultivos embriogénicos de aguacate. ZE inmaduros fueron cultivados en medio estándar de inducción (MSPA) e incubados en tres condiciones distintas de iluminación: oscuridad (control), luz difusa ($5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) o luz directa ($40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$).

Efecto de los reguladores de crecimiento

En el siguiente ensayo se comprobó el efecto de distintos reguladores de crecimiento en el proceso de inducción de callo embriogénico. Para ello, se utilizaron como medios de inducción el medio de cultivo MSPA (control) y el medio MS suplementado con 2 mg l^{-1} de 2,4-D, $11,01 \text{ mg l}^{-1}$ de tidiazurón (TDZ) y 6 g l^{-1} de agar.

MANTENIMIENTO Y PROLIFERACIÓN DE CULTIVOS EMBRIOGÉNICOS

Los cultivos embriogénicos de aguacate se mantuvieron en las mismas condiciones de cultivo utilizadas para la fase de inducción: medio nutritivo MSPA y condiciones de oscuridad. Los subcultivos a medio fresco se llevaron a cabo cada cinco semanas seleccionando material con características embriogénicas, es decir, estructuras de color beige, aspecto translúcido y consistencia granular y friable. Este material estaba constituido por una mezcla de PEMs y ES en estadios tempranos de desarrollo (translúcidos y de 1-2 mm de longitud). El subcultivo a medio fresco implicaba también la discriminación del callo no embriogénico, de color grisáceo y textura blanda.

Efecto de la luz

De la misma forma que en la fase de inducción, también se testó el efecto de la intensidad de la luz sobre la proliferación de los cultivos embriogénicos. Para ello, se utilizaron las líneas D6 y D2.3 del cultivar 'Duke-7'. El experimento se inició cultivando 0,1 g de callo embriogénico en medio estándar de mantenimiento a tres intensidades de luz distintas: oscuridad, luz difusa ($5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) y luz directa ($40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Los cultivos fueron evaluados durante tres subcultivos de cinco semanas cada uno, tomándose datos de incremento de peso y aspecto (color, estado de agregación y presencia de ES). Se cultivaron 15 tubos por línea y por tratamiento.

DESARROLLO DE EMBRIONES SOMÁTICOS BLANCO-OPACOS

De acuerdo con Márquez-Martín et al. (en prensa), el desarrollo de ESBO se inició con el establecimiento de suspensiones embriogénicas. El material de partida utilizado fue 0,4 g de callo embriogénico procedente de dos líneas embriogénicas del cultivar 'Duke-7' (D6 y D2.3) que se encontraban en fase de mantenimiento. Se establecieron las suspensiones en 40 ml de medio líquido MSP. Los cultivos se mantuvieron en agitación orbital a 120 rpm en condiciones de luz difusa durante 9 días. Tras este periodo de tiempo, las suspensiones se filtraron secuencialmente a través de dos mallas, de 2 y 1 mm de tamaño de poro, respectivamente (Fig. 4).

Siguiendo el protocolo de Márquez-Martín et al. (en prensa) y salvo que se indique lo contrario, la fase de desarrollo de ESBO se inició cultivando 0,1 g de la fracción retenida entre ambas mallas en medio estándar de maduración, consistente en el medio B5m gelificado con 10 g l^{-1} de agar (B5m10a). En el subcultivo a medio fresco se cultivaron 0,2 g de callo embriogénico. Al final de cada subcultivo se tomaron datos de incremento de peso, aspecto, número de ESBO totales e iguales o mayores de 4 mm ($\text{ESBO} \geq 4 \text{ mm}$) por cultivo y porcentaje de regeneración de ESBO totales y $\text{ESBO} \geq 4 \text{ mm}$. La eficiencia de los diferentes tratamientos de maduración también se evaluó a través de la posterior capacidad de germinación de los ES obtenidos. Para ello, todos los $\text{ESBO} \geq 4 \text{ mm}$ desarrollados en cada uno de los tratamientos fueron puestos a germinar siguiendo la metodología puesta a punto por Perán-Quesada et al. (2004) tal y como se especifica en el apartado correspondiente de este capítulo. También se calculó el potencial de regeneración consistente en el número de ES por cultivo iniciado en la fase de maduración que dieron lugar a plantas con tallo o tallo y raíz.

En los primeros experimentos que se realizaron, la fase de maduración se llevó a cabo durante tres subcultivos, de cinco semanas cada uno. Al comprobar que los ES procedentes del tercer subcultivo de maduración nunca germinaron, la duración de los experimentos se redujo a dos subcultivos. En cada experimento se iniciaron 25 tubos por línea embriogénica y tratamiento.

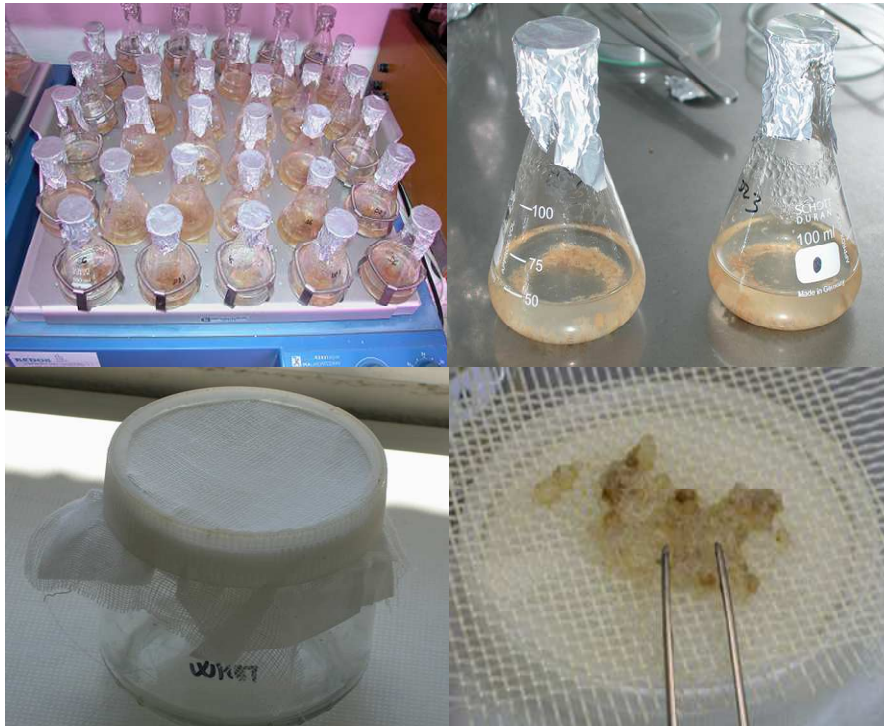


Figura 4. Establecimiento, proliferación y filtración de suspensiones embriogénicas de aguacate siguiendo el protocolo de Márquez-Martín et al. (en prensa).

Efecto de la inclusión de una fase de predesarrollo

El objetivo de este experimento fue comprobar si una etapa intermedia de predesarrollo puede mejorar, de acuerdo con von Arnold et al. (2002), la formación de ES maduros en aguacate.

Para ello, una vez concluida la fase de cultivo como suspensiones embriogénicas, el material seleccionado fue transferido a medio de predesarrollo, consistente en medio B5m gelificado con 6 g l⁻¹ de agar (B5m6a), en el que se mantuvo durante un subcultivo de cinco semanas. Posteriormente, y basándonos en trabajos previos llevados a cabo por nuestro grupo de investigación (Márquez-Martín 2007; Márquez-Martín et al. 2009; Márquez-Martín et al. 2011), los cultivos fueron transferidos a tres medios de maduración diferentes.

En estudios previos llevados a cabo por Márquez-Martín et al. (2009) se comprobó que ZE inmaduros cultivados en medio B5m6a con un suplemento extra de 30 g l⁻¹ de sacarosa y de los aminoácidos de Jensen (Jensen 1977) (B56A60saaJ), maduraban siguiendo el patrón previamente establecido para ZE (Perán-Quesada et al. 2005) y presentaban tasas de germinación significativamente más elevadas que ZE que habían madurado en medio basal (B5m). Sin embargo, estos resultados no fueron reproducidos cuando el mismo tratamiento fue aplicado directamente a ES (Márquez-Martín 2007). Por otro lado, Márquez-Martín et al. (2011) encontraron que una concentración elevada de agar (10 g l⁻¹) daba lugar a un aumento significativo de la producción de ESBO.

Así, en un primer tratamiento, cultivos procedentes de medio de predesarrollo, se traspasaron al medio B56A60saaJ (T1). En el segundo tratamiento, la transferencia se realizó al medio B5m10a (T2) y en el tercero el medio utilizado fue B5m6a suplementado con 10 µM de ABA (T3) (Fig. 5). En los tres casos, los cultivos se mantuvieron en los medios mencionados durante dos subcultivos de cinco semanas cada uno. También se incluyó un tratamiento control en el que el material procedente de la filtración de las suspensiones embriogénicas fue cultivado directamente en medio B5m10a, sin ser sometido a una etapa de predesarrollo previa.

En este experimento, los ESBO ≥ 4 mm obtenidos no fueron sometidos a posterior germinación.

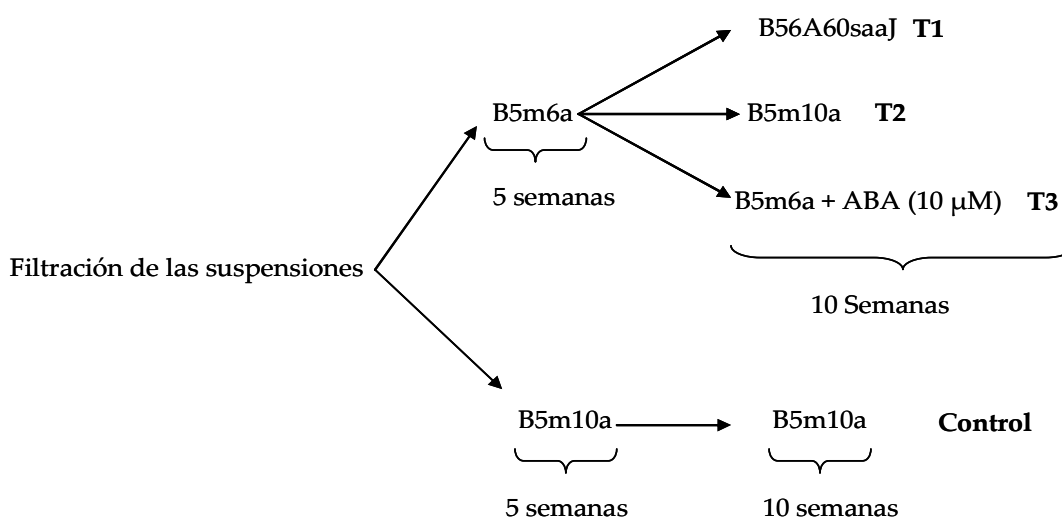


Figura 5. Esquema representativo del experimento en el que se evalúa el efecto de la inclusión de una fase de predesarrollo.

Efecto del tamaño del inóculo

La sincronización de los cultivos producida gracias a la filtración de suspensiones embriogénicas puede tener una gran influencia en la posterior regeneración de ES maduros. En este experimento se evaluó el efecto del tamaño del inóculo en la producción de ESBO y en la posterior capacidad de germinación de los mismos.

Se testaron los siguientes tratamientos: fracción retenida entre ambas mallas ($F \leq 2$), fracción retenida en la malla de 2 mm de tamaño de poro ($F > 2$) y fracción compuesta por las dos fracciones anteriores cultivadas de forma conjunta ($F > 2 + F \leq 2$) (Fig. 6).

Efecto de la densidad de inóculo

La densidad de cultivo ha sido descrita como un factor relevante a la hora de llevar a cabo la fase de desarrollo y maduración de ES (Montalbán et al. 2010).

Para estudiar el efecto de la densidad de cultivo en el desarrollo de ESBO y su posterior capacidad de germinación, se probaron cuatro densidades de inóculo distintas: 0,025 g, 0,050 g, 0,100 g y 0,250 g. Estas cuatro densidades fueron utilizadas tanto en el inicio de la fase de desarrollo como en los posteriores subcultivos.

Al utilizar densidades iniciales distintas, en este experimento el crecimiento de los cultivos se determinó calculando el incremento de peso relativo, $\Delta Pr = (Pf - Pi)/Pi$, donde ΔPr es el incremento de peso relativo, Pi es el peso fresco (PF) inicial y Pf el PF final.

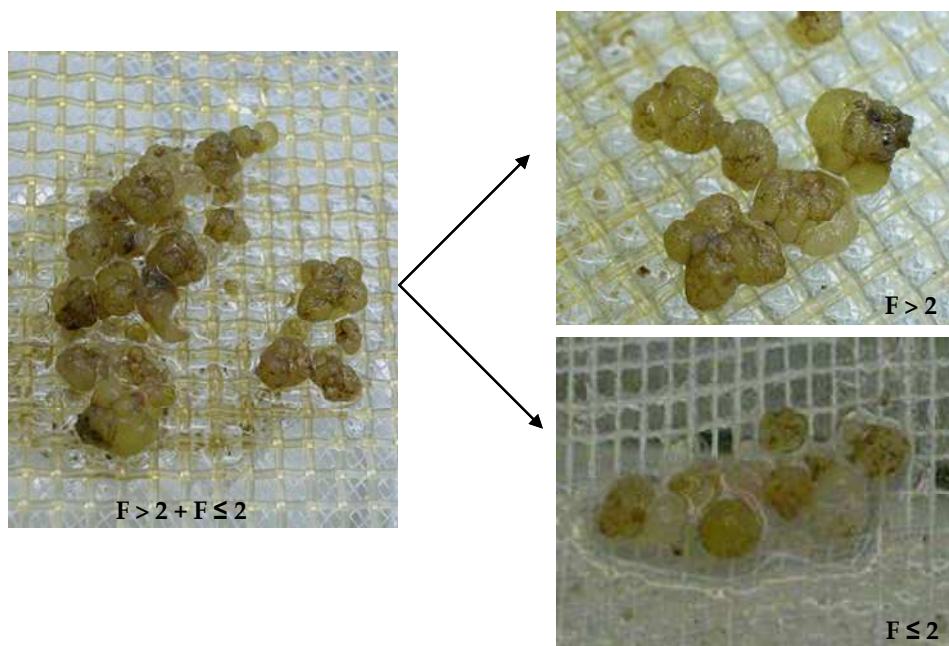


Figura 6. Aspecto de las fracciones de distinto tamaño utilizadas en el experimento.

Efecto del recipiente de cultivo y del material subcultivado

En la elección del recipiente de cultivo más adecuado para cada fase del proceso embriogénico debe tenerse en cuenta que una limitación espacial puede interferir en la proliferación del cultivo así como en el intercambio gaseoso con el exterior (Bateson et al. 1987). Por otra parte, el tipo de recipiente también condiciona la forma de llevar a cabo el subcultivo ya que, como ocurre en los tubos, puede limitar la cantidad de material que puede ser subcultivado.

En este experimento, se estudió el efecto del tipo de recipiente en el que se llevó a cabo la maduración, así como del material seleccionado para el subcultivo.

Se probaron los siguientes recipientes: tubos de 25 x 150 mm (Bellco Glass) cubiertos con tapones de polipropileno (Bellco Glass INC. Kaputs), frascos de 66 x 59 mm (V-8630 Sigma) cubiertos con tapaderas de polipropileno (Magenta™ B-cap) y placas de Petri de 90 x 25 mm (Deltalab) selladas con Parafilm® (Fig. 7).

En el caso del frasco y de la placa se llevaron a cabo dos tipos de subcultivo diferentes: recultivo de todo el material que tuviese buen aspecto y características embriogénicas (peso variable) (A) o subcultivo de solo 0,2 g de material con las mismas características (B). Cuando el cultivo se llevó a cabo en tubos (tratamiento control), solo fue posible el subcultivo de 0,2 g del material indicado anteriormente.

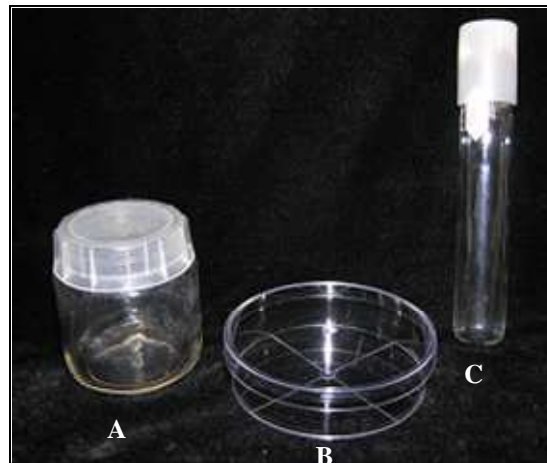


Figura 7. Recipientes utilizados en el experimento: (A) frasco, (B) placa de Petri y (C) tubo.

Efecto de la luz en la fase de proliferación

Las condiciones de cultivo durante la fase de mantenimiento pueden afectar a fases sucesivas del proceso embriogénico (Bozhkov et al. 2002; Márquez-Martín et al. en prensa).

En este experimento, el mantenimiento de los cultivos se llevó a cabo durante tres subcultivos de cinco semanas cada uno en tres condiciones de luz distintas: luz directa ($40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), luz difusa ($5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) y oscuridad. Durante este periodo se tomaron datos de incremento de peso y de aspecto general de los cultivos. Posteriormente, se inició la fase de desarrollo de ESBO en condiciones estándar de oscuridad.

Como consecuencia de los resultados obtenidos en experimentos anteriores solo se tomaron datos durante dos subcultivos, de cinco semanas cada uno.

Efecto de la luz en la fase de desarrollo

La luz puede jugar un papel determinante en el desarrollo de los ES (George y Davies 2008) pero esta influencia debe ser comprobada de forma concreta para cada especie (Merkle et al. 1995).

En este experimento se evaluó el efecto de la luz en la fase de maduración de ES y su posterior repercusión en la germinación de los mismos. Tras la filtración de las suspensiones embriogénicas, el material seleccionado se cultivó en medio estándar de desarrollo de ESBO (B5m10a) en las tres condiciones lumínicas citadas anteriormente: luz directa, luz difusa y oscuridad.

Como consecuencia de los resultados obtenidos en experimentos anteriores, solo se realizaron dos subcultivos, de cinco semanas cada uno.

GERMINACIÓN DE EMBRIONES SOMÁTICOS

Paralelamente se realizaron experimentos propios de la fase de germinación con ESBO obtenidos utilizando el protocolo estándar de maduración establecido por Márquez-Martín et al. (2011). De acuerdo con Perán-Quesada et al. (2004) y salvo que se indique lo contrario, la germinación se llevó a cabo mediante eliminación parcial de los cotiledones y cultivo en medio M1 gelificado con $1,7 \text{ g l}^{-1}$ gelrite, durante dos subcultivos de cinco semanas cada uno en condiciones de luz.

Como criterio de germinación se estableció la formación de tallo o raíz igual o mayor de 2 mm. Al final de cada subcultivo se tomaron datos de porcentaje de germinación, tipo

de germinación (desarrollo de tallo, raíz o tallo y raíz), longitud de las estructuras desarrolladas y aspecto de las plántulas obtenidas.

Para la realización de estos experimentos se utilizaron ESBO ≥ 4 mm procedentes de las líneas embriogénicas D6 y D2.3 del cultivar 'Duke-7'. En cada ensayo se cultivaron 30 embriones por línea y por tratamiento.

Efecto del tamaño y del tipo de embrión

Se evaluó la influencia del tamaño y de las características morfológicas de los ES en la germinación de los mismos. Para ello, se utilizaron cuatro tipos de ES: embriones traslúcidos de tamaño igual o superior a 4 mm ($ES_{t} \geq 4$ mm), embriones traslúcidos de tamaño inferior a 4 mm ($ES_{t} < 4$ mm), ESBO ≥ 4 mm y ESBO < 4 mm.

Efecto del agente gelificante

En este experimento se testó la influencia del agente gelificante en la germinación de ESBO. Los ESBO fueron cultivados en medio M1 gelificado con agar o gelrite a las concentraciones estándar de 6 g l^{-1} y $1,7 \text{ g l}^{-1}$, respectivamente.

RESULTADOS

INDUCCIÓN DE CULTIVOS EMBRIOGÉNICOS

Efecto de la luz

La intensidad de la luz afectó de forma significativa a la inducción de cultivos embriogénicos de aguacate. Así, los valores más elevados se obtuvieron en condiciones de oscuridad (20%) (Fig. 8). El porcentaje de inducción disminuyó de forma gradual conforme se aumentó la irradiancia lumínica hasta alcanzar el valor mínimo (3%) a una irradiancia de $40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. La tendencia inversa fue observada en la inducción de callo no embriogénico. La luz directa favoreció la formación de este tipo de callo mientras que su desarrollo se vio minimizado en condiciones de oscuridad.

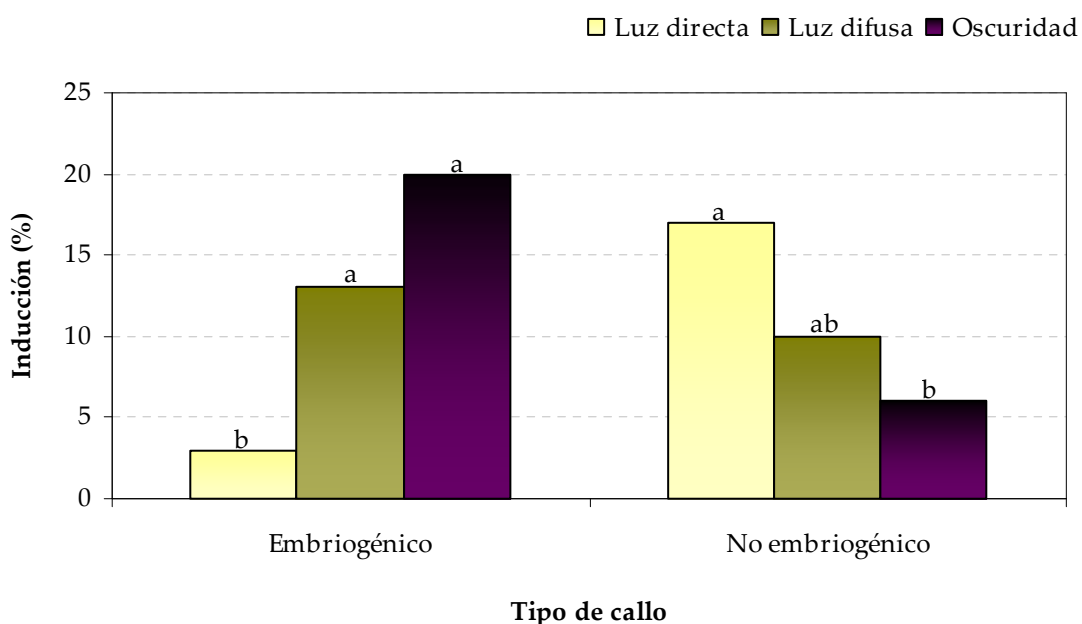


Figura 8. Efecto de las condiciones lumínicas en la inducción de callo embriogénico y no embriogénico de aguacate. Letras distintas indican diferencias significativas según análisis de frecuencias al 5%.

Efecto de los reguladores de crecimiento

En este experimento se testó el efecto de diferentes reguladores de crecimiento en la inducción de cultivos embriogénicos. La combinación de 2,4-D y TDZ aumentó significativamente el porcentaje de inducción de callo embriogénico respecto al obtenido con picloram, de un 16% a un 28% (Tabla 2). Además, en los cultivos inducidos con 2,4-D y TDZ no se observó producción de callo no embriogénico, mientras que en el 10% de los

cultivos en los que el regulador de crecimiento utilizado fue el picloram, este fue el tipo de callo predominante.

Tabla 2. Efecto de los reguladores de crecimiento en la inducción de cultivos embriogénicos y no embriogénicos de aguacate. Letras distintas indican diferencias significativas según análisis de frecuencias al 5%.

Tipo de callo	Inducción (%)	
	Picloram	2,4-D + TDZ
Embriogénico	16 b	28 a
No embriogénico	10 a	0 b

MANTENIMIENTO Y PROLIFERACIÓN DE CULTIVOS EMBRIOGÉNICOS

Efecto de la luz

Las condiciones lumínicas tuvieron una influencia significativa sobre la proliferación de los cultivos embriogénicos (Fig. 9). Mientras que en oscuridad se alcanzaron los valores más elevados de incremento de peso, el cultivo en luz directa provocó un descenso significativo de la proliferación. Los cultivos incubados en luz difusa registraron una tasa de crecimiento intermedia, sin diferencias significativas con los cultivos incubados en oscuridad. No obstante, hay que destacar que las diferencias solo se observaron en el primer y segundo subcultivo. En el tercero la proliferación fue prácticamente idéntica en los tres casos.

El aspecto general de los cultivos después de tres subcultivos en distintas condiciones de luz se refleja en la figura 10. En aquellos cultivos sometidos a luz directa, se observó la formación de estructuras de gran tamaño, con aspecto no uniforme, que con el paso de los subcultivos se endurecieron y adquirieron aspecto calcificado. Estas estructuras también se dieron en los cultivos mantenidos en luz difusa aunque en menor proporción. En oscuridad, no se observó este tipo de formaciones y la mayor parte del cultivo estaba constituido por callo embriogénico fácilmente disgregable. No obstante, en la mayoría de los cultivos mantenidos en oscuridad se observó la formación de callo no embriogénico, tipo de tejido que no se daba en los cultivos procedentes de luz.

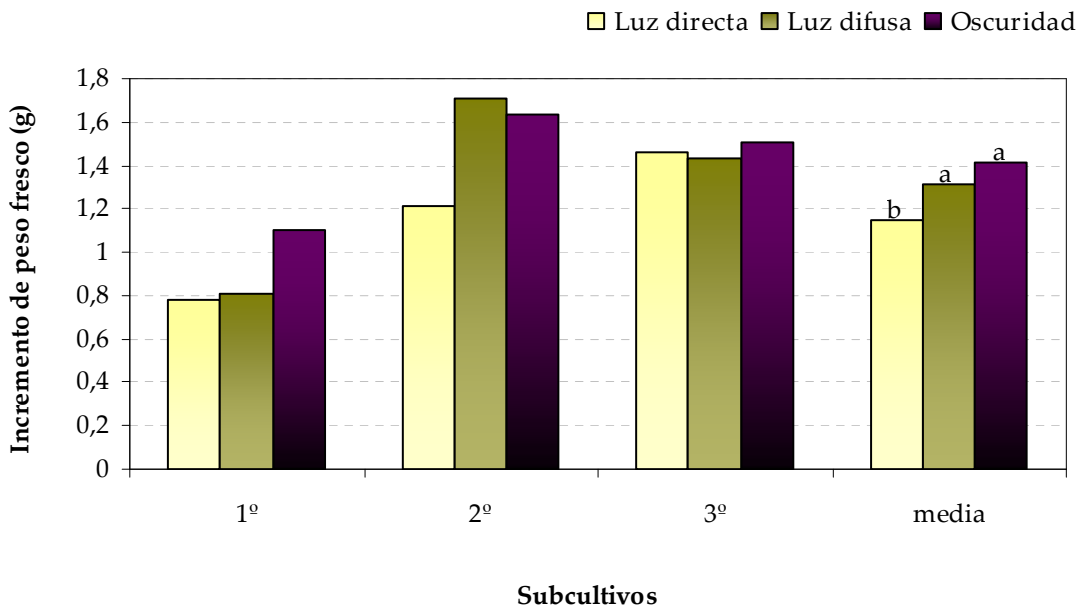


Figura 9. Efecto de las condiciones lumínicas en el incremento de PF de los cultivos embriogénicos durante la fase de mantenimiento. Datos tomados durante tres subcultivos de cinco semanas. Letras distintas indican diferencias significativas según ANOVA al 5%.

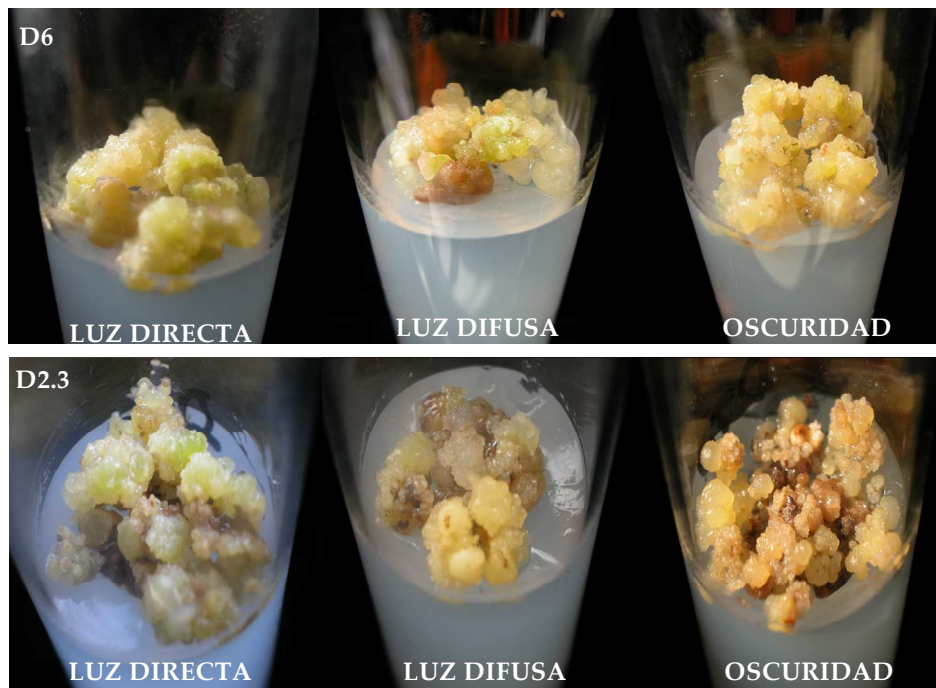


Figura 10. Aspecto de los cultivos embriogénicos tras tres subcultivos en medio de proliferación en condiciones de luz distintas.

DESARROLLO DE EMBRIONES SOMÁTICOS BLANCO-OPACOS

Efecto de la inclusión de una fase de predesarrollo

La proliferación de los cultivos durante la fase de desarrollo no se vio influenciada por la inclusión de una fase de predesarrollo, ni por ninguno de los tratamientos de maduración testados (datos no mostrados).

Ninguno de los tres tratamientos en los que se incluía una fase de predesarrollo mejoró la formación de ES respecto al control, ni cuando se consideró el porcentaje de regeneración de ESBO (datos no mostrados) ni cuando se cuantificó la producción de este tipo de embriones por cultivo (Fig. 11). El mismo efecto se observó para los ESBO ≥ 4 mm (Fig. 12).

El mantenimiento de los cultivos en medio de desarrollo durante distintos subcultivos provocó una disminución en la producción de ESBO siendo esta nula en el tercer subcultivo.

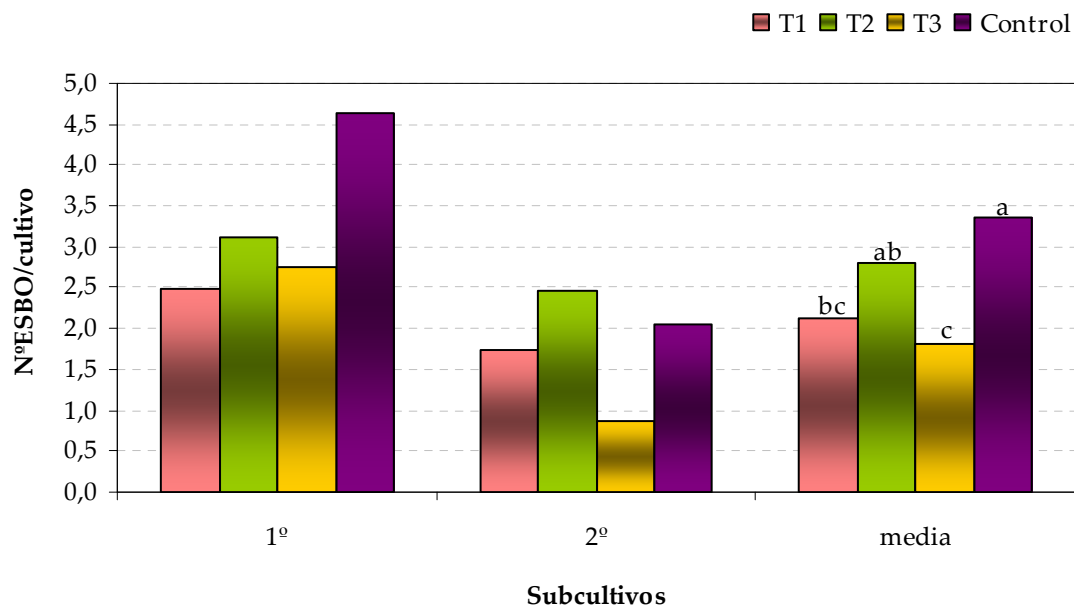


Figura 11. Efecto de la inclusión de una fase de predesarrollo y de los suplementos de sacarosa, ABA y los aminoácidos de Jensen en el número de ESBO por cultivo. Letras distintas indican diferencias significativas según ANOVA al 5%.

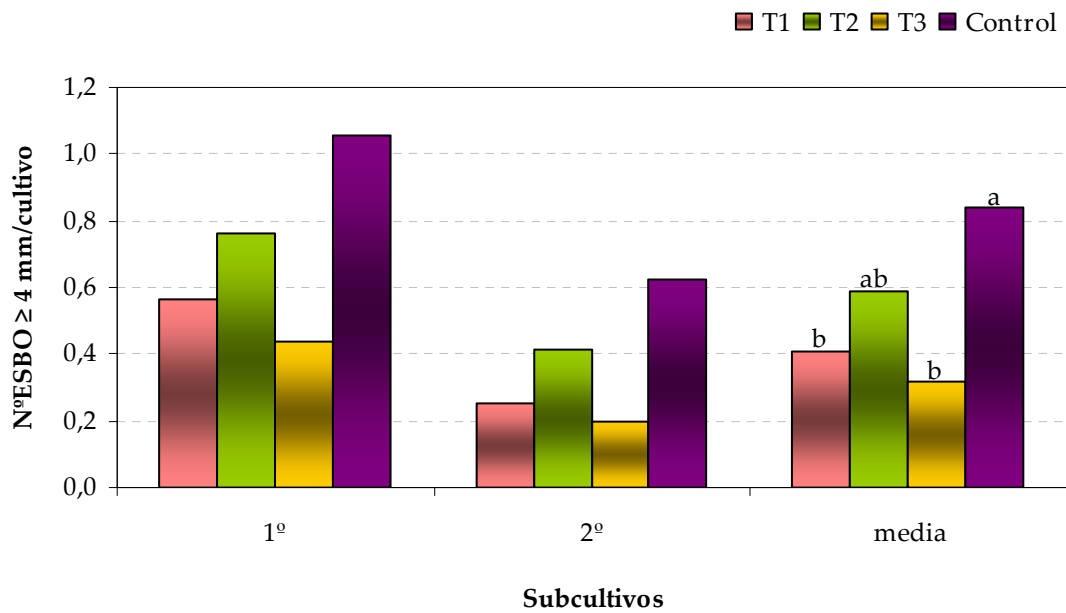


Figura 12. Efecto de la inclusión de una fase de predesarrollo y de los suplementos de sacarosa, ABA y los aminoácidos de Jensen en el número de ESBO ≥ 4 mm por cultivo. Letras distintas indican diferencias significativas según ANOVA al 5%.

Efecto del tamaño del inóculo

El tamaño del inóculo utilizado para iniciar la fase de maduración tuvo una gran influencia sobre el aspecto de los cultivos (Fig. 13) y la proliferación de los mismos (Fig. 14). Con $F \leq 2$ se obtuvieron valores de incremento de peso significativamente más elevados que con $F > 2$. El uso combinado de ambas fracciones dio lugar a valores intermedios.

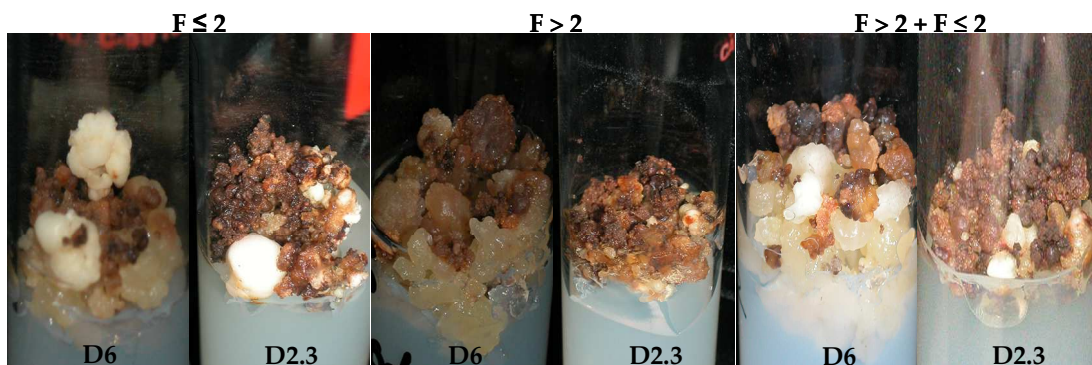


Figura 13. Aspecto de cultivos embriogénicos de aguacate en medio de desarrollo de ES iniciados a partir de inóculos de diferente tamaño.

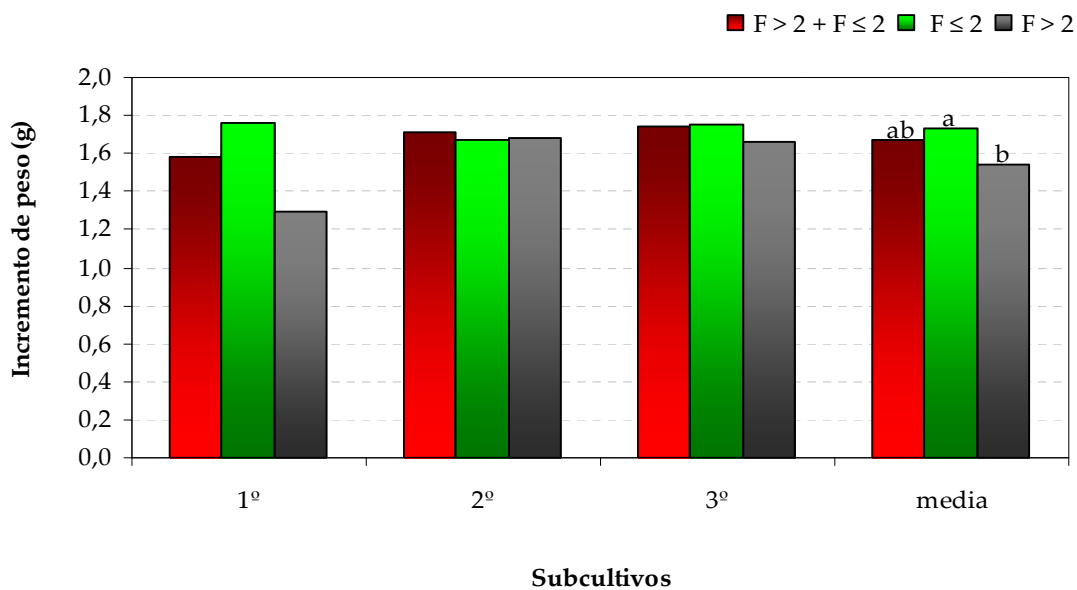


Figura 14. Efecto del tamaño del inóculo en el incremento de PF de los cultivos embriogénicos en medio de desarrollo de ES. Datos tomados durante tres subcultivos de cinco semanas. Letras distintas indican diferencias significativas según ANOVA al 5%.

Respecto a la formación de ESBO, también se observaron diferencias significativas entre los distintos tipos de inóculo, tanto en el porcentaje de regeneración (Fig. 15) como en el número de ESBO desarrollados por cultivo (Fig. 16). En lo que se refiere al porcentaje de regeneración de ESBO, el valor máximo se obtuvo utilizando la fracción más pequeña ($F \leq 2$). Estos resultados son coincidentes con los obtenidos para el número de ESBO por cultivo, donde la fracción más pequeña dio lugar a una media de 1,89 ESBO, frente a 1,45 y 0,80 para $F > 2 + F \leq 2$ y $F > 2$, respectivamente.

En relación al porcentaje de regeneración de $ESBO \geq 4$ mm, aunque la tendencia fue la misma que la observada en ESBO totales, las diferencias no fueron significativas (Fig. 17). Por el contrario, el número de este tipo de embriones por cultivo si se vio significativamente favorecido cuando $F \leq 2$ fue la fracción usada para iniciar los cultivos (Fig. 18).

También pudo observarse un efecto del subcultivo que provocó una disminución en la producción de ESBO. Esta influencia fue más patente en $ESBO \geq 4$ mm que en ESBO totales.

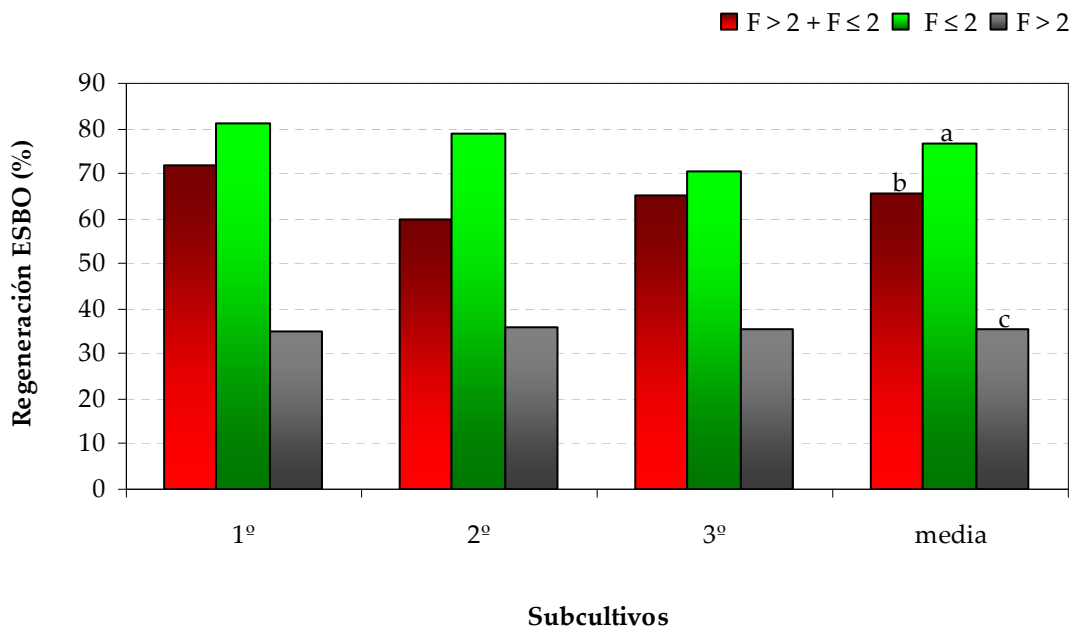


Figura 15. Efecto del tamaño del inóculo en la regeneración de ESBO. Datos tomados durante tres subcultivos de cinco semanas. Letras distintas indican diferencias significativas mediante análisis de frecuencias al 5%.

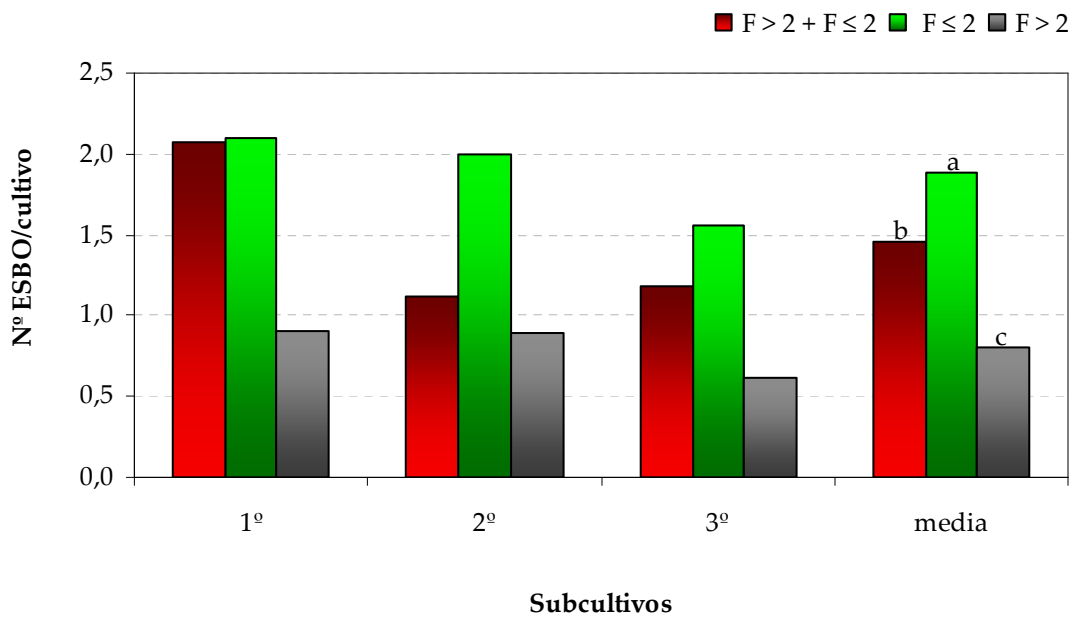


Figura 16. Efecto del tamaño del inóculo en el número de ESBO por cultivo. Datos tomados durante tres subcultivos de cinco semanas. Letras distintas indican diferencias significativas según ANOVA al 5%.

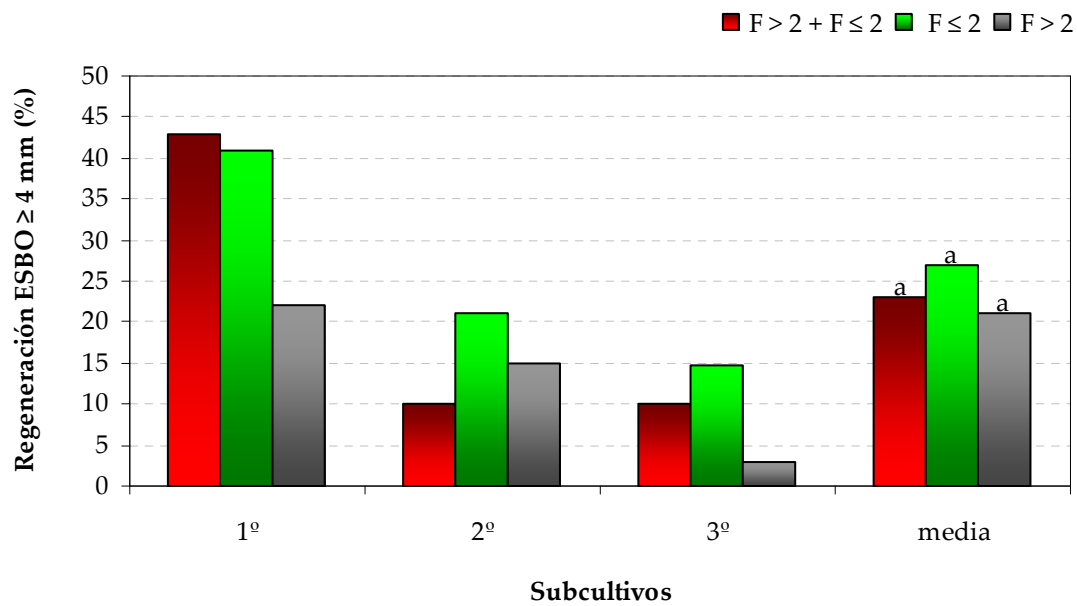


Figura 17. Efecto del tamaño del inóculo en la regeneración de ESBO ≥ 4 mm. Datos tomados durante tres subcultivos de cinco semanas. Letras distintas indican diferencias significativas mediante análisis de frecuencias al 5%.

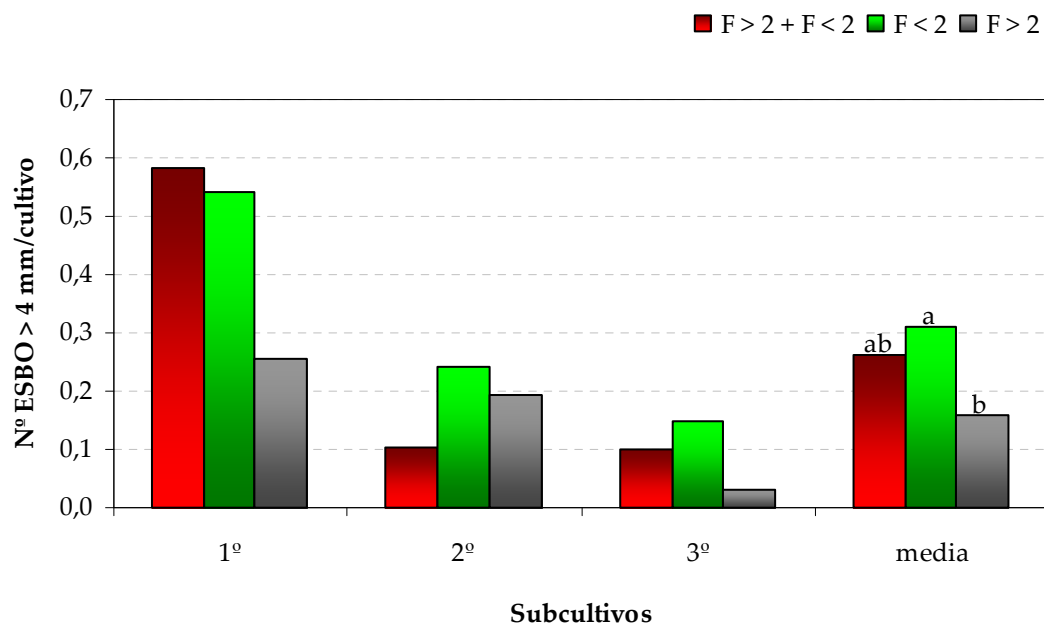


Figura 18. Efecto del tamaño del inóculo en el número ESBO ≥ 4 mm por cultivo. Datos tomados durante tres subcultivos de cinco semanas. Letras distintas indican diferencias significativas según ANOVA al 5%.

Respecto a la germinación de los ESBO ≥ 4 mm obtenidos en el primer y segundo subcultivo de maduración, aquellos procedentes de la fracción inicial más pequeña ($F \leq 2$) germinaron con un porcentaje significativamente más elevado que los embriones

procedentes de los otros tratamientos (Fig. 19). De los embriones obtenidos en el tercer subcultivo de maduración, no germinó ninguno. El potencial de regeneración también fue significativamente superior cuando la fracción utilizada fue $F \leq 2$ (datos no mostrados). Las plántulas obtenidas sólo desarrollaron tallos, con una longitud media de 1,86 cm, y varias hojitas (Fig. 20); no observándose diferencias significativas debidas a los distintos tratamientos (datos no mostrados). En ningún caso se observó la formación de raíces.

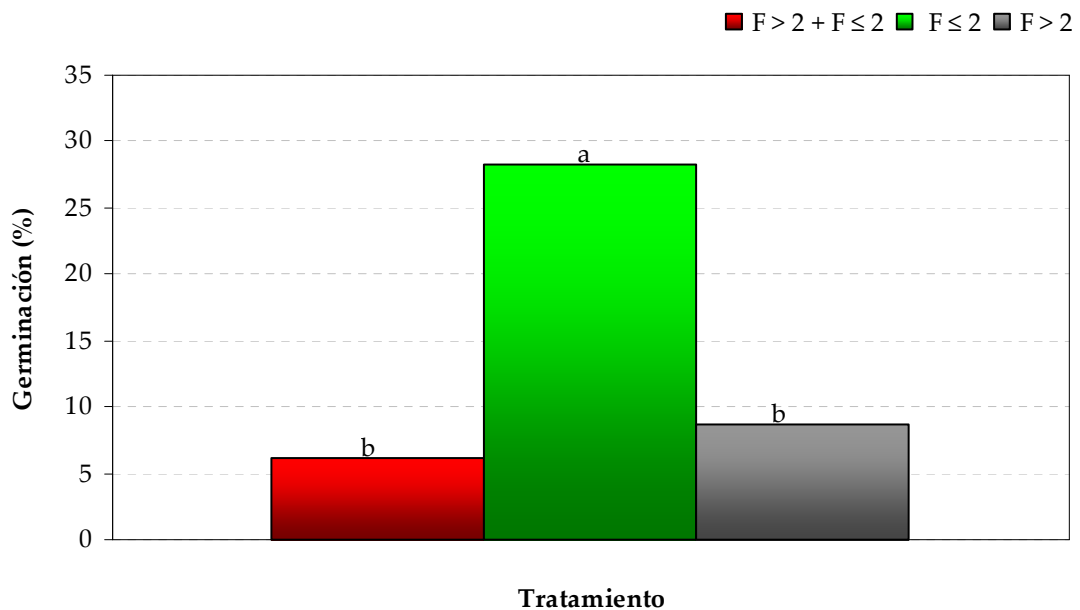


Figura 19. Efecto del tamaño del inóculo en la posterior germinación de ESBO ≥ 4 mm obtenidos durante el primer y segundo subcultivo de maduración. Letras distintas indican diferencias significativas mediante análisis de frecuencias al 5%.



Figura 20. Brote procedente de la germinación de un ES.

Efecto de la densidad de inóculo

El incremento de peso relativo de los cultivos embriogénicos en medio de desarrollo de ES disminuyó progresivamente a medida que aumentó la densidad de inóculo (Fig. 21). Independientemente de la densidad de cultivo utilizada, se observó un descenso en el crecimiento de los cultivos conforme aumentó el número de subcultivos.

La densidad de inóculo también afectó de forma significativa al desarrollo de ESBO. Entre 0,025 y 0,100 g se observó una relación lineal entre esta variable y el porcentaje de regeneración de ESBO, con valores más altos conforme aumentaba la densidad de inóculo (Fig. 22). A partir de 0,100 g, se observó un descenso de la tasa de regeneración que alcanzó el peor dato (52%) cuando los cultivos se iniciaron con 0,250 g. El número de ESBO por cultivo se vio influenciado de la misma forma que el porcentaje de regeneración de los mismos (Fig. 23).

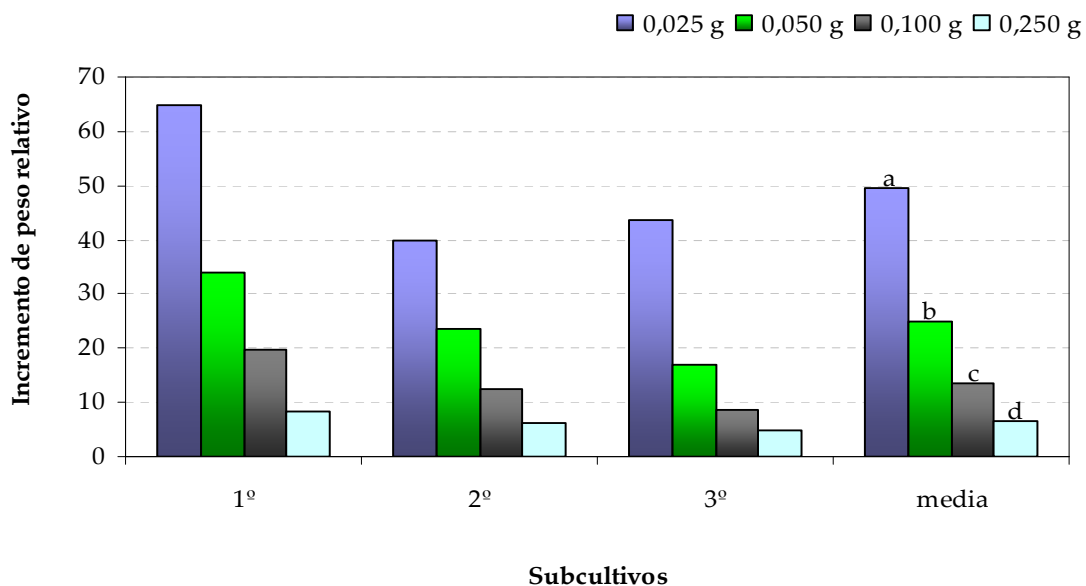


Figura 21. Efecto de la densidad de inóculo en el incremento de peso relativo de los cultivos embriogénicos en medio de desarrollo de ES. Datos tomados durante tres subcultivos de cinco semanas. Letras distintas indican diferencias significativas según ANOVA al 5%.

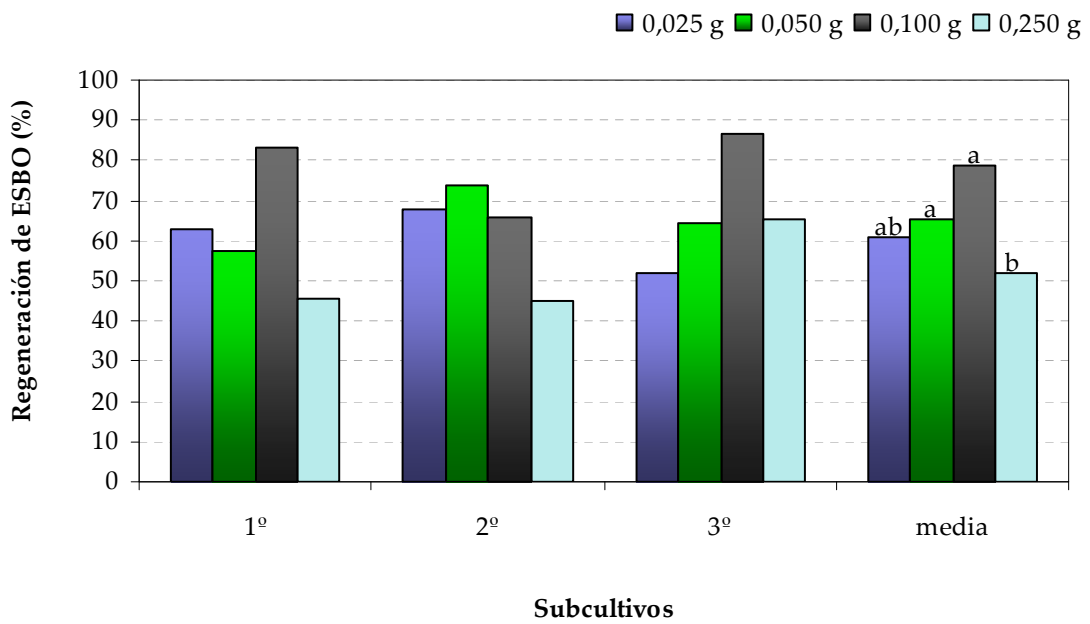


Figura 22. Efecto de la densidad de inóculo en la regeneración de ESBO. Datos tomados durante tres subcultivos de cinco semanas. Letras distintas indican diferencias significativas obtenidas por análisis de frecuencias al 5%.

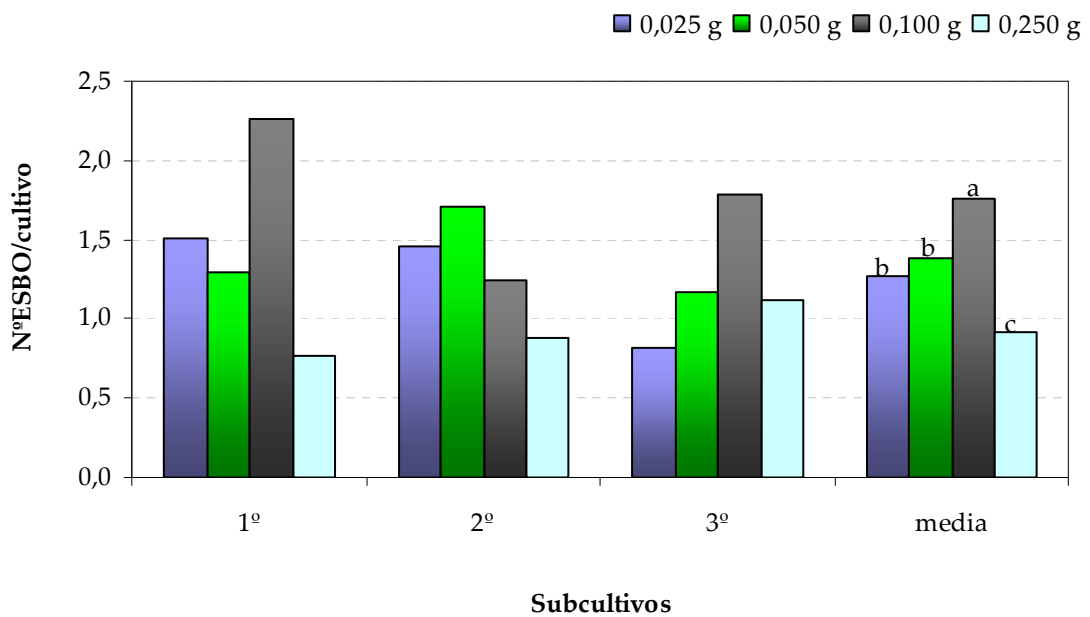


Figura 23. Efecto de la densidad de inóculo en el número de ESBO por cultivo. Datos tomados durante tres subcultivos de cinco semanas. Letras distintas indican diferencias significativas obtenidas por ANOVA al 5%.

En la figura 24 se muestran los resultados de regeneración de ESBO ≥ 4 mm. En ellos puede observarse como la única densidad que afectó negativamente a la regeneración de este tipo de embriones fue 0,250 g. A diferencia de cuando se consideraban de modo general todos los ESBO, el desarrollo de ESBO ≥ 4 mm se vio ligeramente favorecido por las densidades de inóculo más bajas (0,025 y 0,050 g). El número de ESBO ≥ 4 mm por cultivo, siguió la misma tendencia que el porcentaje de regeneración de este tipo de embriones (datos no mostrados). Respecto al descenso de la producción de este tipo de embriones como consecuencia del subcultivo, éste fue visible en todos los tratamientos, aunque se produjo de forma más drástica en densidades medias y altas.

En la posterior germinación de los ESBO ≥ 4 mm obtenidos en el primer y segundo subcultivo de maduración, no se observaron diferencias significativas ni en el porcentaje de germinación (Fig. 25) ni el potencial de regeneración (datos no mostrados). No obstante, entre los embriones madurados en los distintos tratamientos, el valor de germinación más elevado se obtuvo con embriones procedentes de cultivos iniciados con 0,050 g de inóculo (12,50% frente a 6,67%, 5,88% y 4,55% en el resto de tratamientos). En todos los casos en los que hubo germinación solo se observó la formación de tallos (1 ó 2 con una longitud media de 2,20 cm), no observándose diferencias significativas entre los distintos tratamientos. Ninguno de los ESBO ≥ 4 mm obtenidos en el tercer subcultivo de maduración germinó.

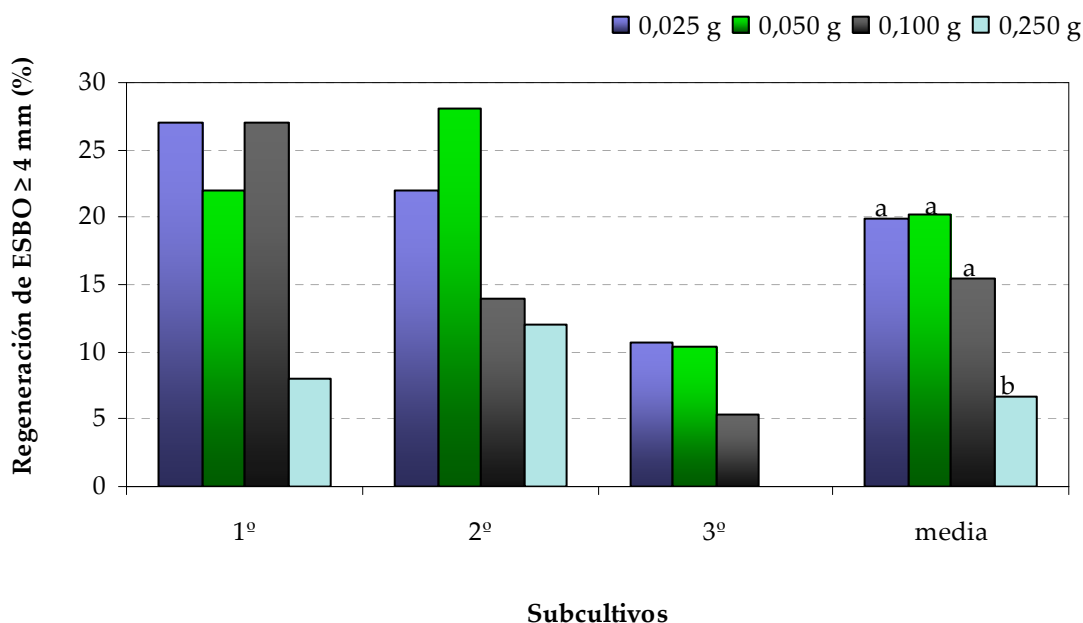


Figura 24. Efecto de la densidad de inóculo en la regeneración de ESBO ≥ 4 mm. Datos tomados durante tres subcultivos de cinco semanas. Letras distintas indican diferencias significativas obtenidas por análisis de frecuencias al 5%.

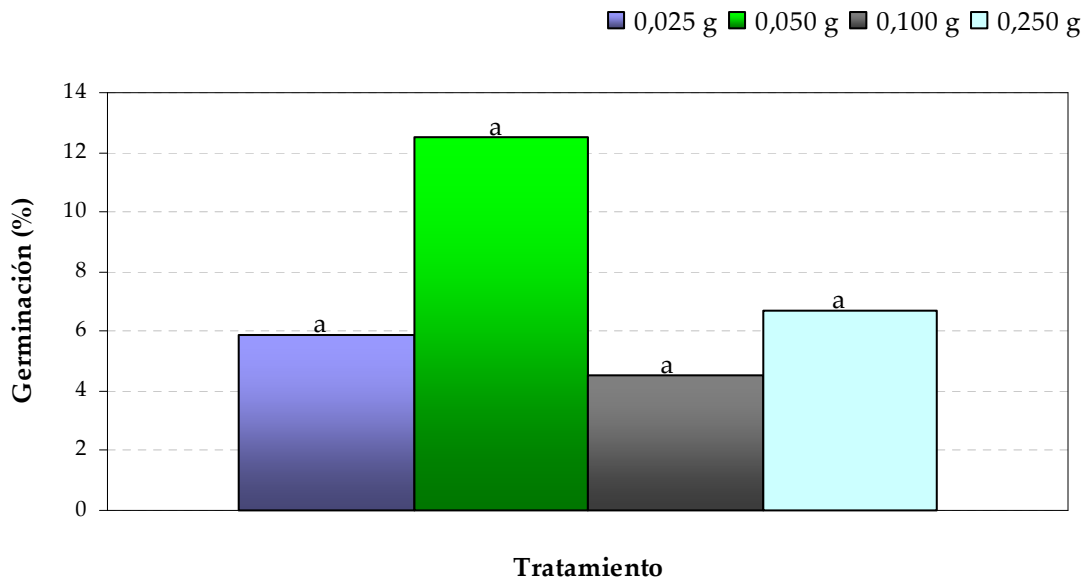


Figura 25. Efecto de la densidad de inóculo en la posterior germinación de ESBO ≥ 4 mm obtenidos durante el primer y segundo subcultivo de maduración. Letras distintas indican diferencias significativas obtenidas por análisis de frecuencias al 5%.

Efecto del recipiente de cultivo y del material subcultivado

Tanto el tipo de recipiente de cultivo como la forma de subcultivo influyeron de forma significativa en el incremento de peso relativo de los cultivos embriogénicos en medio de desarrollo (Fig. 26). La utilización de frascos con subcultivo tipo B dio lugar a valores de incremento de peso relativo significativamente más altos que el resto de tratamientos. El subcultivo tipo A provocó un descenso significativo en el incremento de peso relativo de los cultivos para ambos tipos de recipientes, frascos y placas de Petri.

La utilización tanto de placas como de frascos aumentó significativamente el porcentaje de regeneración de ESBO en comparación con los tubos. Los resultados obtenidos fueron muy elevados sin observarse diferencias debidas a la forma de subcultivo (A o B) en ninguno de los casos (Fig. 27). El número de ESBO por cultivo ofreció resultados que siguieron una tendencia parecida pero acentuando las diferencias entre los distintos tipos de recipiente (Fig. 28). Los valores de producción más elevados se obtuvieron con los frascos, no observándose diferencias significativas entre las dos formas de subcultivo testadas.

Resultados similares, tanto de porcentaje de regeneración como de número de embriones producidos por cultivo, se obtuvieron para los ESBO ≥ 4 mm (datos no mostrados). No obstante, durante el tercer subcultivo solo se observó el desarrollo de este tipo de embriones en frascos.

La germinación de los ES obtenidos en el primer y segundo subcultivo de maduración tuvo lugar sin que se observaran diferencias significativas debidas al tipo de recipiente ni a la forma de subcultivo (Fig. 29). Tampoco se observaron diferencias significativas en el potencial de regeneración (datos no mostrados).

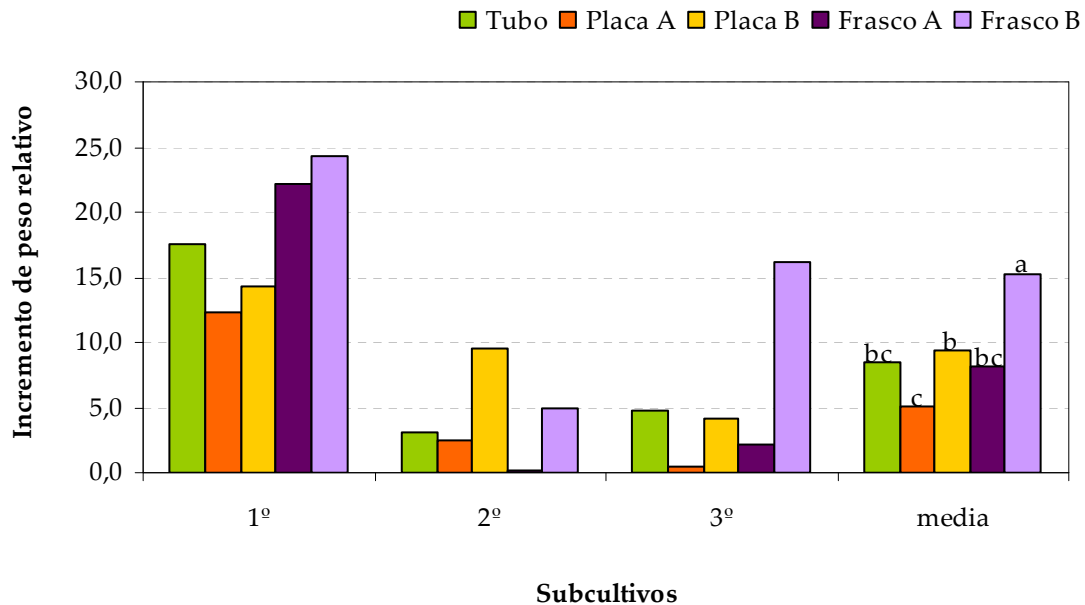


Figura 26. Efecto del recipiente de cultivo y del material subcultivado en el incremento de peso relativo de los cultivos embriogénicos en medio de desarrollo de ES. Datos tomados durante tres subcultivos de cinco semanas. Letras distintas indican diferencias significativas según ANOVA al 5%.

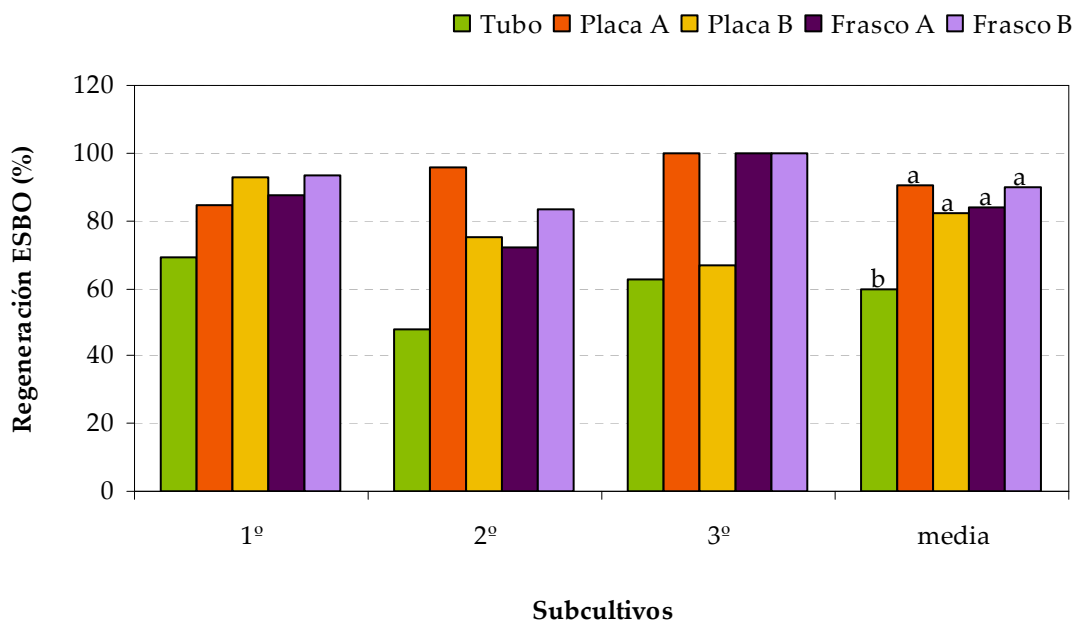


Figura 27. Efecto del recipiente de cultivo y del material subcultivado en la regeneración de ESBO. Datos tomados durante tres subcultivos de cinco semanas. Letras distintas indican diferencias significativas obtenidas por análisis de frecuencias al 5%.

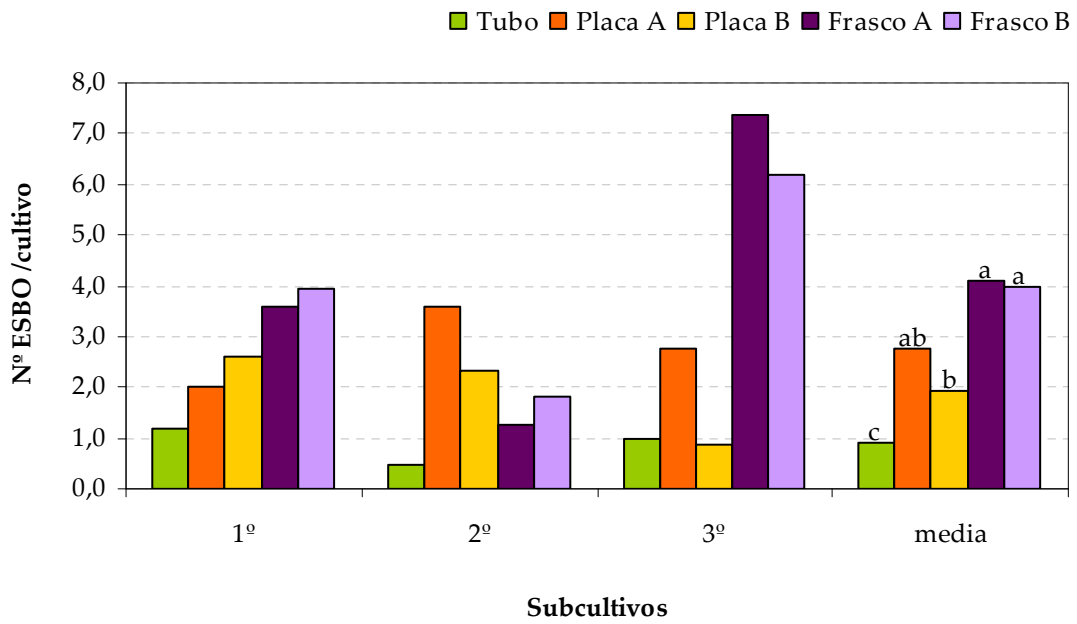


Figura 28. Efecto del recipiente de cultivo y del material subcultivado en el número de ESBO por cultivo. Datos tomados durante tres subcultivos de cinco semanas. Letras distintas indican diferencias significativas obtenidas por ANOVA al 5%.

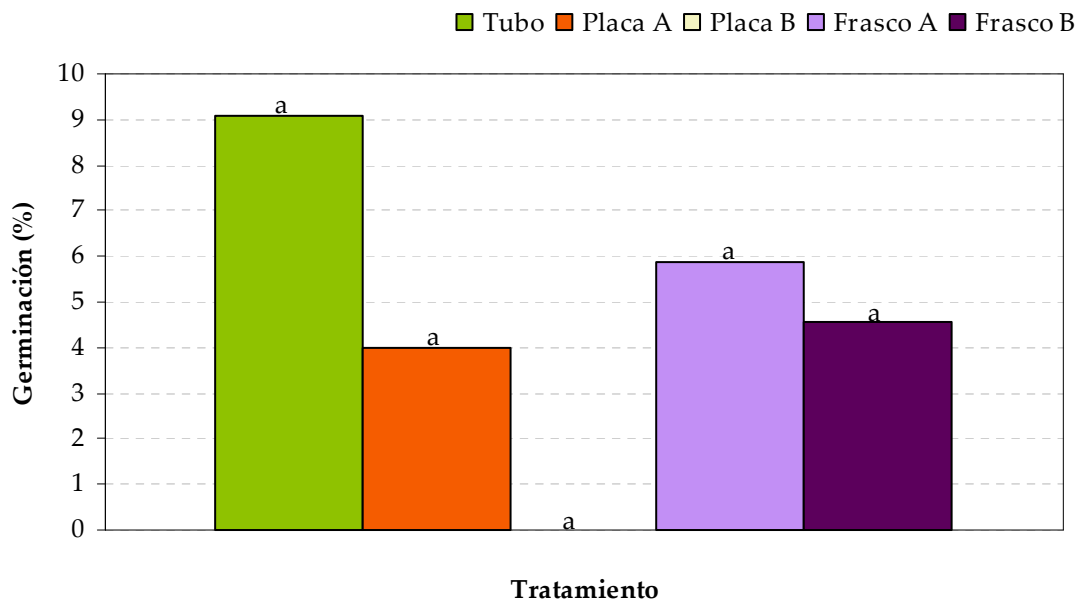


Figura 29. Efecto del recipiente de cultivo y del material subcultivado en la posterior germinación de ESBO ≥ 4 mm obtenidos durante el primer y segundo subcultivo de maduración. Letras distintas indican diferencias significativas obtenidas por análisis de frecuencias al 5%.

Efecto de la luz en la fase de proliferación

La proliferación de los cultivos en el medio de desarrollo de ESBO se vio significativamente afectada por la intensidad de la luz a la que habían sido previamente mantenidos (Fig. 30). Los valores de incremento de peso más elevados se obtuvieron en cultivos procedentes de luz difusa. La mayor parte de la proliferación observada en este caso estaba constituida por callo embriogénico, friable y sin oxidar, que crecía en la parte basal de los cultivos (Fig. 31).

Sin embargo, el cultivo durante la fase de proliferación en condiciones de oscuridad tuvo un efecto significativamente beneficioso en el posterior desarrollo de ESBO. De este modo, tanto en la regeneración de ESBO (Fig. 32), como en el número de ESBO por cultivo (Fig. 33), los mejores resultados se obtuvieron con aquellos cultivos que habían sido mantenidos en oscuridad durante la fase de proliferación. Estas diferencias entre los distintos tratamientos fueron más evidentes en el segundo subcultivo que en el primero.

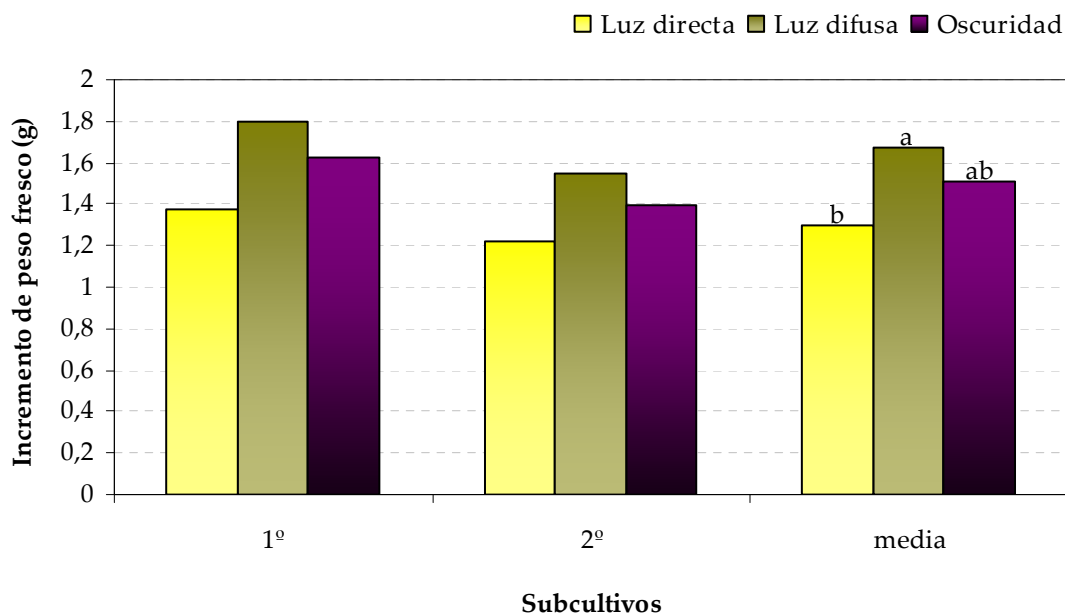


Figura 30. Efecto de la luz durante la fase de proliferación sobre el incremento de PF de los cultivos en medio de desarrollo de ES. Datos tomados durante dos subcultivos de cinco semanas. Letras distintas indican diferencias significativas según ANOVA al 5%.

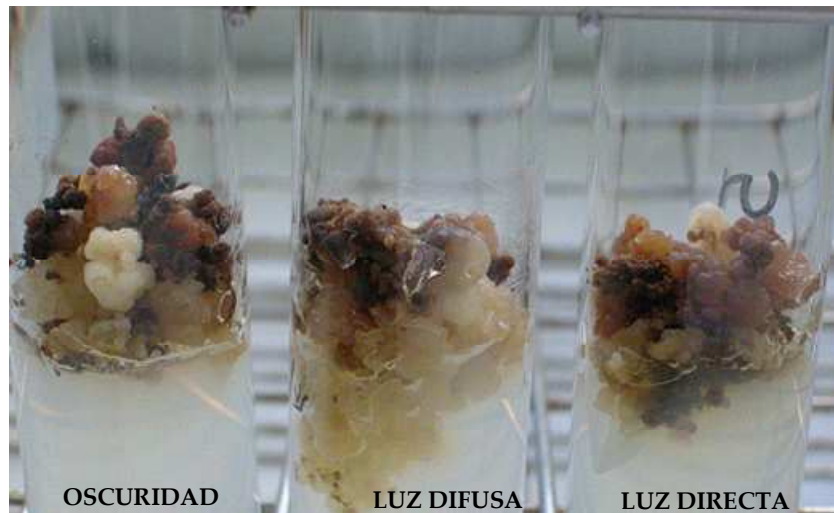


Figura 31. Aspecto de los cultivos embriogénicos cultivados previamente durante la fase de proliferación en tres condiciones lumínicas distintas, tras su primer subcultivo en medio de desarrollo de ES.

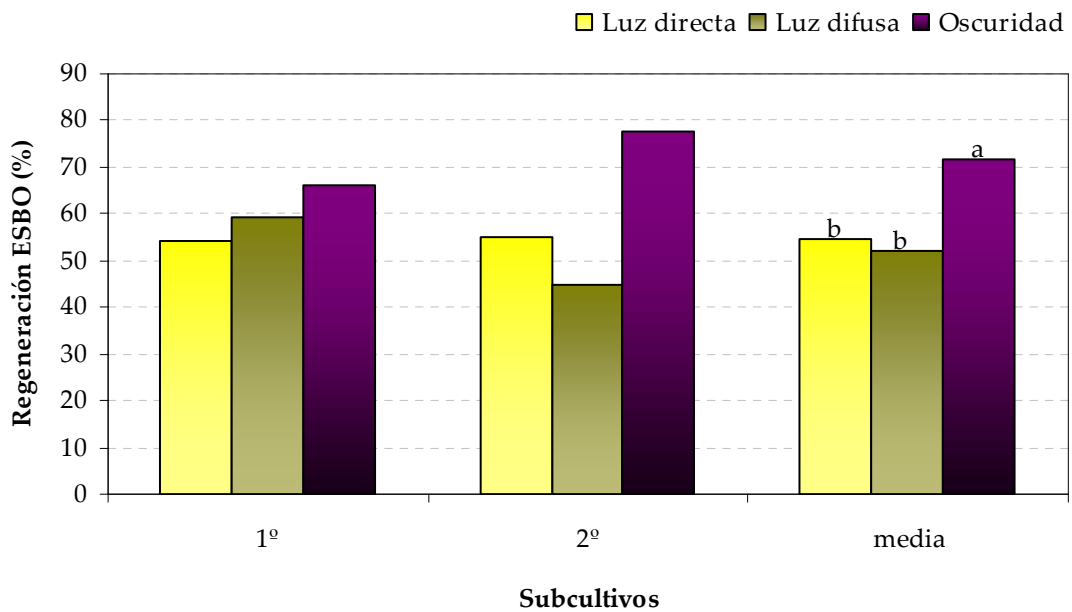


Figura 32. Efecto de la luz durante la fase de proliferación en la posterior regeneración de ESBO. Datos tomados durante dos subcultivos de cinco semanas. Letras distintas indican diferencias significativas obtenidas por análisis de frecuencias al 5%.

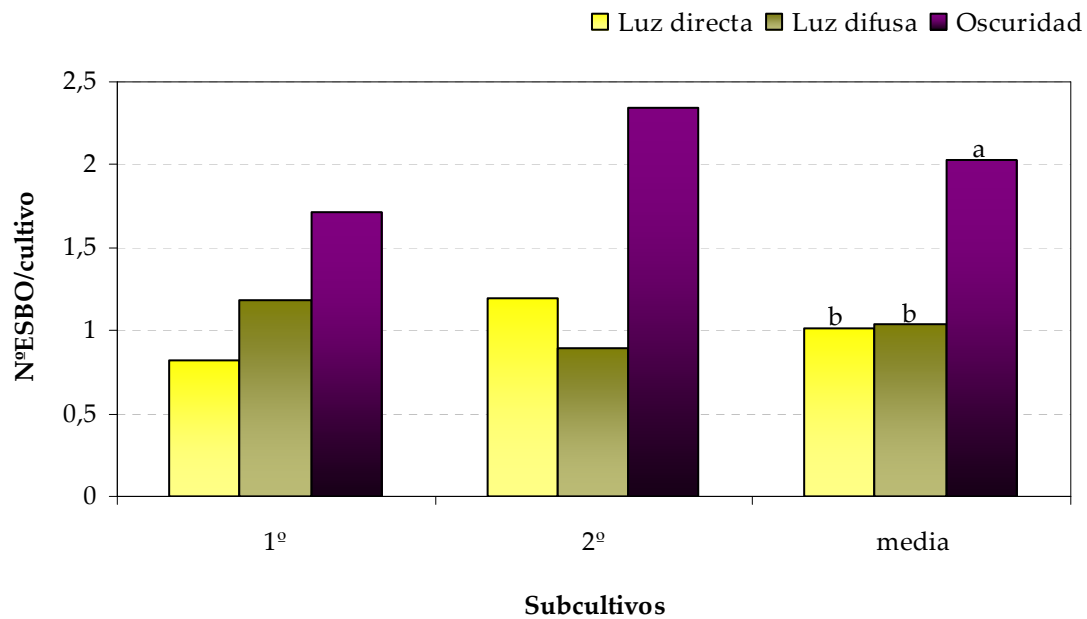


Figura 33. Efecto de la luz durante la fase de proliferación en la posterior formación de ESBO. Datos tomados durante dos subcultivos de cinco semanas. Letras distintas indican diferencias significativas obtenidas mediante ANOVA al 5%.

Estos resultados se repitieron para los ESBO ≥ 4 mm, tanto en lo que respecta al porcentaje de regeneración (Fig. 34), como al número de embriones producidos por cultivo (Fig. 35). En este caso las diferencias observadas fueron importantes dando lugar a valores de regeneración bastante elevados (48%) que prácticamente doblaron a los obtenidos en los cultivos procedentes de luz difusa (25%) o luz directa (17,50%).

En la posterior germinación de los embriones obtenidos no hubo diferencias significativas entre los distintos tratamientos. Sin embargo, los embriones procedentes de cultivos que habían sido mantenidos en luz directa germinaron con un porcentaje más elevado que aquellos que procedían de cultivos incubados en oscuridad o luz difusa (Fig. 36). Tampoco se observaron diferencias significativas en el potencial de regeneración (datos no mostrados).

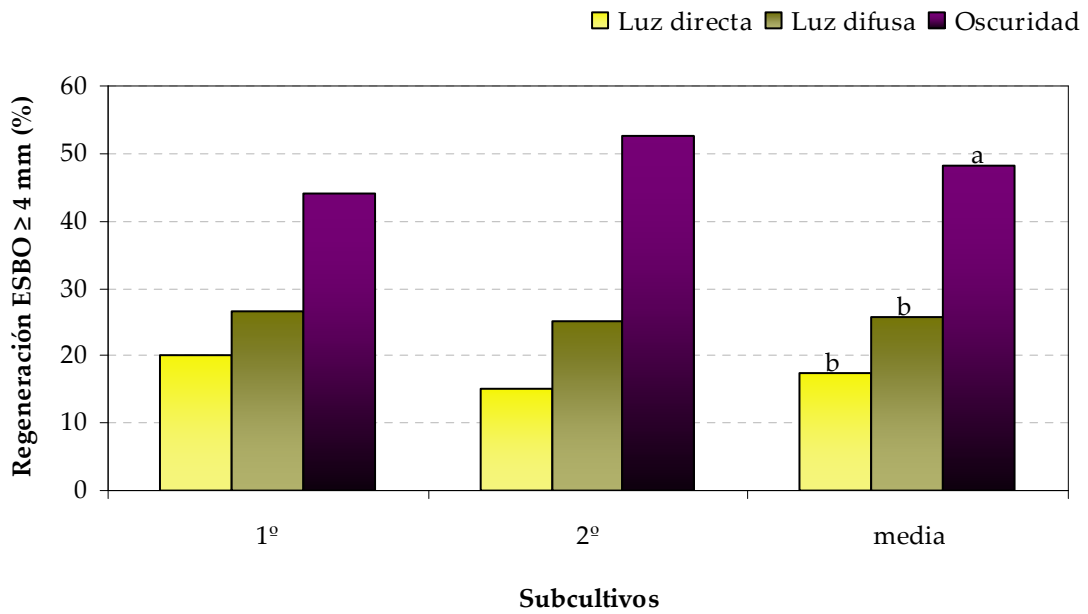


Figura 34. Efecto de la luz durante la fase de proliferación en la posterior regeneración de ESBO ≥ 4 mm. Datos tomados durante dos subcultivos de cinco semanas. Letras distintas indican diferencias significativas obtenidas por análisis de frecuencias al 5%.

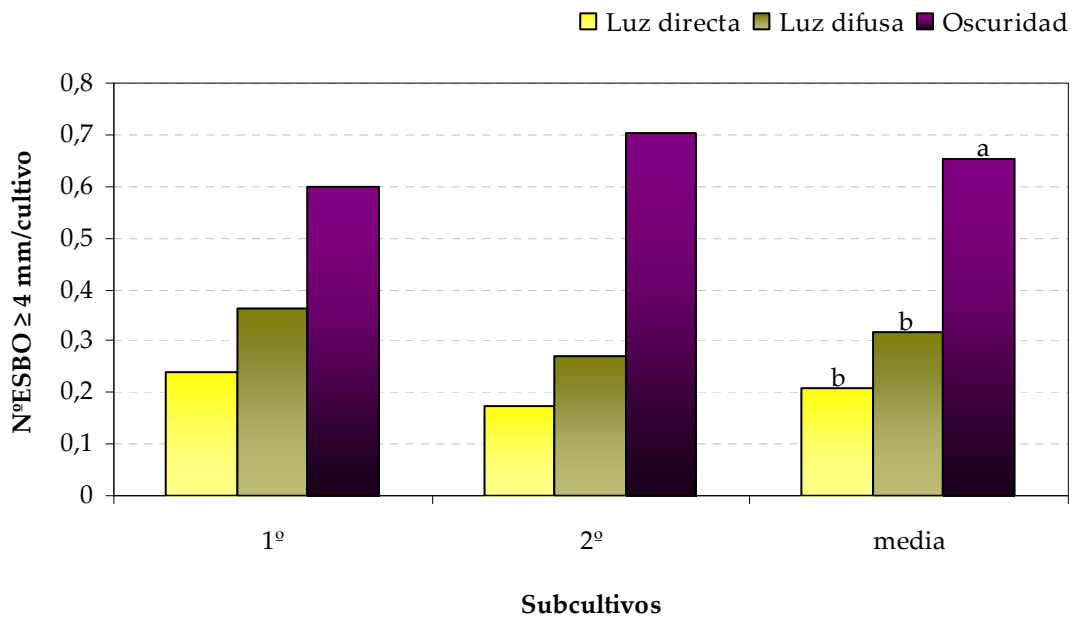


Figura 35. Efecto de la luz durante la fase de proliferación en la posterior formación de ESBO ≥ 4 mm. Datos tomados durante dos subcultivos de cinco semanas. Letras distintas indican diferencias significativas obtenidas mediante ANOVA al 5%.

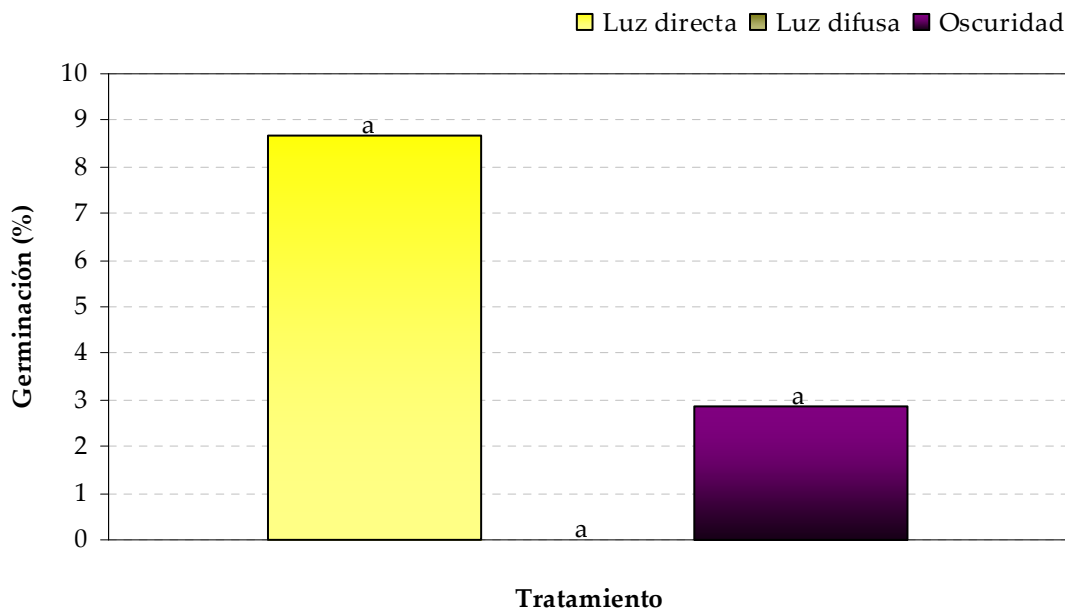


Figura 36. Efecto de la luz durante la fase de proliferación en la posterior germinación de ESBO ≥ 4 mm obtenidos durante el primer y segundo subcultivo de maduración. Letras distintas indican diferencias significativas obtenidas por análisis de frecuencias al 5%.

Efecto de la luz en la fase de desarrollo

Las condiciones lumínicas mostraron una influencia significativa tanto sobre la regeneración de ESBO (Fig. 37) como sobre el número de ESBO formados (Fig. 38). Sin embargo, el incremento de peso de los cultivos no se vio afectado y los resultados obtenidos fueron similares con independencia del régimen lumínico utilizado (datos no mostrados). La tasa de regeneración de ESBO más elevada se dio en oscuridad, observándose un descenso progresivo conforme aumentaba la intensidad de luz. La misma tendencia pudo ser observada cuando los datos representados fueron los del número de ESBO obtenidos por cultivo.

En relación a los ESBO ≥ 4 mm, los resultados obtenidos siguieron la misma tendencia descrita para ESBO totales (datos no mostrados).

En la germinación de los embriones obtenidos no influyó significativamente la intensidad de la luz a la que se habían desarrollado (Fig. 39). En algunos de los embriones madurados en condiciones de luz se observó germinación precoz, con desarrollo de raíz al final de la fase de maduración y antes del inicio de la germinación.

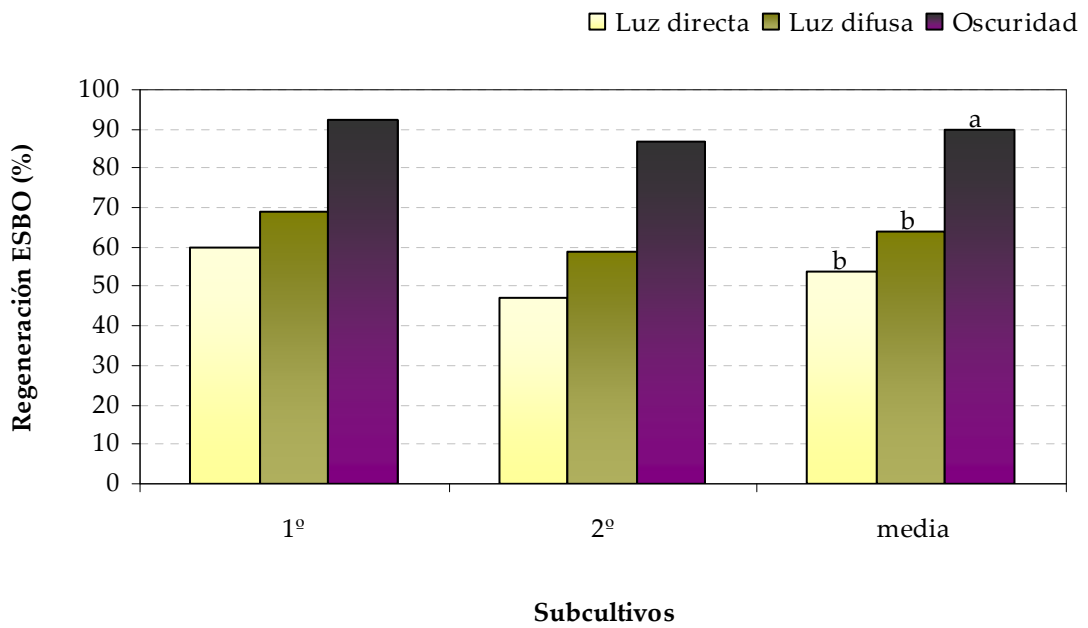


Figura 37. Efecto de la luz sobre la regeneración de ESBO. Datos tomados durante dos subcultivos de cinco semanas. Letras distintas indican diferencias significativas obtenidas por análisis de frecuencias al 5%.

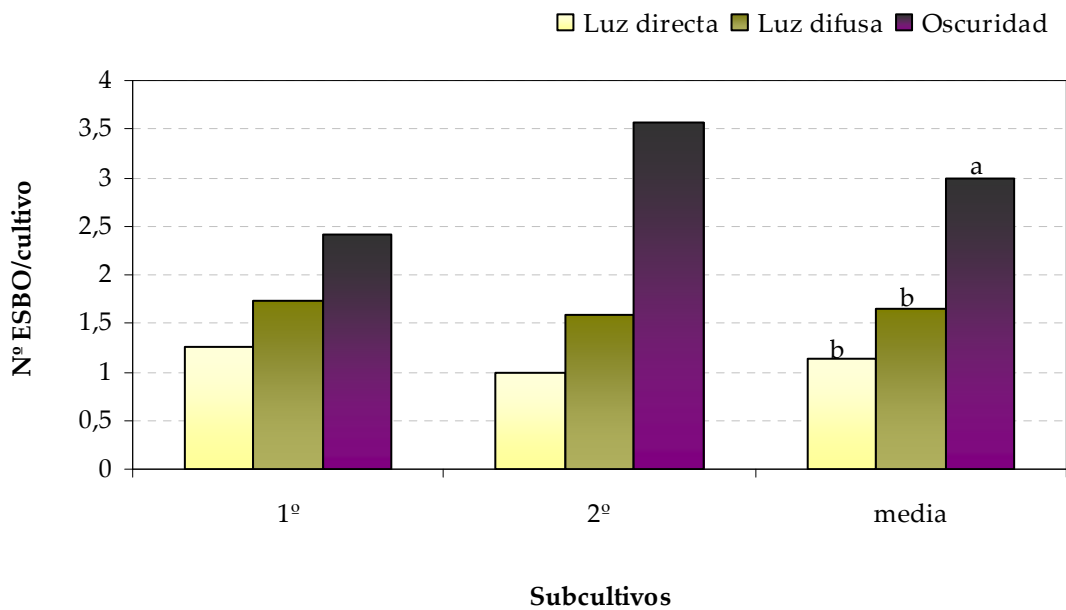


Figura 38. Efecto de la luz sobre el número de ESBO por cultivo. Datos tomados durante dos subcultivos de cinco semanas. Letras distintas indican diferencias significativas obtenidas por ANOVA al 5%.

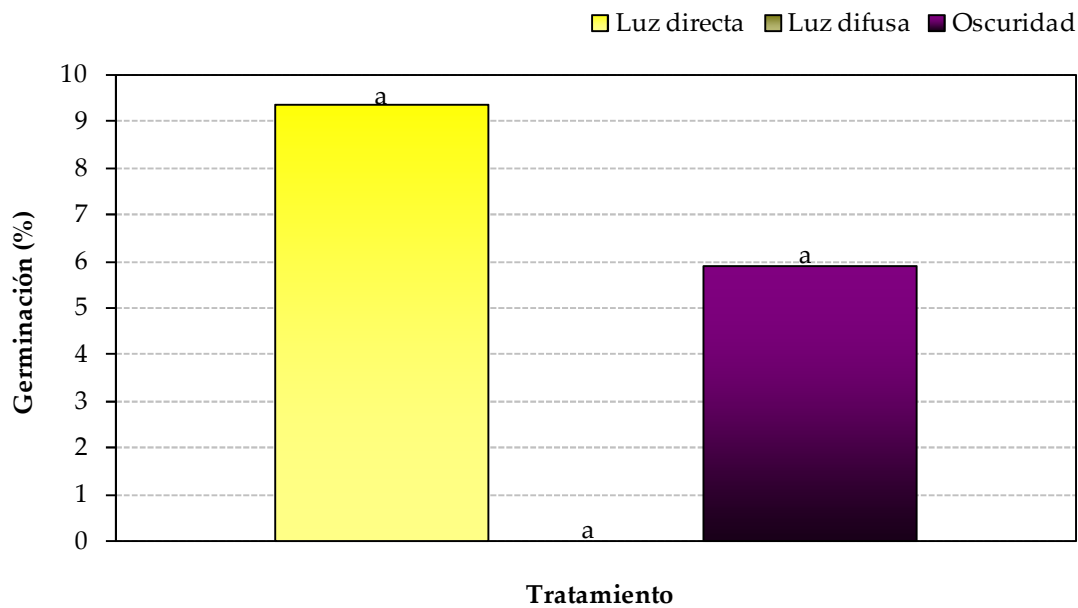


Figura 39. Efecto de la luz durante la fase de desarrollo en la germinación de ESBO ≥ 4 mm obtenidos durante el primer y segundo subcultivo de maduración. Letras distintas indican diferencias significativas obtenidas por análisis de frecuencias al 5%.

GERMINACIÓN DE EMBRIONES SOMÁTICOS

Efecto del tamaño y del tipo de embrión

Este experimento se realizó con el objetivo de seleccionar qué características de los ES podían influir en su posterior germinación. Se evaluó el tamaño de los embriones y el tipo de embrión en cuanto a su condición de translúcido o BO.

La tabla 3 muestra los resultados de germinación obtenidos en ES de la línea D2.3. En la misma puede observarse que únicamente aquellos embriones que eran BO y tenían un tamaño mayor o igual a 4 mm germinaron.

Tabla 3. Efecto del tamaño y tipo de ES en su capacidad de germinación. Letras distintas indican diferencias significativas obtenidas por análisis de frecuencias al 5%.

Tipo de embrión	Germinación (%)
Traslúcido < 4 mm	0 b
Traslúcido ≥ 4 mm	0 b
BO < 4 mm	0 b
BO ≥ 4 mm	10 a

Los ESt se caracterizaron por la producción de callo no embriogénico que en el caso de los embriones de más de 4 mm, llegó a cubrir totalmente al embrión y a causar su degeneración (Fig. 40). En el caso de los embriones BO que no germinaron se observó un aumento de tamaño de los mismos, pero sin formación de callo no embriogénico. En algunos casos, se observó la inducción de embriogénesis secundaria en este tipo de embriones (Fig. 41).

En los ES de la línea D6 no se produjo germinación en ninguno de los casos.

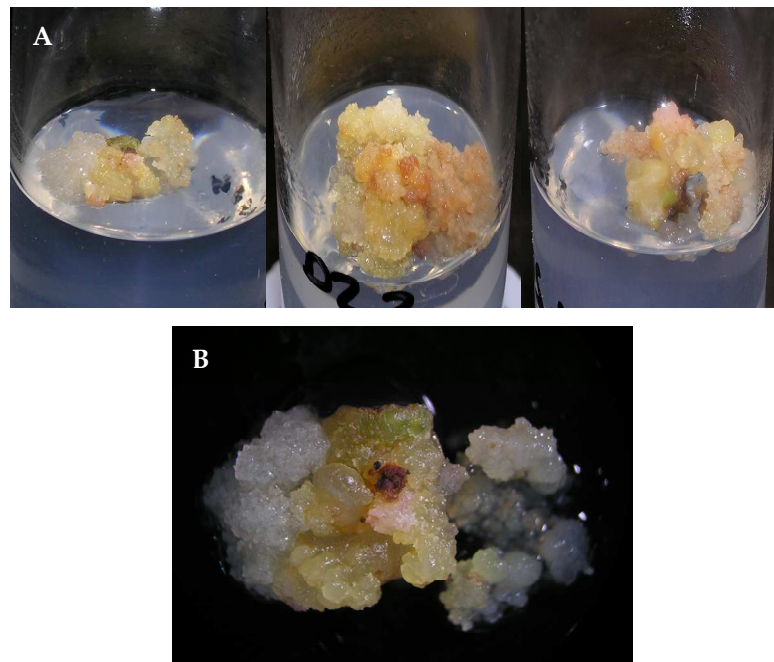


Figura 40. Aspecto de los ESt tras su cultivo en medio estándar de germinación. (A) Visión general. (B) Visión en detalle de un embrión.

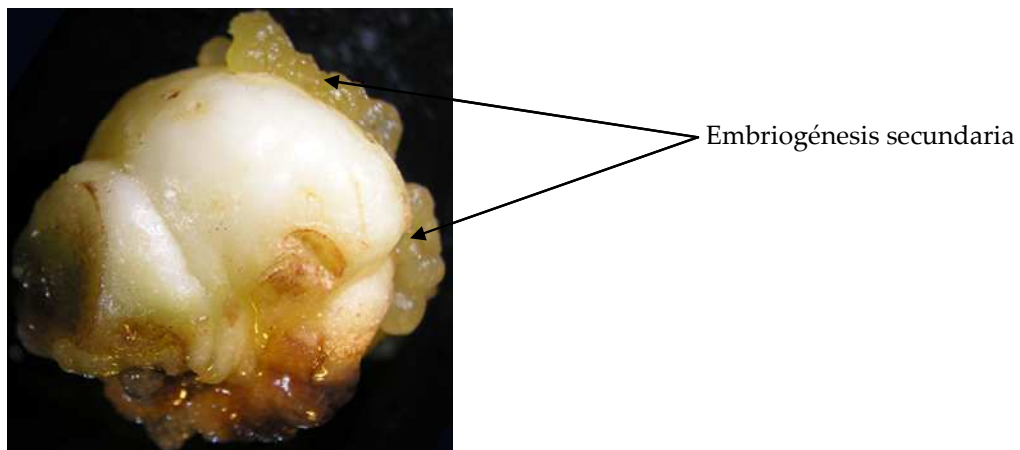


Figura 41. Inducción de embriogénesis secundaria en un ESBO \geq 4 mm.

Efecto del agente gelificante

El uso de agar como agente gelificante en el medio M1 de germinación provocó un aumento, aunque no significativo, en el porcentaje de germinación de ESBO de aguacate (Tabla 4). Además, de forma general, los embriones cultivados en agar mantuvieron una estructura definida y sufrieron menos malformaciones.

En los ES de la línea D6 no se produjo germinación en ninguno de los casos.

Tabla 4. Efecto del agente gelificante en la germinación de ES. Letras distintas indican diferencias significativas obtenidas mediante análisis de frecuencias al 5%.

Agente gelificante	Germinación (%)
Gelrite	9,83 a
Agar	16,66 a

DISCUSIÓN

INDUCCIÓN DE CULTIVOS EMBRIOGÉNICOS

La inducción de la embriogénesis somática depende de factores de muy distinta índole entre los que se incluye la luz. Este es un factor muy importante ya que la intensidad, espectro y duración de la luz suministrada a los cultivos *in vitro* puede influenciar su capacidad morfogénica (George y Davies 2008).

Cuando se estableció por primera vez un protocolo de embriogénesis somática para aguacate (Pliego-Alfaro 1981; Pliego-Alfaro y Murashige 1988) la inducción se llevó a cabo en luz o en oscuridad indistintamente. A partir de entonces, y a pesar de no haberse realizado un estudio sistemático previo, este proceso se realiza en oscuridad (Márquez-Martín 2007; Perán-Quesada 2001; Witkajsono y Litz 1999a). Por esa razón y con el objetivo de comprobar qué régimen lumínico es el más adecuado, se decidió evaluar el efecto de la luz en la inducción de cultivos embriogénicos de aguacate a partir de ZE inmaduros. Nuestros resultados demuestran que la luz ejerce una influencia significativa en la inducción de cultivos embriogénicos de esta especie. Los mejores resultados se obtuvieron en oscuridad y conforme se aumentó la intensidad lumínica el porcentaje de inducción fue disminuyendo. Además, la influencia negativa de la luz en la inducción quedó reflejada también por la aparición de callo no embriogénico en estas condiciones. Este tipo de callo, debido a su excesiva y rápida proliferación, puede entrar en competencia con el callo embriogénico, haciendo más difícil el establecimiento de líneas embriogénicas.

La luz se considera un factor muy importante en el crecimiento *in vitro* de tejidos organizados y generalmente es necesaria para conseguir resultados óptimos. Sin embargo, las primeras divisiones celulares que tienen lugar en la fase de inducción y formación de callo embriogénico pueden verse inhibidas o ralentizadas por la luz (George y Davies 2008). Esta teoría ha sido corroborada en diversos estudios donde se ha comparado la inducción embriogénica en condiciones de luz y de oscuridad. En ellos se ha comprobado que la luz no es necesaria para desencadenar la activación de la ruta embriogénica y que en algunos casos, entre ellos varias especies del género *Prunus* (Cheong y Pooler 2004; De March et al. 1993; Machado et al. 1995), *Quercus rubra* (Vengadesan y Pijut 2009) o *Populus* (Michler y Bauer 1991), puede llegar a inhibirla. Sus resultados coinciden con los obtenidos en este estudio donde en condiciones de luz directa la inducción de la embriogénesis somática se

vio fuertemente disminuida. En otras especies, como *Fragaria x annanasa*, se observó un oscurecimiento de los explantos exclusivamente en presencia de luz (Husaini y Abdin 2007). Este efecto se atribuyó a la detención, en condiciones de oscuridad, de la actividad enzimática responsable de la oxidación de los tejidos (Titov et al. 2006). Tanto en este trabajo, como en otros realizados con *Fragaria* (Biswas et al. 2007; Donnoli et al. 2001), siempre fue mayor la frecuencia de inducción embriogénica en condiciones de oscuridad. Igualmente, el régimen lumínico que dio lugar a mejores resultados en *Phalaenopsis* fue el cultivo continuo en oscuridad no observándose en estas condiciones el necrosamiento de los cultivos que tuvo lugar en presencia de luz (Gow et al. 2009).

Existen, sin embargo, otros ejemplos donde la luz es imprescindible para la inducción embriogénica. Así ocurre en *Dendrobium* (Chung et al. 2007), *Cucumis melo* (Kintzios y Tavira 1997) o *Melia azerach* (Vila et al. 2007) donde la inducción de callo embriogénico fue superior en condiciones de luz que en oscuridad.

De forma general, se ha observado que cada especie necesita de unas condiciones lumínicas diferentes, aunque en litchi se ha observado una respuesta embriogénica distinta en condiciones de luz u oscuridad dependiendo del cultivar (Ma et al. 2009; Raharjo y Litz 2007).

La influencia de las condiciones lumínicas puede estar relacionada con efectos estimuladores o inhibidores de la luz sobre distintas sustancias endógenas, incluyendo los reguladores de crecimiento (Zelena 2000). La interacción entre las auxinas y la luz y su influencia sobre el crecimiento y desarrollo vegetal ha sido descrita por diferentes autores (Jensen et al. 1998; Liscum y Reed 2002; Marks y Simpson 1999; Martinez-Garcia et al. 2000). De acuerdo con estos trabajos, la influencia de la luz sobre las auxinas puede ejercerse de tres formas principales: modificando los niveles endógenos, influyendo en el flujo y gradiente de estas hormonas y alterando la sensibilidad o receptividad de señales desencadenadas por auxinas (Halliday et al. 2009).

La modificación de los niveles endógenos de auxinas por la luz puede ser consecuencia de una fotólisis de las mismas, provocada por una exposición a alta intensidad lumínica (Weigel et al. 1984). Marks y Simpson (1999) explicaron de este modo el efecto observado al combinar una alta intensidad de luz con reguladores de crecimiento en la formación *in vitro* de brotes en *Dianthus*, *Crataegus* y *Rhododendron*. No obstante, también se ha descrito la fotoactivación de hormonas con luz roja, responsable de la estimulación de la embriogénesis somática en membrillo (D'Onofrio et al. 1998).

Marks y Simpson (1999) apuntaron que la interacción entre la luz y los reguladores de crecimiento podía estar mediada por los fitocromos y señalaron a estos fotorreceptores como responsables de los principales cambios morfogénicos observados en los cultivos. El papel de los fitocromos como mediadores entre la regulación por auxinas y la luz está ampliamente documentado (Martinez-García et al. 2000; Neff et al. 2000). De acuerdo con Halliday et al. (2009), los fitocromos serían capaces de alterar el crecimiento y desarrollo vegetal mediante una red de vínculos establecidos con el sistema de auxina.

Como base de evidencia de la interacción entre la luz y las auxinas se encuentran las AUX/IAA, una de las principales familias de proteínas que actúan como reguladoras de la expresión génica mediada por auxinas. La actividad de estas proteínas parece estar modulada directamente por los fitocromos, y por lo tanto por la luz (Liscum y Reed 2002; Tepperman et al. 2001). Esta interacción entre las proteínas AUX/IAA y los fitocromos parece estar mediada por la fosforilación de las mismas (Colón-Carmona et al. 2000, Kevei y Nagy 2003). De acuerdo con esto, Devlin et al. (2003) propusieron que la cantidad disponible de fitocromo activo provoca un aumento o disminución en los niveles de transducción mediados por auxinas. En relación a la embriogénesis somática, D'Onofrio et al. (1998) demostraron que el fotoequilibrio entre las dos formas del fitocromo tenía una gran influencia en el desarrollo de ES de membrillo. Así, mientras mayor era la cantidad de formas activas del fitocromo, mayor era el número de ES obtenidos por cultivo, sugiriendo un efecto positivo del fitocromo en este sistema embriogénico.

Esta interacción entre luz y reguladores de crecimiento se ha observado también en la embriogénesis somática de *Cucumis sativus* (Elmeer y Hennerty 2008). Durante la fase de inducción de cultivos embriogénicos, la proliferación del callo fue siempre más elevada en condiciones de luz, independientemente de la combinación de reguladores de crecimiento utilizada (2,4-D, ácido naftalacético y kinetina). Sin embargo, en la fase de maduración, donde se excluyó el uso del 2,4-D, el incremento de peso fue significativamente más elevado en condiciones de oscuridad. La posibilidad de una interacción entre la luz y los reguladores de crecimiento se vio reforzada cuando se comprobó el efecto de ambos factores en la producción de ES durante la fase de inducción. Así, cuando esta fase se realizaba en condiciones de luz, el mejor tratamiento para obtener un mayor número de ES era una combinación de 2,4-D y ácido naftalenacético, mientras que cuando los cultivos eran inducidos en oscuridad, el uso aislado de 2,4-D fue el que dio lugar a los mejores resultados.

Por consiguiente, y tal y como apuntaron Moreira-Dias et al. (2001), a la hora de establecer un protocolo de regeneración, la intensidad lumínica y el fotoperiodo deben ser considerados como factores principales, ya que pueden influir directamente en la concentración de reguladores de crecimiento adecuados.

Esta interacción entre ambos factores podría ser la responsable de las diferencias de inducción embriogénica ante distintas intensidades lumínicas así como la causante de las distintas tasas de proliferación obtenidas en las fases de proliferación y desarrollo en el presente estudio. Mientras que en la fase de proliferación, en un medio de cultivo con auxinas, la tasa de proliferación fue mucho mayor en oscuridad, en la fase de desarrollo de ES, donde el medio no incluye reguladores de crecimiento, no se observaron diferencias en la tasa de proliferación de los cultivos. El efecto diferencial de la luz en una y otra fase podría estar relacionado por lo tanto con la presencia o ausencia de auxina en el medio de cultivo.

Pliego-Alfaro y Murashigue (1988) establecieron el uso de picloram a una concentración de $0,1 \text{ mg l}^{-1}$ como las condiciones hormonales adecuadas para inducir el proceso de embriogénesis somática en aguacate. Estos autores desestimaron el uso de 2,4-D a una concentración de 10 mg l^{-1} debido a que en este caso no se observaba un desarrollo organizado al transferir posteriormente los cultivos a un medio libre de auxinas. Desde ese trabajo, no se han realizado experimentos para investigar la influencia de distintos reguladores de crecimiento en la inducción de embriogénesis somática de aguacate. En el presente estudio se comparó el uso en el medio de inducción de picloram a $0,1 \text{ mg l}^{-1}$ con el uso combinado de 2,4-D ($0,1 \text{ mg l}^{-1}$) y TDZ ($11,01 \text{ mg l}^{-1}$). Los porcentajes de inducción embriogénica obtenidos fueron más elevados con la combinación de 2,4-D y TDZ que con picloram. Además, no se observó formación de callo no embriogénico el cual fue visible en el 10% de los casos en los que se utilizó picloram. Aunque en principio estos resultados parecen no corroborar lo descrito por Pliego-Alfaro y Murashige (1988), hay que tener en cuenta que la concentración de 2,4-D usada por dichos autores fue 100 veces superior y que se utilizó de forma aislada, sin ningún suplemento de citoquinina. En palmera datilífera también obtuvieron una mayor producción de callo embriogénico con 2,4-D mientras que con picloram solo se produjo callo no embriogénico de estructura nodular y poco friable (Othmani et al. 2009). A pesar de estos resultados, en estudios llevados a cabo en otras especies de palmera el picloram sí ha sido efectivo para inducir la embriogénesis somática (Steinmacher et al. 2007).

El 2,4-D provoca cambios en la fisiología y expresión génica, lo que sugiere que, tal y como se indicó anteriormente, además de como auxina, puede actuar como agente estresante, activando la ruta embriogénica en plantas (Feher et al. 2003). Además, se ha descrito que incrementa los niveles endógenos de auxinas en los explantos que responden a dicho estímulo (Michalczuk et al. 1992; Pasternak et al. 2002) y esta síntesis de auxina es imprescindible como señal para determinar la ruta embriogénica.

El TDZ se ha descrito como un regulador de crecimiento capaz de producir la regeneración directa de ES, incluso a partir de explantos muy diferenciados (Gairi y Rashid, 2004ab; Panaia et al. 2004). Su uso aislado ha sido capaz de sustituir los requerimientos tanto de auxinas como de citoquininas indispensables para inducir la embriogénesis somática en muchas especies (Murthy et al. 1998).

Las combinaciones de auxinas y citoquininas a concentraciones relativamente bajas pueden provocar una mejor respuesta inductiva en los explantos que cuando estos reguladores se usan de forma aislada (Merkle et al. 1995). De acuerdo con von Arnold (2008), esto indica que además de alterar la concentración de auxina, es necesario alterar la ratio auxina/citoquinina para obtener los mejores resultados. No obstante, también existen estudios donde fue mejor suministrar auxina o citoquinina de forma aislada que combinándolas (Vila et al. 2007).

En el presente estudio, cuando se utilizó 2,4-D y TDZ solo se produjo callo embriogénico mientras que con picloram se formaron los dos tipos de callo, embriogénico y no embriogénico. El tipo de callo producido por cada auxina parece ser dependiente de la especie con la que se trabaje. Cuando se produce la formación de los dos tipos de callo a partir de un origen común y bajo las mismas condiciones de cultivo podemos suponer que es debido a distintas características internas, exclusivas de cada tejido (Quiroz-Figueroa et al. 2006). Estudios moleculares recientes (Zhang et al. 2010) revelaron la expresión diferencial de cuatro familias de microRNAs entre callo embriogénico y no embriogénico obtenidos a partir de un origen común. Estos cuatro tipos de microRNAs comparten la característica de ser inducidos bajo distintos tipos de estreses abióticos y tener un papel importante en la diferenciación celular y el desarrollo.

En conclusión, los resultados obtenidos ponen de manifiesto que el uso conjunto de 2,4-D y TDZ parece prometedor en la inducción de cultivos embriogénicos de aguacate. No obstante, a pesar de su eficiencia en la inducción de cultivos embriogénicos, se ha comprobado que el 2,4-D es menos metabolizable por las células que otras auxinas (von

Arnold et al. 2002), lo que podría ser la causa de que a pesar de ser eliminadas del medio de cultivo sus efectos puedan seguir presentes, impidiendo, tal y como describen Pliego-Alfaro y Murashige (1988), el posterior desarrollo de ES. En el caso del TDZ, a pesar de sus efectos beneficiosos también se ha descrito que su uso puede afectar negativamente a la conversión de los ES en especies leñosas como *Prunus incisa* (Cheong y Pooler 2004), *Acacia sinuata* (Vengadesan et al. 2002) o *Eucalyptus globulus* (Pinto et al. 2008). Por lo tanto, antes de su incorporación definitiva al protocolo de embriogénesis somática de esta especie, debe comprobarse su efecto en las siguientes etapas de proliferación y maduración.

MANTENIMIENTO Y PROLIFERACIÓN DE CULTIVOS EMBRIOGÉNICOS

Durante esta fase, las células embriogénicas deben exhibir su capacidad de proliferación continua e indefinida que permitirá el mantenimiento de los cultivos. Cuando la fase de proliferación o mantenimiento se lleva a cabo en condiciones de luz directa durante largos periodos de tiempo, en algunas especies puede observarse un oscurecimiento de los cultivos. Este es el caso de las suspensiones embriogénicas de café (Gatica-Arias et al. 2008) donde, a pesar de que la tasa de proliferación de los cultivos fue igual en luz que en oscuridad, después de cuatro semanas la luz provocó un oscurecimiento excesivo de los cultivos mientras que en oscuridad esto no ocurrió. Este oscurecimiento se atribuye a la producción de compuestos fenólicos que en algunas especies se ve estimulada en presencia de la luz y que se acumulan en gran cantidad cuando se aumenta la radiación (Davies 1972). Junto con este efecto negativo de la luz puede darse también una inhibición del crecimiento del callo debida a un aumento de la producción de sustancias inhibitoras (George 2008).

En este trabajo, cultivos embriogénicos de aguacate fueron incubados a tres intensidades de luz distintas durante tres subcultivos de cinco semanas cada uno. Los resultados pusieron de manifiesto un aumento de la tasa de proliferación en condiciones de oscuridad. En este caso, la incubación en luz no provocó un oscurecimiento de los cultivos cómo han citado otros autores (Gatica-Arias et al. 2008), pero sí un cambio en el aspecto y composición de los mismos. Así, en oscuridad se favoreció la proliferación de pequeñas estructuras embriogénicas que daban lugar a un callo fácilmente disgregable, mientras que en luz se observaban estructuras deformes y de mayor tamaño, que no facilitaban la multiplicación de los cultivos. Tal y como sugirieron Marks y Simpson (1999), este efecto negativo de la luz podría atribuirse a una posible interacción con la auxina picloram. Estos

autores observaron en *Dianthus*, *Crataegus* y *Rhododendron* la interacción negativa entre una alta intensidad lumínica y un descenso en los niveles de reguladores de crecimiento.

DESARROLLO DE EMBRIONES SOMÁTICOS BLANCO-OPACOS

El desarrollo de ES es un proceso muy complejo, controlado e influenciado por diversos factores (Merkle et al. 1995).

Según von Arnold et al. (2005) es importante establecer un vínculo entre la fase desorganizada de proliferación de las PEMs y la fase de desarrollo embrionario, pero al mismo tiempo poder distinguir estas fases como dos procesos separados. La transición de PEMs a ES es un paso crucial en la embriogénesis somática de *Picea abies* (Bozhkov et al. 2002; Filonova et al. 2000a) y se ha comprobado que si el traspaso al medio de maduración con ABA se produce con PEMs y no con ES en un determinado estadio de diferenciación, no tiene lugar una maduración adecuada (von Arnold et al. 2005). Sin embargo, en aguacate, la inclusión de una etapa de predesarrollo, de acuerdo con von Arnold et al. (2002), no mejoró el rendimiento de la embriogénesis somática. Por el contrario, los mejores resultados se obtuvieron cuando la maduración se llevó a cabo directamente en medio B5m10a (Márquez-Martín et al. 2011).

En este experimento se pone de manifiesto que, en aguacate, un suplemento extra de sacarosa y aminoácidos no mejora la producción de ES respecto al control cuando se aplica después de una fase de predesarrollo. La sacarosa es el azúcar más utilizado como suplemento de carbohidratos en los medios de cultivo y su utilización ha mejorado la obtención de ES maduros en muchas especies (Merkle et al. 1995). La presencia de nitrógeno en el medio de cultivo es imprescindible para el proceso de embriogénesis somática (Nomura y Komamine 1995) y puede ser suplementado en forma de nitrato, amonio o aminoácidos individuales. A pesar de los buenos resultados obtenidos en ZE de aguacate (Márquez-Martín et al. 2009), en ES estos suplementos han demostrado no dar los resultados esperados, tanto cuando son aplicados directamente (Márquez-Martín 2007), como cuando se hace después de una fase de predesarrollo.

La influencia positiva del ABA en la maduración de ES de numerosas especies, y de manera especial en coníferas, está ampliamente demostrada (von Arnold et al. 2002). Sin embargo, los resultados obtenidos en este estudio reflejan que, aunque se obtienen ESBO, la producción es significativamente más baja que cuando se utiliza medio B5m10a. Este papel del ABA ya había sido previamente puesto de manifiesto en aguacate por Márquez-Martín

(2007) y Perán-Quesada et al. (2004) y la inclusión de una fase previa de predesarrollo no mejoró los resultados obtenidos en esta especie.

La utilización de una concentración elevada de agar en el medio de desarrollo de ESBO de aguacate volvió a confirmarse como un factor clave para optimizar el desarrollo de ES en esta especie, tal y como demostraron previamente Márquez-Martín et al. (2011). Este incremento en la concentración del agente gelificante repercute directamente en la firmeza del medio de cultivo, provocando un descenso de la disponibilidad de agua (Klimaszewska y Smith 1997; Klimaszewska et al. 2000), factor que favorece la maduración de ES de distintas especies (Stasolla et al. 2002).

Durante la fase de proliferación se dan de forma conjunta procesos de división y multiplicación, pero a la vez ciertas PEMs pueden avanzar en su estadio de desarrollo. De esta forma, el callo embriogénico de aguacate es bastante heterogéneo en su composición y fracciones finas de callo friable proliferan conjuntamente con embriones en distintos estadios de desarrollo (Márquez-Martín 2007; Perán-Quesada 2001).

Con el objetivo de mejorar la sincronización del desarrollo embrionario, se suele seleccionar un tamaño determinado de inóculo a partir del que inducir el desarrollo de los ES (Ibaraki y Kurata 2001). Dicho tamaño variará mucho dependiendo de la especie de la que se trate. Una de las formas más efectivas de llevar a cabo esta sincronización es la filtración a través de mallas con distintos tamaños de poro (Kurata y Fuyata 1992).

Los resultados obtenidos en la presente investigación revelan que el tamaño del inóculo influye de forma significativa tanto en la fase de desarrollo de ESBO como en la posterior germinación de los mismos. La fracción más pequeña testada, de 1-2 mm, fue la que dio lugar a los mejores resultados mientras que en la fracción más grande, $F > 2$ mm, el desarrollo de ESBO se vio drásticamente reducido. Cuando no se llevó a cabo la separación por tamaños y se utilizó como inóculo material compuesto por fracciones de distinto tamaño, los resultados obtenidos fueron también peores. Esto pone de manifiesto el efecto beneficioso de la sincronización de los cultivos conseguida mediante cultivo en suspensión, filtración y cultivo selectivo por tamaños. Este resultado coincide con los obtenidos por diversos autores que también han comprobado los efectos beneficiosos del cultivo diferencial por tamaños tras sincronización por filtración (Giuliano et al. 1983; Jayasankar et al. 1999; McKersie et al. 1989; Merkle et al. 1990). Más recientemente, en *Castanea dentata* también se ha demostrado el efecto positivo de disgregar el callo, sincronizarlo y cultivar solo fracciones de un mismo tamaño para dar lugar a ES (Andrade y Merkle 2005). El efecto

beneficioso del aislamiento de las PEMs podría estar basado en una interrupción en la transferencia de reguladores de crecimiento desde el callo a las PEMs circundantes. Los reguladores de crecimiento, presentes en el callo, provocarían una inhibición de la diferenciación de las PEMs y el subsecuente desarrollo de ES (Kamo et al. 2004).

La distinción de células embriogénicas en base a características morfológicas, como el tamaño, fue establecida por Nomura y Komamine (1985). En aguacate, los resultados obtenidos nos llevan a sugerir que sí es posible una cierta selección de tejidos con mayor competencia embriogénica en base a características morfológicas, siendo el tamaño de 1-2 mm el más adecuado para conseguir la diferenciación de ES en estadios avanzados de desarrollo.

Al igual que en nuestro caso, Kamo et al. (2004) encontraron que la disgregación del callo mediante cultivo en medio líquido y el posterior cultivo diferencial de fracciones de distinto tamaño aumentó notablemente el desarrollo y maduración de ES en *Rosa*. De cinco tamaños testados, también en este caso fue la fracción más pequeña (< 500 μm) la que dio lugar a un mayor número de ES. La razón por la cual la fracción más pequeña mostró una mayor capacidad embriogénica podría atribuirse a que dicha fracción podría estar constituida por células que se encuentran en los primeros estadios de desarrollo, caracterizados por una intensa división celular (Raghavan 1997). Esta fracción mantendría su capacidad embriogénica y al ser traspasada a un medio sin auxinas es capaz de desarrollar ES. Por lo contrario, las fracciones más grandes se encuentran en un estadio más avanzado e irreversible embriogénicamente del que es muy difícil redirigirlas hacia la formación de ES (Raghavan 1997).

La densidad de cultivo inicial ha sido descrita como un factor relevante a la hora de iniciar o mantener cultivos embriogénicos (Ammirato y Styer 1985; Halperin 1967; Marvituna y Buyukalaca 1996). En aguacate, se ha estudiado el efecto de este factor en la fase de suspensión (Márquez-Martín et al. en prensa) pero no se han llevado a cabo experimentos para determinar la densidad de cultivo más adecuada para iniciar la maduración de ES.

De acuerdo con Warren y Fowler (1981), la densidad óptima de cultivo estaría determinada por una densidad mínima, necesaria para que exista coordinación celular que promueva la morfogénesis y la división celular, y una densidad máxima, que vendrá delimitada por el recipiente y el medio de cultivo. Sin embargo, hay que añadir que un papel muy importante lo juegan las sustancias solubles segregadas por las células al medio

de cultivo. Algunos estudios han puesto de manifiesto la presencia de sustancias que estimulan la proliferación celular (De Vries et al. 1988ab; Bellincampi y Morpurgo 1989; Hari 1980) y aumentan la capacidad embriogénica de los cultivos, de manera que en estos casos la embriogénesis se ve favorecida por altas densidades de cultivo. En otros trabajos se ha comprobado que el proceso de muerte celular programada en suspensiones embriogénicas de zanahoria se desencadena cuando no se alcanza una densidad mínima de cultivo (McCabe et al. 1997). De acuerdo con esto, una cantidad mínima de células embriogénicas garantizaría la secreción al medio de cultivo de ciertas sustancias que actuarían como señales supresoras del mecanismo de muerte celular. En el lado opuesto se encuentran los autores que afirman que una alta densidad de cultivo provoca una inhibición de la embriogénesis somática (Fridborg et al. 1978; Huang et al. 1990; Osuga et al. 1993; Sung y Okimoto 1981). Higashi et al. (1998) obtuvieron los mismos resultados pero descartaron que la inhibición producida por una alta densidad de cultivo se debiera a daños físicos entre células o a la falta de nutrientes en el medio de cultivo. Según estos autores, la inhibición se produciría por la secreción de determinados factores al medio de cultivo. Tanto la concentración de esos factores, como la duración del cultivo, determinarían las características de la inhibición (Osuga y Komamine 1994). Unificando los distintos resultados, actualmente se asume que la formación de ES dependerá del balance en el medio de cultivo entre sustancias estimuladoras e inhibidoras, aunque de forma general el efecto de inhibición es tan fuerte que muchas veces enmascara al de estimulación (Higashi et al. 1998; Kobayashi et al. 1999). Los resultados obtenidos en aguacate pusieron de manifiesto un aumento progresivo en el número de ESBO conforme se aumentaba la densidad de cultivo, hasta llegar a 0,100 g. Sin embargo, densidades más elevadas provocaron un descenso de la producción de este tipo de embriones. Estos resultados coinciden con los descritos por Maës et al. (1997), Osuga et al. (1993) y Sung y Okimoto (1981) quienes también encontraron una inhibición del desarrollo de ES a altas densidades de cultivo en vid y zanahoria. Estos autores propusieron que dicha inhibición se produce por una interrupción en la transición desde el estadio globular al estadio corazón. De acuerdo con Higashi et al. (1998) y Kobayashi et al. (1999), esto podría deberse a que durante el aumento progresivo de la densidad, determinadas sustancias solubles liberadas al medio ejercieron una influencia positiva pero, a partir de 0,100 g, el efecto de las sustancias inhibitorias habría sido más fuerte y habría enmascarado la estimulación. Kobayashi et al. (1999) también proponen que la inhibición por alta densidad podría

deberse a una limitación en la división y proliferación celular. No obstante, Tonon et al. (2001) comprobaron en *Fraxinus* que densidades de cultivo elevadas incrementaban la tasa de proliferación celular al mismo tiempo que provocaban un descenso en el número de ES formados. Resultados muy similares fueron obtenidos en suspensiones embriogénicas de *Dactylis glomerata* (Brittain-Loucas et al. 1998). En *Pinus radiata* también se ha señalado que una densidad de cultivo elevada en la fase de maduración provoca una excesiva proliferación de los cultivos, lo que puede dificultar la posterior histodiferenciación y maduración de los ES (Montalbán et al. 2010).

En general, una alta densidad de cultivo parece ser idónea para provocar una proliferación continua del cultivo sin que se produzca histodiferenciación, mientras que una densidad de cultivo baja es imprescindible cuando el objetivo es el desarrollo de embriones. La explicación de porqué densidades más bajas favorecen el desarrollo de ES podría atribuirse a diferencias en el potencial osmótico. Los cultivos a baja densidad tendrán un mayor contenido en azúcares, lo que daría lugar a un medio de cultivo con bajo potencial osmótico, el cual favorece el desarrollo y maduración de ES (Brittain-Loucas et al. 1998).

En aguacate también se observaron requerimientos diferenciales en cuanto a la densidad de cultivo dependiendo del tipo de estructura formada. Así, el mayor número de ESBO se obtuvo con una densidad de 0,100 g, pero para obtener ESBO en un estadio más avanzado de desarrollo ($ESBO \geq 4$ mm) la densidad de inóculo más idónea disminuyó hasta 0,050 g.

La utilización de recipientes de cultivo de distinta forma, tamaño, material y tipo de cierre puede tener gran influencia en el crecimiento y desarrollo de tejidos *in vitro*. Además de otras posibles influencias, esta se considera como una de las alternativas existentes para alterar el microambiente gaseoso en el que están inmersos los cultivos (Bateson et al. 1987). De hecho, la mayoría del intercambio de gases se da por difusión (Jackson et al. 1987) y su disponibilidad para las plantas cultivadas *in vitro* depende de tres factores: la concentración en la atmósfera, la tasa de difusión al recipiente de cultivo y la tasa de difusión a las células del tejido.

En el experimento realizado con cultivos embriogénicos de aguacate, se utilizaron distintos tipos de recipientes para el desarrollo de ESBO. La regeneración y el número de ESBO obtenidos fue mayor en placas y en frascos que en tubos, que era el recipiente utilizado hasta el momento. La influencia del tipo de recipiente en la maduración de

embriones de aguacate podría deberse, tal y como apuntan Bateson et al. (1987), a que recipientes de diferente tamaño poseen diferentes tasas de difusión de gases entre el medio de cultivo, la atmósfera y los explantos. Diversos autores describen una relación entre el cultivo con bajos niveles de oxígeno y una mayor producción de ES (Bomal y Tremblay 1999; Carman 1988; Imamura y Harada 1981). En zanahoria, sin embargo, la baja disponibilidad de oxígeno se ha descrito que puede tanto estimular (Kessell y Carr 1972) como inhibir la embriogénesis somática (Komamine 1988). La inhibición del desarrollo de embriones por baja concentración de oxígeno también se ha descrito en membrillo (Fisichella y Morini 2003). El efecto del oxígeno depende, además, de la composición del medio de cultivo (Kvaalen y von Arnold 1991) y del estadio de desarrollo del material vegetal (Shigeta et al. 1996). La concentración de oxígeno puede también afectar el metabolismo de los reguladores de crecimiento añadidos al medio de cultivo, como se demostró en *Picea abies* (Kvaalen y Ernsten 1993). Además, en tejidos expuestos a altas concentraciones de oxígeno, se puede dar la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS), que podrían afectar la capacidad de regeneración (Benson 2000).

Por otro lado, los tejidos y células vegetales cultivados *in vitro* liberan a su microambiente gran variedad de sustancias con alta actividad fisiológica, tales como el dióxido de carbono o el etileno (Meskaoui y Tremblay 1999). En el caso del dióxido de carbono, la tendencia general descrita es que una acumulación de este gas resulta en una mejora de la embriogénesis somática (Johansson y Eriksson 1984; Kvaalen y von Arnold 1991) atribuyéndose este papel estimulador a un efecto sobre el crecimiento del callo (Hohe et al. 1999; Horn et al. 1992). No obstante, también se han descrito casos en los que no hay influencia del dióxido de carbono (Fisichella y Morini 2003) o donde esta es negativa (Kumar et al. 1989).

El etileno juega un papel muy importante en la regulación del crecimiento y desarrollo tanto *in vivo* (Abeles et al. 1992) como *in vitro* (Biddington 1992). La acumulación de dicha sustancia puede inhibir o estimular varias etapas de la embriogénesis somática de diversas especies (Biddington 1992).

El tipo de material subcultivado tuvo una influencia significativa en la proliferación de los cultivos embriogénicos en medio de desarrollo, corroborando los resultados anteriores obtenidos en el experimento de densidad de cultivo. Una alta densidad de cultivo debida al subcultivo de todo el material que presentaba buen estado y características embriogénicas (tipo A), resultó perjudicial para la proliferación de los

cultivos. Sin embargo, en esta ocasión, el desarrollo de ES no se vio afectado por esta variable. Esta diferencia respecto al experimento anterior podría ser debida a la utilización de distintos tipos de recipiente de cultivo.

Intentar establecer el tipo de recipiente más adecuado para cada una de las etapas de la embriogénesis somática de forma universal es imposible. Tanto la forma como el tamaño del recipiente vendrán determinados por la especie y dependerán de otros factores como el tipo de material, el tipo de cierre, el volumen de medio de cultivo y la densidad de inóculo (George y Davies 2008). No obstante, los resultados obtenidos ponen de manifiesto que en aguacate este es un factor determinante en el rendimiento del proceso de desarrollo de ES.

Las primeras etapas del proceso embriogénico han demostrado ser muy influyentes en etapas sucesivas, incluida la conversión de los ES en plantas (Bozhkov et al. 2002). Basándonos en esta premisa, se investigó el efecto de la luz durante la etapa de proliferación en el posterior desarrollo de ESBO.

De esta forma, a partir de cultivos mantenidos durante quince semanas en distintas condiciones lumínicas, se establecieron suspensiones embriogénicas y posteriormente se inició el desarrollo de ES en condiciones estándar (B5m10a y oscuridad). El desarrollo de ESBO se vio favorecido de forma significativa en aquellos cultivos cuya fase de proliferación se había realizado en oscuridad. Estos resultados corroboran la afirmación de von Arnold et al. (2002), según la cual la alteración de un factor en las primeras fases del proceso de embriogénesis somática puede tener repercusiones en etapas sucesivas. Así se ha descrito también en *Cinnamomum camphora* (Shi et al. 2009) donde el efecto de la luz en la fase de inicio no dio lugar a diferencias significativas en la frecuencia de inducción embriogénica, pero sí en el posterior desarrollo de ES. El número y calidad de los embriones desarrollados se vio incrementado en aquellos cultivos procedentes de la luz. En *Eucalyptus globulus* también pudo observarse un efecto de la luz aplicada durante la fase de proliferación en el posterior desarrollo de ES, mediante embriogénesis secundaria (Pinto et al. 2008). En este caso, los cultivos procedentes de oscuridad dieron lugar a embriones de mayor calidad que los procedentes de luz. En *Melia azerach* (Vila et al. 2007) también se comprobó que el régimen lumínico durante la fase de inducción determinaba la posterior conversión de los ES a plantas, la cual presentaba valores elevados en cultivos inducidos en luz mientras que era nula en cultivos iniciados en oscuridad.

Durante el proceso de histodiferenciación y maduración de los ES los factores ambientales, como la luz, pueden jugar un papel fundamental. Aun así, las condiciones

idóneas dependerán de cada cultivo y la elección de unas u otras se hará en base al método de ensayo y error (Merkle et al. 1995). La mayoría de los trabajos publicados donde se estudia el efecto de la luz se han centrado en las fases de inducción y proliferación pero respecto a su influencia en el proceso de desarrollo de ES no hay apenas trabajos publicados. Es relativamente común realizar las fases de inducción y proliferación en oscuridad y posteriormente transferir los cultivos a la luz para que tenga lugar el proceso morfogénico (George y Davies 2008). La luz consiguió mejorar la maduración y posterior germinación de ES en especies como *Myrciaria auerana* (Motoike et al. 2007), *Picea mariana* o *Picea rubens* (Tremblay y Tremblay 1991). En otras ocasiones, para obtener buenos resultados, todo el proceso de embriogénesis somática debía realizarse en oscuridad (Michler y Bauer 1991; Vengadesan y Pijut 2009).

En aguacate, se comprobó que el cultivo en oscuridad favorecía el desarrollo de ESBO.

GERMINACIÓN DE EMBRIONES SOMÁTICOS

La correcta acumulación de sustancias de reserva podría ser un indicador de calidad para una posterior conversión (Fujii et al. 1990). Numerosos estudios usan la acumulación de sustancias de reserva como marcador de la calidad de los ES (Merkle et al. 1995). En aguacate se optó por seleccionar la calidad de los ES en base al aspecto BO, indicador de la acumulación de sustancias de reserva (Cailloux et al. 1996). Los embriones traslúcidos, por el contrario, reflejarían la carencia o déficit de sustancias de reserva (Deng y Cornu 1992). Los resultados presentados ponen de manifiesto que solo los ESBO ≥ 4 mm germinaron, indicando que el criterio discriminatorio en base al aspecto es correcto. Aun así, el porcentaje sigue siendo bajo (10%) lo que indica que la mayoría de esos embriones no han madurado suficientemente. El hecho de que en embriones supuestamente maduros se observe proliferación de nuevo tejido embriogénico ya fue observado por Helmersson y von Arnold (2009) en *Juniperus communis*. Según estos autores, esto indica que todavía no se ha detenido el proceso de división celular y proliferación, lo que impide un correcto desarrollo y maduración del ES. La transición desde los primeros a los últimos estadios de la embriogénesis es clave para la regulación del proceso y se encuentra bajo el control de varios genes (Casson y Lindsey 2006). Controlar esta transición es imprescindible en todo proceso de regeneración vía embriogénesis somática.

El uso de agar en vez de gelrite supuso una mejora en la germinación de los ESBO de aguacate. Las diferencias observadas podrían ser explicadas, de acuerdo con Beruto et al. (1999), en base a diferencias en las propiedades fisicoquímicas de los geles formados, que pueden dar lugar a diferencias en la disponibilidad de agua y nutrientes. De acuerdo con Márquez-Martín et al. (2011), las diferencias observadas podrían atribuirse, entre otras causas, a diferencias en la firmeza del medio de cultivo.

A pesar de presentar buen aspecto y ajustarse al criterio de maduración utilizado en esta especie, los ES de la línea D6 no germinaron en ningún caso. Este resultado pone de manifiesto que en aguacate, el genotipo es un factor determinante en la conversión de ES en plantas. Este hecho ha sido descrito previamente en otras especies tales como *Quercus robur* (Martínez et al. 2008; Sánchez et al. 2003), *Picea abies* (Jalonen y von Arnold 1991), soja (Moon y Hildebrand 2003) o *Juniperus communis* (Helmersson y von Arnold 2009). En *Pinus pinaster* se realizó una evaluación del ciclo completo de embriogénesis somática utilizando cultivos embriogénicos procedentes de semillas seleccionadas de ocho cruzamientos distintos (Lelu-Walter et al. 2006). El potencial de germinación de los ES obtenidos estuvo significativamente influenciado por el cruzamiento del que procedían las semillas. Además, en líneas embriogénicas obtenidas a partir del mismo cruzamiento, la capacidad de germinación también fue variable.

Capítulo II

Caracterización de líneas embriogénicas SE y PEM

INTRODUCCIÓN

La embriogénesis somática es el proceso en el cual células somáticas son redirigidas hacia la formación de células totipotentes que se desarrollarán a través de estados de la embriogénesis para dar lugar a plantas completas (Suprasanna y Bapat 2006).

En los últimos años, la investigación sobre embriogénesis somática ha avanzado notablemente en un gran número de especies. Sin embargo, la mayoría de los estudios hasta hace relativamente poco tiempo se han limitado a abordar este proceso desde un punto de vista morfológico o fisiológico de manera que los avances se han producido fundamentalmente a través de modificaciones en las condiciones de cultivo. Como consecuencia de esto, el conocimiento sobre la regulación de este proceso es todavía bastante limitado.

La capacidad morfogénica de los cultivos embriogénicos varía significativamente entre distintas líneas de una misma especie (Becwar et al. 1987). Estas diferencias han sido descritas ampliamente en *Picea abies* (Egertsdotter y von Arnold 1993; Find et al. 1998a; Jalonen y von Arnold 1991) o *Pinus caribaea* (Laine y David 1990), pero también en especies como *Carya illinoensis* (Burns y Wetzstein 1997) y *Gentiana pannonica* (Mikula et al. 2002). Con el objetivo de averiguar las causas de dichas diferencias entre líneas, se han llevado a cabo diversos estudios de caracterización. Jalonen y von Arnold (1991) relacionaron la morfología y el patrón de proliferación de distintas líneas embriogénicas de *Picea abies* con la capacidad de los ES formados en cada una de ellas para madurar y dar lugar a plantas. De esta manera, las líneas embriogénicas fueron clasificadas en tres grupos (A1, A2 y B) en base a la morfología y organización de los ES. Los tipos A1 y A2 presentaban una masa embrionaria consistente en pequeñas células con citoplasma denso agrupadas de forma compacta y un suspensor formado por células altamente vacuoladas. Aunque con tasas diferentes, ambos tipos morfológicos regeneraban ES maduros al ser tratados con ABA, los cuales daban lugar posteriormente a plantas. En las líneas tipo B, los ES estaban compuestos por grupos de células embriogénicas unidas de forma laxa y que aparecían entremezcladas con células vacuoladas. En este tipo de líneas nunca se obtuvieron ES maduros (Jalonen y von Arnold 1991). Un estudio posterior realizado en la misma especie relacionó el hábito de crecimiento de las líneas celulares con su morfología y capacidad para regenerar plantas (Egertsdotter y von Arnold 1993). Así, mientras las líneas tipo A crecían bien en medio sólido, las líneas tipo B crecían mejor en medio líquido, en forma de suspensiones celulares (Egertsdotter y von Arnold 1993). Además, se observó que las

distintas líneas presentaban diferencias importantes en otros parámetros, tales como la frecuencia de división y la formación de colonias a partir de protoplastos. Un estudio similar fue realizado por Find et al. (1998a), quienes investigaron si las diferencias morfológicas observadas previamente por Jalonen y von Arnold (1991) entre líneas con distinta capacidad morfogénica podían ser explicadas en función de la cinética de crecimiento celular y el consumo de nutrientes del medio de cultivo. Sus resultados demostraron que mientras que la maduración de los ES en las líneas tipo A no se vio influenciada por el medio usado durante la fase de proliferación, en las líneas tipo B modificaciones en el medio de proliferación hicieron posible la obtención de ES maduros. El medio de proliferación alteró la composición celular de los cultivos y consecuentemente su capacidad para generar ES en estadios avanzados de desarrollo (Find et al. 1998a). En la caracterización de líneas embriogénicas de nuez también se observaron diferencias significativas en la capacidad morfogénica, la composición celular y la tasa de crecimiento de los cultivos (Burns y Wetzstein 1997). Las líneas tipo A, formadas por agregados de ES globulares y ES cotiledonares aislados, produjeron un número significativamente más elevado de 'masas de embriones preglobulares' que las líneas tipo B, formadas por ES globulares pero en agregados más finos. Las líneas tipo A también se caracterizaron por presentar una tasa de crecimiento mayor que los cultivos tipo B.

DESARROLLO DEL EMBRIÓN SOMÁTICO

Para regular de forma eficiente la formación de plantas via embriogénesis somática es importante conocer como tiene lugar el desarrollo del ES (von Arnold 2008). Este tipo de conocimiento se consigue a través de la elaboración de un 'mapa de destino' que represente un número adecuado de marcadores morfológicos y moleculares que especifiquen los distintos estados de desarrollo que se distinguen a lo largo del proceso (Irish y Sussex 1992; Strehlow y Gilbert 1993). Estos mapas pueden elaborarse mediante sistemas de división celular sincronizada (Nomura y Komamine 1985; Osuga et al. 1999; Tsukahara y Komamine 1997) o mediante un seguimiento o monitorización a intervalos fijos de tiempo del desarrollo de protoplastos, células o estructuras multicelulares (Filonova et al. 2000a; Golds et al. 1992; Somleva et al. 2000; Toonen et al. 1994).

Angiospermas

En angiospermas, *Daucus carota* es la especie modelo para estudiar patrones de desarrollo vía embriogénesis somática y los mecanismos moleculares que intervienen en su regulación (von Arnold 2008).

Mediante la técnica de la monitorización, Toonen et al. (1994) llevaron a cabo un estudio de la embriogénesis somática en suspensiones embriogénicas de zanahoria, a partir del cual se diseñó un mapa del proceso, que puede ser utilizado como modelo para angiospermas. De acuerdo con su morfología (esférica, ovalada o elongada) y la densidad del citoplasma (citoplasma denso o células vacuoladas), los autores clasificaron las células aisladas en cinco tipos y encontraron que todos los tipos celulares eran capaces de dar lugar a ES, aunque con una frecuencia variable. La formación del ES tuvo lugar en todos los casos a través de la misma secuencia de estados (0, 1 y 2) propuestos por Komamine et al. (1990). Para la formación del agregado celular considerado 'estadio 0' es necesaria la presencia de auxina, pero los siguientes estadios, 1 y 2, no se alcanzan hasta que la auxina es retirada del medio de cultivo. La formación del ES tiene lugar a través de tres rutas distintas dependiendo del tipo celular inicial. Estos patrones de desarrollo se diferencian por la existencia o ausencia de simetría geométrica en los distintos estados de agregados celulares que darán lugar al ES (von Arnold et al. 2002). De esta forma, las células ovales y elongadas, que siempre presentan vacuolas, darán lugar a ES mediante agregados celulares asimétricos. Las células redondas, que pueden ser vacuoladas o no, desarrollarán ES mediante agregados celulares simétricos. Finalmente, las células con una morfología inicial más variable, darán lugar a agregados celulares de morfología aberrante, los cuales se transformarán posteriormente en ES (Toonen et al. 1994). Estas observaciones implican que tanto el crecimiento organizado, como la polaridad, no son requisitos imprescindibles en el proceso de embriogénesis somática *in vitro*. Las PEMs inducidas por auxinas podrían actuar como intermediarios entre el crecimiento desorganizado y un patrón de desarrollo embrionario más conservativo (Halperin 1966; von Arnold 2008).

Gimnospermas

Usando la misma técnica que en angiospermas, también se ha estudiado el patrón de desarrollo de la embriogénesis somática en *Picea abies* (Filonova et al. 2000a), una especie modelo en gimnospermas.

Una diferencia destacable en la formación del ES en gimnospermas y angiospermas, es el hecho de que en las primeras, las células aisladas, independientemente de su morfología o tipo de citoplasma, no son capaces de formar ES. Para el desarrollo del ES es imprescindible partir de pequeños agregados celulares denominados PEM I (von Arnold 2008). Los agregados PEM I están compuestos por una célula vacuolada unida a un pequeño grupo compacto de células con citoplasma denso. Cuando el agregado PEM I es transferido a un medio con los nutrientes adecuados y un suplemento de auxinas y citoquininas, se forma una célula vacuolada adicional, con lo que se alcanza un estadio más avanzado, PEM II. En este estadio se observan los primeros indicios de degradación de ADN nuclear, que tiene lugar durante la embriogénesis somática (Filonova et al. 2000b). Posteriormente los PEM II van aumentando de tamaño mediante la formación de ambos tipos celulares (células vacuoladas y células con citoplasma denso) pero manteniendo un patrón bipolar. Transcurridos unos días, este patrón desaparece como consecuencia de una elevada proliferación de las células con citoplasma denso, dando lugar a la formación de los PEM III, a partir de los cuales se da la diferenciación del ES. Este proceso va acompañado de una degeneración de la estructura primaria a través de una muerte celular programada masiva. La retirada de hormonas del medio es imprescindible para el desarrollo del ES, a la vez que activa la muerte celular programada de las PEMs (Filonova et al. 2000b). Una vez que se han formado los ES en medio sin reguladores, para que se produzca una mayor diferenciación y maduración de los mismos, es necesaria la adición de un suplemento de ABA (von Arnold 2008). En respuesta al tratamiento con ABA, la masa embrionaria se vuelve opaca y tiene lugar la eliminación del suspensor a través de un proceso de muerte celular programada (Filonova et al. 2000b). Tras este proceso, los embriones se alargan y se diferencian los cotiledones, alcanzando así una morfología similar a la de los correspondientes ZE (von Arnold 2008).

De acuerdo con el modelo establecido en *Picea abies*, el proceso de embriogénesis somática incluye dos fases, que a su vez se dividen en más estadios de desarrollo específicos. La primera fase se caracteriza por la existencia de PEMs en proliferación, las cuales pueden pasar a través de los tres estadios característicos descritos anteriormente (I, II y III) pero que nunca dan lugar directamente a un ES. La segunda fase incluye el desarrollo del ES. Estos se forman *de novo* a partir de las PEMs III y, a partir de entonces, siguen la misma secuencia de estadios descritos para la embriogenia zigótica de Pináceas (Singh 1978).

La transición de PEM-ES ha sido señalada como uno de los pasos claves en el proceso de embriogénesis somática (Bozhkov et al. 2002; Filonova et al. 2000a; von Arnold 2008). La incapacidad de muchas líneas embriogénicas para desarrollar ES ha sido atribuida a una deficiente o inexistente transición de PEM a ES (von Arnold 2008). Por consiguiente, para conseguir una mejora en la eficiencia global del proceso embriogénico resulta imprescindible investigar qué factores intervienen y regulan esta transición (Stasolla y Yeung 2003). En gimnospermas, la muerte celular programada que conlleva la eliminación de los PEM III y del suspensor parece jugar también un papel importante en la regulación de todo el proceso embriogénico y concretamente en la formación del ES (Filonova et al. 2000b).

Aunque la utilización de los mapas modelos elaborados para angiospermas y gimnospermas puede ser de gran utilidad para el estudio del proceso de embriogénesis somática en otras especies, el modelo de desarrollo exacto es específico para cada una de ellas (von Arnold 2008). Además, con el objetivo de adquirir un conocimiento más profundo del proceso, es recomendable caracterizar cada estadio de desarrollo con la ayuda de marcadores moleculares.

EXPRESIÓN GÉNICA DURANTE LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA

El análisis de la expresión génica durante la embriogénesis somática puede proporcionar información muy útil para conseguir entender este proceso (Feher et al. 2003; Stasolla et al. 2004).

El hecho de que células somáticas sean capaces de dar lugar a embriones demuestra que el programa genético para la embriogénesis se lleva a cabo dentro de la propia célula, con independencia de los productos génicos procedentes del ambiente materno (Zimmerman 1993). Así, la morfología y el tamaño de los distintos estadios embrionarios son componentes intrínsecos de la programación génica y no están controlados por factores ambientales (Zimmerman 1993).

Siendo las coníferas uno de los grupos donde la embriogénesis somática se aplica de forma más rutinaria, no es de extrañar que muchos de los estudios realizados en relación a la regulación de la expresión génica durante la embriogénesis somática se hayan desarrollado en especies pertenecientes a este orden taxonómico. Así, en *Picea abies* se comprobó que la formación de tejidos específicos en el ES se da de forma simultánea con un cambio en el patrón de expresión de dos genes, *Pa18* y *PaHB1*, los cuales cambian de una

expresión ubicua en las PEMs a otra específica y exclusiva en una capa determinada de la superficie del ES (von Arnold et al. 2005). Además, la expresión ectópica de ambos genes conlleva a un bloqueo en el desarrollo embrionario (von Arnold et al. 2005).

De la misma manera, tres grandes tipos de cDNAs han sido caracterizados durante el desarrollo del ES en *Picea abies* (Dong y Dunstan 2000). Entre ellos, hay dos grupos que son imprescindibles para entender el desarrollo embrionario. Por un lado se encuentran los cDNAs que codifican proteínas relacionadas con la patogénesis, que además de jugar un papel en los mecanismos de defensa, también participan en el desarrollo embrionario (Stasolla y Yeung 2003). El segundo grupo de genes cuya expresión es diferencial durante la embriogénesis somática son los que codifican las proteínas abundantes en la embriogénesis tardía (LEA) y las proteínas de choque térmico (HSP) (Dong y Dunstan 1996; 1997).

La expresión de genes de la familia *KNOX* también parece jugar un papel importante en la embriogénesis somática de varias especies (Montero-Cortés et al. 2010). En *Picea abies*, el gen *HBK2*, perteneciente a dicha familia génica, se expresó durante la embriogénesis somática en una línea con alta capacidad morfogénica, pero no en otra línea donde el desarrollo de ES se encontraba bloqueado (Hjortswang et al. 2002). Además, en esa misma especie, la sobreexpresión del gen *HBK3*, mejoró el desarrollo de ES a partir de PEMs. Por el contrario, en aquellas líneas en las que dicho gen presentaba una expresión reducida disminuyó la producción de ES inmaduros, los cuales, además, eran incapaces de completar el proceso de maduración (Belmonte et al. 2007). La relevancia de la familia *KNOX* también se ha descrito en otras especies como *Zea mays* (Zhang et al. 2002) y *Elaeis guineensis* (Jouannic et al. 2007). Recientemente se ha descrito la implicación de los genes *CnKNOX1* en el desarrollo de ES de coco (Montero-Cortés et al. 2010).

Otros genes como *SERK* (Schmidt et al. 1997), *LEC* (Curaba et al. 2004; Gaj et al. 2005) o *BABY BOOM* (Boutilier et al. 2002), se ha demostrado que son activados específicamente durante la embriogénesis somática o que su expresión se produce de forma diferencial durante dicho proceso.

Considerando la importancia de las PEMs como estadio previo a la formación del ES, de forma general se piensa que estas son las responsables de sintetizar todos los productos génicos necesarios para completar el proceso de embriogénesis somática hasta el estadio de embrión globular (Zimmerman 1993). Además, las PEMs también contienen ARNm y proteínas cuya presencia de forma continuada bloquea el desarrollo de la embriogénesis somática. Tras la eliminación de las auxinas del medio de cultivo, se produce una

inactivación de los genes que las codifican, permitiendo que el proceso de embriogénesis se desbloquee y continúe (Zimmerman 1993).

En esta línea, el uso de la técnica de microarray para el análisis de los niveles de transcripción ha revelado en varias coníferas la importancia de las primeras fases de la embriogénesis en el posterior desarrollo del ES y en el rendimiento global del proceso (Stasolla et al. 2003; van Zyl et al. 2002). Stasolla et al. (2003) observaron que casi 200 genes eran diferencialmente expresados durante las primeras fases del proceso, pero este número se vio drásticamente reducido en las etapas siguientes. Este hecho parece indicar que es imprescindible una reprogramación de la expresión génica para la inducción de la embriogénesis somática, pero no para su continuación. Por lo tanto, la mejora en la calidad de los ES podría conseguirse mediante manipulaciones en las etapas más tempranas del proceso embriogénico (Stasolla y Yeung 2003), como también señalaron von Arnold et al. (2002).

PAPEL DE LAS PROTEÍNAS EN EL PROCESO DE EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA

Las proteínas ejercen una influencia directa en la bioquímica celular y proporcionan un análisis preciso sobre los cambios celulares que tienen lugar durante el crecimiento y desarrollo (Chen y Harmon 2006). En la embriogénesis somática, las proteínas, tanto intracelulares como extracelulares, han demostrado llevar a cabo funciones muy importantes (Oropeza et al. 2001). Por esta razón y con el objetivo de aumentar el conocimiento sobre los mecanismos de regulación de este proceso, se han llevado a cabo una serie de estudios en los que la embriogénesis somática se ha estudiado desde esta perspectiva; en los últimos años, este tipo de estudios se han abordado utilizando una aproximación proteómica.

Las investigaciones llevadas a cabo se han realizado a través de enfoques diferentes. Por un lado, hay un grupo de estudios que, con el objetivo de obtener marcadores específicos de capacidad embriogénica, se han centrado en caracterizar proteínas expresadas de forma diferencial en cultivos embriogénicos y no embriogénicos. Los perfiles proteicos obtenidos en especies como *Vitis vinifera* (Marsoni et al. 2008), *Spinacia oleracea* (Ishizaki et al. 2002) o *Medicago truncatula* (Imin et al. 2005), fueron diferentes dependiendo del carácter embriogénico o no embriogénico de los cultivos analizados. De esta forma, se pudieron identificar varias proteínas cuya abundancia fue significativamente mayor en los cultivos embriogénicos. La mayoría de estas proteínas estaban relacionadas con el estrés,

incluyéndose entre ellas la ascorbato peroxidasa citosólica, la glutatión-S-transferasa (GST) (Marsoni et al. 2008), la peroxirredoxina (Imin et al. 2005) o las HSP. A la vista de estos resultados se propuso que las células embriogénicas presentan una mayor capacidad para hacer frente al estrés oxidativo mediante una regulación del sistema de ROS y mediante la preservación de las estructuras proteicas gracias a las HSP.

En el segundo tipo de enfoque, la proteómica se ha aplicado para caracterizar los distintos estadios de desarrollo dentro de un sistema embriogénico. Winkelmann et al. (2006) en concordancia con los resultados obtenidos en cultivos embriogénicos de viña (Marsoni et al. 2008) identificaron proteínas de respuesta al estrés oxidativo y proteínas HSP, expresadas diferencialmente en ES y ZE de *Cyclamen*. La importancia de las proteínas involucradas en la protección frente al estrés oxidativo fue corroborada en *Citrus sinensis* cuando un gran número de isoformas de este tipo de proteínas presentaron patrones diferenciales durante la embriogénesis somática de esta especie (Pan et al. 2009). En un estudio descriptivo, Nogueira et al. (2007) publicaron un proteoma parcial de suspensiones embriogénicas de *Vigna unguiculata*, en el que uno de los grupos de proteínas más abundantes fueron aquellas relacionadas con la defensa frente a estreses de tipo biótico y abiótico (Nogueira et al. 2007).

REGULACIÓN HORMONAL DEL PROCESO DE EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA

La importancia de las hormonas vegetales en el proceso de embriogénesis somática está ampliamente documentada. Durante las últimas décadas, se han utilizado dos tipos de enfoques para entender de qué forma se lleva a cabo la regulación hormonal de este proceso.

La mayor parte de las primeras investigaciones se centraron en añadir al medio de cultivo distintos reguladores de crecimiento a distintas concentraciones, para inducir un determinado patrón de proliferación y desarrollo. Sin embargo, debido a la aparición y rápido perfeccionamiento de técnicas altamente sensibles, capaces de detectar y cuantificar moléculas de pequeño tamaño y presentes en los tejidos vegetales a concentraciones muy bajas, como es el caso de las hormonas, un nuevo enfoque está cobrando importancia en los últimos años. Así, con el objetivo de establecer una caracterización hormonal de la embriogénesis somática, varios grupos han tratado de correlacionar la capacidad embriogénica de los cultivos con la concentración endógena de determinadas hormonas. En los primeros trabajos realizados en este campo se postuló que los niveles endógenos de

hormonas eran la principal diferencia entre genotipos con distinta capacidad embriogénica (Bhaskaran y Smith 1990). De entre los distintos candidatos hormonales para jugar un papel relevante en la embriogénesis somática, el IAA es el que más frecuentemente se ha detectado a altos niveles en cultivos embriogénicos. De hecho, se ha postulado que la pérdida de capacidad embriogénica que se produce en determinados cultivos con el paso del tiempo podría estar relacionada con un descenso de los niveles endógenos de esta hormona. No obstante, también existen trabajos donde no se detectaron diferencias a nivel hormonal, incluyendo las auxinas (Jiménez 2005).

La evaluación de distintos genotipos de trigo que diferían significativamente en su capacidad embriogénica tuvo como resultado el establecimiento de una relación directa entre esta propiedad y contenidos altos de IAA y ABA (Kopertekh y Butenko 1995). Niveles altos de ABA también fueron detectados en genotipos competentes de trigo (Jiménez y Bangerth 2001b) y *Daucus* (Tran Thi y Pleschka 2005). En contraposición a estos trabajos, en otros estudios no se observaron diferencias a nivel hormonal en cultivos con distinta capacidad morfogénica (Jiménez y Bangerth 2001c; Limanton-Grevet et al. 2000) y también se han descrito casos en los que diferencias en las concentraciones de hormonas no fueron acompañadas de cambios en la capacidad embriogénica de los cultivos (Jiménez y Bangerth 2001d).

FACTORES ACONDICIONADORES QUE REGULAN EL PROCESO DE EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA

Las primeras observaciones bioquímicas en embriogénesis somática sugirieron la existencia de un 'factor' en el medio de cultivo que posibilitaba la coordinación de las divisiones celulares y la morfogénesis (Warren y Fowler 1981). Desde entonces, se han venido realizando grandes esfuerzos para determinar qué tipos de sustancias son excretadas al medio de cultivo de suspensiones celulares y actualmente pueden ser enumerados una gran y compleja variedad de compuestos. Se han detectado entre otros: polisacáridos, aminoácidos, reguladores de crecimiento, vitaminas y polipéptidos (Chung et al. 1992). Estos compuestos extracelulares pueden jugar un papel muy importante en el desarrollo de la embriogénesis somática actuando como inhibidores o como estimuladores (Matthys-Rochon 2005; Quiroz-Figueroa et al. 2000).

En la mayoría de las especies cultivadas *in vitro*, las proteínas relacionadas con los mecanismos de defensa en plantas se encuentran entre las sustancias que con mayor

frecuencia se han detectado en el medio de cultivo. En suspensiones embriogénicas de zanahoria, las endoquitinasas segregadas al medio de cultivo consiguieron aumentar la capacidad embriogénica del genotipo mutante sensible a la temperatura *ts11* (De Jong et al. 1995). Estas enzimas también promovieron la embriogénesis somática en protoplastos de zanahoria (Van Hengel et al. 2001). En *Picea abies* se observó una relación entre la secreción de endoquitinasas al medio y la capacidad para desarrollar ES (Mo et al. 1996). En cultivos embriogénicos de *Cichorium*, la mayor parte de las proteínas secretadas fueron identificadas como quitinasas y glucanasas, siendo su concentración mucho más elevada en cultivos embriogénicos que en no embriogénicos (Helleboid et al. 2000).

Las arabinogalactano proteínas (AGP) son un tipo de proteoglucanos con un alto contenido en carbohidratos. Estos compuestos están ampliamente distribuidos en el reino vegetal y se les atribuyen funciones relacionadas con procesos de crecimiento y desarrollo (Showalter 2001). Las AGP han sido detectadas en el medio de cultivo de distintas especies y hay un gran número de estudios que avalan la hipótesis de que juegan un papel fundamental en la embriogénesis. Kreuger y Van Holst (1993) comprobaron la existencia de un grupo característico de AGP excretadas al medio de cultivo de zanahoria que tenían un efecto estimulador sobre la embriogénesis somática. Además, la composición de ese grupo de AGP fue cambiando de acuerdo con la edad del cultivo embriogénico (Kreuger y Van Holst 1993) y los tipos celulares presentes en el medio (Toonen et al. 1997). En zanahoria, Van Hengel et al. (2001) encontraron que la adición de AGP al medio donde crecían cultivos no embriogénicos consiguió inducir en los mismos una respuesta embriogénica. En *Triticum aestivum* también se ha descrito un aumento notable en el número de embriones formados y de plantas regeneradas tras el uso de AGP (Letarte et al. 2006). En contraposición a estos trabajos, Toonen et al. (1997) observaron un descenso de la capacidad embriogénica cuando determinados grupos de AGP fueron añadidos a suspensiones de zanahoria.

El papel de las AGP se ha comprobado en muchos casos mediante la utilización del reactivo de Yariv β -D-glucosil (β GlcY), compuesto que se une de forma específica y selectiva a las AGP mediante un mecanismo que no se conoce totalmente (Guan y Nothnagel 2004). Esta interacción provoca la precipitación de las AGP y, consecuentemente, la inhibición de las mismas. Así, la adición de este compuesto al medio de cultivo produjo un bloqueo de la embriogénesis somática en zanahoria (Thompson y Knox 1998) y *Cichorium* (Chapman et al. 2000).

No obstante, las AGP no son los únicos compuestos capaces de ejercer una inhibición de la embriogénesis somática sino que también se ha descrito la existencia de otras proteínas extracelulares que provocaron un bloqueo del proceso embriogénico en cultivos de *Citrus aurantium* (Gavish et al. 1992) y uva (Coutos-Thevenot et al. 1992).

Para aprovechar la influencia de estas sustancias segregadas al medio de cultivo, una de las estrategias que se utilizan para regular la embriogénesis somática es el empleo de medio acondicionado (MA). El MA es un medio de cultivo en el cual se han mantenido suspensiones embriogénicas durante un periodo de tiempo suficiente para que los cultivos hayan secretado diversos tipos de sustancias. El uso de este tipo de medio puede estimular o inhibir el proceso de embriogénesis somática dependiendo de las sustancias segregadas, inhibidoras o estimuladoras, y de la concentración de las mismas (Kobayashi et al. 1999).

En aguacate se han descrito diferencias morfológicas relacionadas con una capacidad embriogénica diferencial (Márquez-Martín et al. en prensa; Witjaksono y Litz 1999a). De esta forma, Witjaksono y Litz (1999a) clasificaron los cultivos embriogénicos de esta especie en dos tipos de líneas, SE y PEM, dependiendo de su morfología en presencia de auxina. Posteriormente, Márquez-Martín et al. (en prensa) comprobaron que ambos tipos de líneas presentan también diferente capacidad para dar lugar a ES maduros y requerimientos de cultivo diferenciales.

Disponer de líneas dentro de una misma especie con distinta capacidad morfogénica, que puedan diferenciarse morfológicamente hace posible su utilización como modelo para el estudio de los mecanismos que intervienen en la regulación de la embriogénesis somática. Estudios de este tipo se han llevado a cabo en coníferas, pero no son frecuentes en angiospermas. Además, en la mayoría de los estudios llevados a cabo en otras especies solo se han analizado una o dos variables.

En el presente trabajo, con el objetivo de revelar los posibles factores que intervienen en la regulación de la capacidad morfogénica en cultivos embriogénicos de aguacate, se ha abordado el análisis de factores muy diversos tales como la morfología, el patrón de proliferación, la respuesta a MA y AG, el perfil proteómico y los niveles endógenos de IAA.

MATERIAL Y MÉTODOS

MATERIAL VEGETAL Y CONDICIONES DE CULTIVO

Los cultivos embriogénicos de aguacate (*Persea americana* Mill.) fueron iniciados a partir de ZE, extraídos de frutos inmaduros del cultivar 'Anaheim', siguiendo el protocolo de Pliego-Alfaro y Murashige (1988) tal y como se indicó en el capítulo I del presente manuscrito. Se establecieron diferentes líneas embriogénicas, procedentes cada una de ellas de un ZE distinto. Las líneas embriogénicas se mantuvieron en el mismo medio de cultivo utilizado para la fase de inicio con subcultivos a medio fresco cada cinco semanas. Todos los cultivos se mantuvieron en oscuridad a $25 \pm 1^\circ\text{C}$.

Siete meses después de su inicio, distintas líneas embriogénicas fueron divididas en dos grupos, SE o PEM. De acuerdo con Witjaksono y Litz (1999a) se hizo una primera separación en base a sus características morfológicas, clasificando como líneas SE aquellas que estaban constituidas por ES en diferentes estadios de desarrollo y presentaban una baja frecuencia de PEMs y como líneas PEM las compuestas mayoritariamente por PEMs, con escasa presencia de ES y proembriones. De acuerdo con Márquez-Martín et al. (en prensa) también se comprobó que presentaban diferentes capacidades morfogénicas. Para ello, se cuantificó en cada una de ellas la formación de ESBO siguiendo el protocolo de maduración puesto a punto por Márquez-Martín et al. (2011).

Para llevar a cabo la presente investigación, se seleccionaron cuatro líneas embriogénicas, dos tipo SE (Ah11 y Ah52) y dos tipo PEM (Ah4 y Ah22), tanto en relación a su aspecto (Fig. 42) como a la capacidad para producir ES en estadios avanzados de desarrollo. Todas las líneas utilizadas habían sido iniciadas al mismo tiempo.

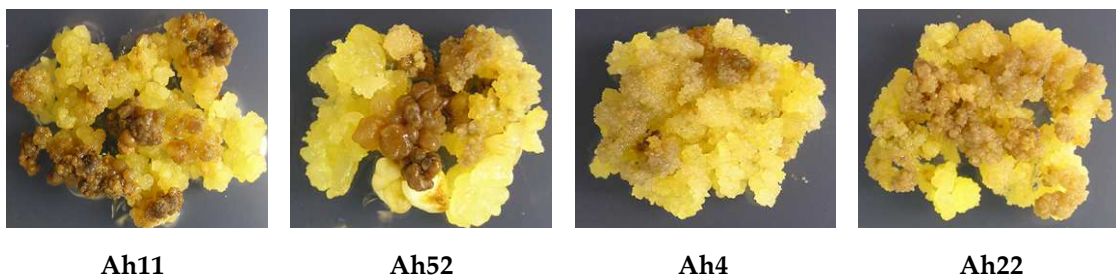


Figura 42. Aspecto general de las líneas tipo SE y tipo PEM utilizadas, en condiciones estándar de proliferación.

Para llevar a cabo los distintos experimentos se seleccionó el mismo material que normalmente se emplea para el mantenimiento de los cultivos, consistente en una mezcla de callo embriogénico y ES en estadios tempranos de desarrollo. Debido a las características de las líneas PEM, en este caso, el material de proliferación (PM) estaba compuesto mayoritariamente por callo embriogénico.

Para llevar a cabo el análisis proteómico de una forma rigurosa, en ambos tipos de cultivo se seleccionó tejido embriogénico tipo callo, común en todas las líneas embriogénicas. La identificación y selección del mismo se llevó a cabo con ayuda de una lupa estereoscópica. Este callo presentaba características similares en ambos tipos de líneas, SE y PEM, y se caracterizaba por presentar color amarillo claro y una textura fácilmente disgregable. Para evitar diferencias en los niveles hormonales debidas al estado de desarrollo del material utilizado (Jiménez et al. 2005) y no al tipo de línea embriogénica, la cuantificación de IAA también se llevó a cabo en callo embriogénico. En ambos casos el material seleccionado fue congelado en nitrógeno líquido (LN) y almacenado a -80°C hasta el momento del análisis.

EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD MORFOGÉNICA EN CALLO DE LÍNEAS TIPO SE Y PEM

Como se indicó en el capítulo I, el explanto utilizado para el establecimiento de las suspensiones previas a la inducción del desarrollo de ES es PM, una mezcla heterogénea de distintos tipos celulares que incluye callo y ES en estadios tempranos de desarrollo. Sin embargo, para el análisis proteómico y la cuantificación de IAA, se seleccionó exclusivamente callo embriogénico, no PM. Ya que la capacidad para producir ESBO no había sido previamente testada en este tejido, se llevó a cabo un experimento para evaluar la capacidad morfogénica del callo embriogénico procedente de ambos tipos de cultivo. Con este objetivo, y de acuerdo con el protocolo previamente indicado, se establecieron suspensiones embriogénicas de cada una de las cuatro líneas, usando callo como explanto inicial. Durante la fase posterior de producción de ES se tomaron datos del número de ESBO (totales y ≥ 4 mm) producidos por cultivo y del porcentaje de regeneración de ambos tipos de embriones durante un subcultivo de cinco semanas.

CARACTERIZACIÓN DE CULTIVOS TIPO SE Y PEM

Caracterización morfológica

Con el propósito de realizar una caracterización morfológica de los dos tipos de cultivo se iniciaron cultivos embriogénicos en la fase de proliferación a partir de cada una de las cuatro líneas seleccionadas. Para ello, se cultivaron 0,1 g de PM en medio MSPA. Los cultivos se mantuvieron en condiciones estándar de mantenimiento.

Varios parámetros fueron evaluados al final de un ciclo de mantenimiento de cinco semanas. En primer lugar se determinó el PF total del cultivo. Seguidamente, este se dividió en: tejido oxidado, callo embriogénico y ES de distintos tamaños (< 1 mm, 1-2 mm, 3-4 mm, > 4 mm). A continuación, se pesó cada tipo de material y se cuantificó el número de ES de cada uno de los tamaños indicados.

Se utilizaron 10 réplicas por cada línea embriogénica (20 por cada tipo de cultivo).

Monitorización fotográfica de la proliferación

El patrón de proliferación de cada línea embriogénica fue examinado mediante fotografías tomadas a intervalos semanales. Para facilitar la toma de las fotografías el cultivo de las líneas embriogénicas se llevó a cabo en placas de Petri, en vez de en tubos. Los cultivos en placas de Petri se iniciaron mediante inoculación de 0,1 g de PM en 25 ml de medio MSPA contenido en placas de Petri de 90 x 25 mm que fueron posteriormente selladas con Parafilm®. El mantenimiento de los cultivos se llevó a cabo en condiciones estándar. Las placas fueron marcadas para mantener una posición y orientación fijas durante todo el ciclo de cultivo. La cámara se colocó en una plataforma iluminada y todas las fotografías fueron tomadas desde la misma posición. Los cultivos fueron fotografiados en el momento del inicio (0 días) y 7, 14, 21, 28 y 35 días después.

Se utilizaron 3 cultivos por cada línea embriogénica.

Curvas de crecimiento

Para investigar la cinética de proliferación en ambos tipos de cultivos, a partir de cada una de las líneas embriogénicas se iniciaron 0,1 g de PM en tubos de 25 x 150 mm que contenían 25 ml de medio estándar de proliferación (MSPA).

El crecimiento se evaluó cuantificando el PF, peso seco (PS) y volumen celular sedimentado (VCS). Estos parámetros fueron evaluados a intervalos semanales durante los 35 días del ciclo de cultivo. Para determinar el VCS, los cultivos se pasaron, junto con 1 ml

de medio líquido MSP, a tubos de ensayo graduados y se midió el volumen tras 5 min en reposo. El PS se determinó después de secar los cultivos en una estufa a 70°C durante 24 h.

El crecimiento de los cultivos también se expresó como coeficiente de crecimiento. De acuerdo con Mikula et al. (2002), este parámetro se define como la diferencia entre el PF, PS o VCS registrado tras 35 días de cultivo y sus correspondientes valores iniciales, de acuerdo con las siguientes fórmulas: $FC = PF_f - PF_i$, $FC = PS_f - PS_i$ y $FC = VCS_f - VCS_i$, donde i indica inicial y f final.

En cada caso se utilizaron 6 réplicas por cada línea embriogénica.

INFLUENCIA DE FACTORES ACONDICIONADORES SOBRE EL DESARROLLO DE EMBRIONES SOMÁTICOS BLANCO-OPACOS EN LÍNEAS SE Y PEM

En la regulación de la embriogénesis somática intervienen diversas sustancias secretadas por los tejidos al medio de cultivo que pueden contribuir de forma positiva o negativa al desarrollo del proceso (Massonneau et al. 2005). En este bloque de experimentos, el objetivo fue comprobar si algunas de las sustancias normalmente descritas tienen influencia en cultivos embriogénicos de aguacate y si esta tiene lugar de forma diferencial en las líneas SE y PEM.

Se utilizaron las mismas líneas embriogénicas que en experimentos anteriores (Ah11, Ah52, Ah4 y Ah22). El inicio de las suspensiones embriogénicas y el posterior desarrollo de ESBO se llevó a cabo en todos los casos, salvo que se indique lo contrario, de acuerdo con la metodología estándar indicada en el capítulo I del presente manuscrito (Márquez-Martín et al. 2011).

Al final de la fase de cultivo en suspensión se tomaron datos del PF de las mismas. Después de cinco semanas en fase de maduración, se tomaron datos de incremento de peso, porcentaje de regeneración de ESBO (totales y ≥ 4 mm) y número de ESBO formados por cultivo (totales y ≥ 4 mm).

En todos los experimentos se utilizaron 15-20 réplicas por línea embriogénica y tratamiento.

Influencia del medio acondicionado añadido en la fase de suspensión

El MA ha sido usado para aumentar la eficiencia del proceso embriogénico en diferentes especies (Kobayashi et al. 1999).

Para la obtención del MA se establecieron suspensiones embriogénicas siguiendo el protocolo de Márquez-Martín et al. (en prensa). En medio líquido MSP, se inocularon 0,4 g de PM procedente de líneas con alta capacidad embriogénica (Ah11 y Ah52). Las suspensiones se mantuvieron en agitación orbital en condiciones de luz difusa durante 21 días. Trascurrido este tiempo, se dejaron reposar durante 5 min para provocar la sedimentación de los cultivos. El medio de cultivo procedente de las suspensiones fue esterilizado mediante filtración y utilizado de forma inmediata en los distintos experimentos.

Con el objetivo de estudiar el efecto del MA sobre la capacidad morfogénica de cultivos SE y PEM, se establecieron suspensiones a partir de las líneas SE y PEM seleccionadas en los siguientes tratamientos:

1. Control: 40 ml de medio líquido estándar MSP.

2. 50% MA: Mezcla compuesta por 20 ml de MA y 20 ml de medio MSP. Para ello, se preparó el medio MSP de forma habitual pero repartiendo alícuotas de 20 ml en cada matraz. Los matraces fueron esterilizados en autoclave y dejados enfriar. Posteriormente, en condiciones estériles, se añadieron a cada matraz 20 ml de MA.

3. 100% MA: las suspensiones fueron iniciadas en 40 ml de MA. En este caso, en primer lugar se procedió a la esterilización por autoclavado de los matraces vacíos y posteriormente, en condiciones estériles, se llenaron con 40 ml de MA.

Una vez iniciadas las suspensiones embriogénicas en cada uno de los tratamientos anteriores, se mantuvieron según el protocolo estándar durante 9 días en agitación orbital y trascurrido este tiempo se inició el desarrollo de ES. En cada una de las fases se tomaron los datos habituales.

Influencia del arabinogalactano añadido en la fase de suspensión

Las AGP representan una familia proteica que juega un papel fundamental en el desarrollo y morfogénesis vegetal y han sido encontradas en el medio de cultivo de distintos cultivos embriogénicos (Immerzeel et al. 2006). La influencia de las AGP en la embriogénesis somática de aguacate se ha estudiado analizando el efecto de la adición de arabinogalactano (AG) al medio de cultivo, siguiendo el procedimiento de Ben Amar et al. (2007).

En un primer experimento, AG de madera de alerce (A-9788 Sigma) fue añadido al medio líquido MSP a las concentraciones de 0, 0,1 y 1 mg l⁻¹ para el establecimiento de suspensiones embriogénicas.

El efecto de este suplemento se evaluó tanto en la fase de suspensión, mediante la cuantificación del PF de las suspensiones transcurridos 9 días, como en la siguiente fase de desarrollo de ES, registrando los parámetros habituales.

Influencia del arabinogalactano añadido en la fase de desarrollo

En este segundo experimento, el AG fue añadido a las concentraciones anteriores (0, 0,1 y 1 mg l⁻¹) al medio de cultivo B5m10a, utilizado normalmente para el desarrollo y maduración de los ES de aguacate (Márquez-Martín et al. 2011). Para ello, se preparó el medio B5m10a de forma habitual pero su esterilización se llevó a cabo antes de ser repartido en frascos. Una vez esterilizado y templado, se le añadió el AG (previamente esterilizado por filtración) a las concentraciones señaladas y el medio fue repartido en frascos previamente esterilizados.

El efecto en esta fase del proceso se evaluó tomando datos de incremento de peso de los cultivos y de producción de ESBO.

Influencia del reactivo de Yariv β -D-glucosil añadido en la fase de suspensión

El β GlcY es un fenilglicósido sintético que se une de forma específica a las AGP, provocando la precipitación de las mismas (Guan y Nothnagel 2004).

Este reactivo se añadió a las suspensiones embriogénicas de aguacate para determinar si el efecto del MA podía estar mediado por AGP. Para ello, se establecieron suspensiones embriogénicas utilizando como medio de cultivo la combinación 50% MA, consistente, como se ha indicado anteriormente, en una mezcla al 50% de MA y medio MSP. Este medio líquido fue suplementado con β GlcY (Biosupplies) a tres concentraciones distintas (0, 5 y 25 μ M). También se iniciaron suspensiones en medio estándar (MSP) y, como control adicional, se incluyó un tratamiento consistente en medio 50% MA suplementado con 5 μ M del reactivo de Yariv α -D-galactosil (α GalY) (Biosupplies). Este reactivo, al contrario que el β GlcY, no reacciona con las AGP (Serpe y Nothnagel 1994) y por esta razón se utiliza como control para comprobar el efecto de la unión específica entre las AGP y el β GlcY (Thompson y Knox 1998).

ANÁLISIS PROTEÓMICO

Extracción de proteínas

Las muestras fueron extraídas siguiendo el método puesto a punto por Carpentier et al. (2005). De acuerdo con el mismo, muestras de callo embriogénico, previamente congeladas y almacenadas a -80°C , fueron machacadas en un mortero con LN y 50-70 mg del homogeneizado fueron suspendidos en 500 μl de tampón de extracción (Tris-HCl 50 mM, pH 8,5, EDTA 5 mM, KCl 100 mM, DTT al 1% (p/v), sacarosa al 30% (p/v) y cóctel inhibidor de proteasas (Roche Applied Science)) a 0°C y agitados en vortex durante 30 s. A continuación se añadieron 500 μl de fenol tamponado (pH 8,0) a cada muestra y se mantuvieron en agitación en vortex 15 min a 4°C . Seguidamente, las muestras fueron centrifugadas durante 3 min a $6000 \times g$ y 4°C . Tras recoger exclusivamente la fase fenólica se realizó una re-extracción con 500 μl de tampón de extracción y agitación en vortex durante 30 s. Después de centrifugar durante 3 min a $6000 \times g$ y 4°C , se recolectó de nuevo la fase fenólica y se añadieron 5 volúmenes de una solución de acetato amónico 100 mM en metanol a -20°C . Las muestras permanecieron durante una noche en una gradilla vertical a -20°C para facilitar la precipitación de las proteínas y posteriormente fueron centrifugadas 60 min a $16000 \times g$ y 4°C . Tras eliminar el sobrenadante, el precipitado fue lavado dos veces con una solución consistente en acetona a -20°C y DTT al 0,2% (p/v). Después del primer lavado, las muestras permanecieron en la solución de enjuague durante 1 h a -20°C . Una vez realizados ambos enjuagues, se llevó a cabo una centrifugación durante 30 min a $16000 \times g$ y 4°C , eliminándose el sobrenadante. El precipitado se dejó secar a temperatura ambiente e inmediatamente después fue disuelto en 100 μl de tampón de lisis (urea 7 M, tiourea 2 M, CHAPS al 4% (p/v), Tris 30 mM). Los extractos obtenidos fueron congelados a -80°C .

Cuantificación de proteínas

La concentración de proteínas de cada muestra fue determinada utilizando el kit 2-D Quant (GE Healthcare), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Marcaje de las muestras con fluoróforos

En la técnica de electroforesis bidimensional diferencial en gel (2D-DIGE), como paso previo a la electroforesis, las muestras de proteínas son marcadas con tres colorantes fluorescentes espectralmente distintos ya que serán corridas de forma simultánea en el

mismo gel. En nuestro caso, los extractos fueron marcados con los fluoróforos Cy2, Cy3 y Cy5 (GE Healthcare) (Fig. 43A), tal y como describen Carpentier et al. (2009). Brevemente, cada muestra (conteniendo 50 μg de proteínas) fue marcada de forma independiente en la oscuridad durante 30 min a 0°C con 400 pmoles de los fluoróforos Cy3 y Cy5 disueltos en DMF (227056 Sigma) al 99,8% (Fig. 43B). El patrón interno, una mezcla de todas las muestras proteicas, fue marcado de la misma forma con el fluoróforo Cy2. La reacción de etiquetado se detuvo mediante la adición de 1 μl de una solución de L-lisina 10 mM (L5501 Sigma) que se mezcló por agitación en microcentrífuga. Las muestras permanecieron durante 10 min en hielo en condiciones de oscuridad. Posteriormente, fueron diluidas con 2 μl de tampón de lisis con DTT al 2% (p/v) y tampón de gradiente lineal inmovilizado (IPG) al 1,6% (v/v) y se mantuvieron a temperatura ambiente durante 10 min.

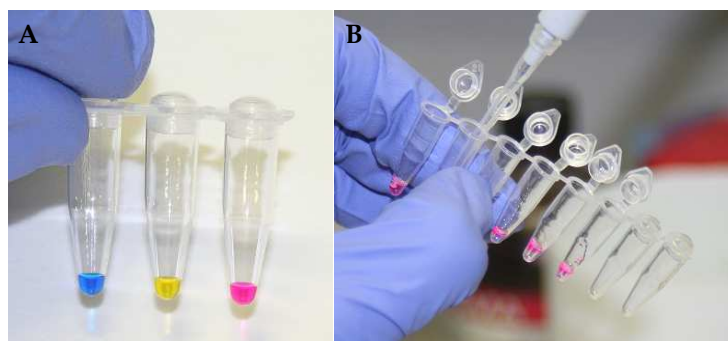


Figura 43. (A) Fluoróforos Cy3, Cy2 y Cy5. (B) Etiquetado de las muestras con Cy3.

Primera dimensión

Las muestras fueron diluidas en tampón de rehidratación (urea 6 M, tiourea 2 M, CHAPS al 0,5% (p/v), glicerol al 10% (v/v), azul de bromofenol al 0,002% (p/v), tampón IPG al 0,5% (v/v) y DTT al 0,28% (p/v)) hasta llegar a una concentración final de 50 μg de proteína en el volumen de carga (150 μl).

Para llevar a cabo el isoelectroenfoque, o primera dimensión, se utilizó un equipo IPGphor II (Amersham Biosciences) y tiras IPG de 24 cm que comprendían un rango de pH entre 4 y 7 (GE Healthcare). Estas tiras fueron rehidratadas durante un mínimo de 8 h y cubiertas con aceite mineral antes de iniciar el isoelectroenfoque. Las muestras se cargaron en la parte anódica y el isoelectroenfoque se realizó según el siguiente programa: 20°C , 3 h a 300 V, 6 h a 1000 V, 3 h a 8000 V (gradiente).

Segunda dimensión

Como paso previo a la segunda dimensión, las tiras IPG fueron sometidas a un tratamiento de equilibrado. Para ello, se mantuvieron sumergidas durante 15 min en 10 ml de solución equilibrante (urea 6 M, glicerol al 30% (v/v), SDS al 2% (p/v), azul de bromofenol al 0,002% (p/v) y Tris-HCl 50 mM, pH 8,8) suplementada con DTT al 1% (p/v). Seguidamente se trataron durante 15 min con 10 ml de solución equilibrante suplementada con iodoacetoamida al 4,5% (p/v).

La separación en la segunda dimensión se realizó en un equipo Ettan DALT System (Amersham Biosciences) utilizando geles de poliacrilamida (12,5%) con SDS, de 1,5 mm de grosor. Para la elaboración de los geles de poliacrilamida se siguió el procedimiento descrito por Carpentier et al. (2009), añadiéndose los siguientes componentes en agitación continúa: 250 ml de acrilamida/bisacrilamida (37,5:1) al 30%, 150 ml de tampón Tris 1,5 M, pH 8,8, 187 ml de agua MiliQ, 300 µl de TEMED, 6 ml de SDS al 10% (p/v) y 2,4 ml de APS al 10% (p/v).

Se cubrieron con isobutanol saturado en agua y la polimerización se realizó durante toda la noche. Posteriormente, se retiró el isobutanol y los geles se enjuagaron varias veces con agua MiliQ antes de su utilización.

Para llevar a cabo la segunda dimensión, la cubeta inferior del aparato se llenó con tampón de corrida consistente en Tris 25 mM, SDS al 0,1% (p/v) y glicina 192 mM disuelto en agua destilada. Las tiras IPG se enjuagaron con tampón de corrida y se colocaron cuidadosamente en la parte superior de los geles, asegurándonos de que estuvieran en contacto directo con los mismos y eliminando las posibles burbujas de aire existentes. Las tiras se sellaron mediante la adición de 2-3 ml de solución de sellado de agarosa (agarosa al 0,5% (p/v), azul de bromofenol al 0,002% (p/v) y tampón de corrida). Finalmente, los geles se corrieron a 2 W/gel durante toda la noche.

Escaneo de los geles y análisis de imagen

Los geles fueron preescaneados a baja resolución a las tres longitudes de onda de los fluoróforos utilizados y el tubo fotomultiplicador fue ajustado para garantizar un máximo de intensidad entre 70.000 y 100.000 píxeles. A continuación, los geles fueron escaneados con una intensidad de píxeles óptima. El equipo utilizado fue un Typhoon™ imager (GE Healthcare).

Las imágenes obtenidas se analizaron con el software Differential Analysis Decyder 7.0 (GE Healthcare) consistente en un programa de análisis de imágenes para la detección, cuantificación, posicionamiento y análisis de la abundancia diferencial de proteínas. La opción 'False discovery rate' fue aplicada para reducir el número de falsos positivos y su módulo EDA (extended data analysis) fue utilizado para la realización de ANOVA. Finalmente, se realizó un análisis de componentes principales (PCA) con aquellos puntos presentes en al menos un 75% de los mapas proteicos generados por el patrón interno.

Digestión proteica de puntos

Una vez finalizado el análisis de imágenes, los puntos de interés fueron escindidos manualmente del gel y colocados individualmente en placas de acuerdo con Carpentier et al. (2007). Cada punto fue enjuagado con 20 μ l de agua ultrapura (MS grade, Biosolve) y posteriormente deshidratado con 40 μ l de CH₃CN al 95% (v/v). Este proceso fue repetido tres veces consecutivas. Las partículas de gel deshidratadas fueron sometidas a una digestión enzimática en la que fueron incubadas a 4°C con 2 μ l de tampón de digestión (25 ng de tripsina MS Gold (Promega), NH₄HCO₃ 50 mM y CH₃CN al 10% (v/v)). Después de 30 min de rehidratación, se añadieron 10 μ l de tampón (NH₄HCO₃ 25 mM y CH₃CN al 10% (v/v)). Transcurridas 3 h de proteólisis a 37°C, los péptidos resultantes fueron sometidos a un proceso de purificación y desalación utilizando puntas de pipeta que contenían una matriz C18 (ZipTip C₁₈, Millipore). Los péptidos adsorbidos en la microcolumna C18 se eluyeron con 1,2 μ l de solución matriz para MALDI (7 mg/ml CHCA en ACN al 50% (v/v)) con TFA al 0,1% (v/v) y fueron depositados sobre una placa MALDI.

Identificación de proteínas

La identificación de proteínas se realizó en el Servicio de Espectrometría de Masas del Centro de Análisis Proteómico y de Espectrometría de Masas de Amberes (Bélgica) y está basada en el análisis de la huella peptídica y su espectro de fragmentación y la búsqueda de las secuencias en bases de datos. Las proteínas se identificaron por homología con otras especies. Dicho proceso se realizó en un aparato ABI 4800 MALDI-TOF-TOF (Applied Biosystems) con una tolerancia en la masa del péptido de 30 ppm y una tolerancia en la masa del fragmento de 0,2 Da. Los datos obtenidos fueron sometidos a identificación mediante un motor de búsqueda (Mascot, Matrix Science) utilizando la base de datos del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (Estados Unidos) y las plantas verdes

como taxonomía, Viridiplantae (655415 secuencias). La confirmación positiva e identificación de las proteínas se realizó mediante el algoritmo específico MOWSE. Sólo se tuvieron en cuenta aquellas identificaciones donde la puntuación del péptido fue mayor de 70.

En cada línea embriogénica se analizaron 3 muestras procedentes de cultivos embriogénicos distintos.

CUANTIFICACIÓN DE LOS NIVELES ENDÓGENOS DE ÁCIDO INDOLACÉTICO

La extracción y cuantificación de los niveles endógenos de IAA de las líneas embriogénicas SE y PEM se realizó siguiendo un protocolo interno en el Departamento de Espectrometría de Masas, de los Servicios Centrales de Apoyo a la Investigación (SCAI) de la Universidad de Córdoba.

Preparación de las muestras

Cada muestra estaba constituida por 1 g de callo embriogénico al cual se le añadió 25 ml de acetonitrilo, 25 µl de patrón interno (IAA D5 a una concentración de 20 ppb) y 1 g de Na₂SO₄, para absorber el agua presente en la muestra de tejido vegetal. El proceso de extracción se realizó utilizando un homogeneizador Ultra-Turrax a 24.000 rpm. El extracto resultante fue centrifugado a 4.000 rpm durante 10 min. Tras recoger el sobrenadante, este fue desecado en un rotavapor a 40°C y posteriormente reconstituido con 1 ml de agua/metanol (80/20 v/v) conteniendo 0.1% de ácido fórmico. Finalmente, las muestras fueron filtradas a través de un filtro de PTFE de 0.45 µm.

Análisis y cuantificación de ácido indolacético

El análisis de las muestras se llevó cabo por HPLC-MS, utilizando un detector de masas QTRAP 5500 de ABSCIEX, equipado con una fuente de ionización por electrospray. Los analitos se ionizaron en modo positivo trabajando a un voltaje de capilar de electrospray de 5500 V. Los iones formados se detectaron utilizando MRM (Multiple Reaction Monitoring), tomando un ión padre por compuesto y fragmentándolo en al menos dos iones hijos. La separación por HPLC se llevó a cabo utilizando un equipo Perkin Elmer, equipado con un muestreador y una bomba binaria. Se utilizó una columna de separación C18 (10 cm de longitud, 2,1 mm de diámetro interno y 2 µm de tamaño de partícula)

mantenida a 35°C. Se trabajó con dos fases móviles en modo gradiente (agua/0.1% ácido fórmico y metanol), a un flujo de 0.3 ml/min.

La identificación se llevó cabo por tiempo de retención cromatográfico y por Ion Ratios.

Se analizaron 3 muestras biológicas distintas por cada línea embriogénica.

Análisis estadístico

Los datos expresados como porcentajes fueron analizados por análisis de frecuencias utilizando el test de independencia RxC mientras que el resto de datos se analizaron mediante análisis de la varianza (ANOVA), estableciendo la diferencia entre medias con el test LSD. El nivel de significación fue 0,05 en todos los casos.

RESULTADOS

EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD MORFOGÉNICA EN CALLO DE LÍNEAS TIPO SE Y PEM

Los resultados obtenidos demostraron que el callo embriogénico también podía ser utilizado como explanto para inducir el desarrollo de ESBO (Tabla 5). Tanto en las líneas SE como en las PEM, no se observaron diferencias en la producción de ESBO debidas al tipo de explanto utilizado, callo o PM (Tabla 5). Las diferencias en relación a la capacidad morfogénica entre líneas SE y PEM quedó corroborada cuando se utilizó callo como explanto inicial, aunque en el caso de los ESBO ≥ 4 mm no fueron estadísticamente significativas (Tabla 5). En ambos casos los valores obtenidos fueron más elevados en las líneas SE que en las PEM.

Tabla 5. Número de ESBO (totales y ≥ 4 mm) producidos por cultivo a partir de callo y PM de líneas SE y PEM. Letras distintas indican diferencias significativas obtenidas mediante ANOVA al 5%.

Tipo de cultivo	Línea embriogénica	Explanto	Nº ESBO/cultivo	Nº ESBO ≥ 4 mm/cultivo
SE	Ah52	Callo	1,71 b	0,36 b
SE	Ah52	PM	1,46 b	0,3 b
SE	Ah11	Callo	2,94 a	0,94 a
SE	Ah11	PM	2,62 a	0,81 a
PEM	Ah22	Callo	0 c	0 b
PEM	Ah22	PM	0 c	0 b
PEM	Ah4	Callo	0,11 c	0,06 b
PEM	Ah4	PM	0,22 c	0,05 b

CARACTERIZACIÓN DE CULTIVOS TIPO SE Y PEM

Caracterización morfológica

Todos los parámetros evaluados después de un ciclo de cultivo de 35 días en medio de mantenimiento presentaron diferencias significativas entre las líneas SE y las PEM. Así, el PF total de los cultivos fue significativamente más elevado en las líneas PEM que en las SE, con 1,01 y 0,81 g/cultivo, respectivamente (Fig. 44). De todo el material que constituía el cultivo en cada caso, una parte se correspondía con tejidos altamente oxidados, los cuales

no eran susceptibles de ser cultivados en el subcultivo siguiente. Esta oxidación fue significativamente superior en las líneas SE. Los resultados también corroboraron que las líneas SE y PEM diferían significativamente en el grado de diferenciación de las estructuras que las componían. Mientras en las líneas SE se contabilizaron numerosos ES con distinto grado de desarrollo, las líneas PEM se caracterizaron por una abundante presencia de callo, altamente proliferativo, y muy pocos ES.

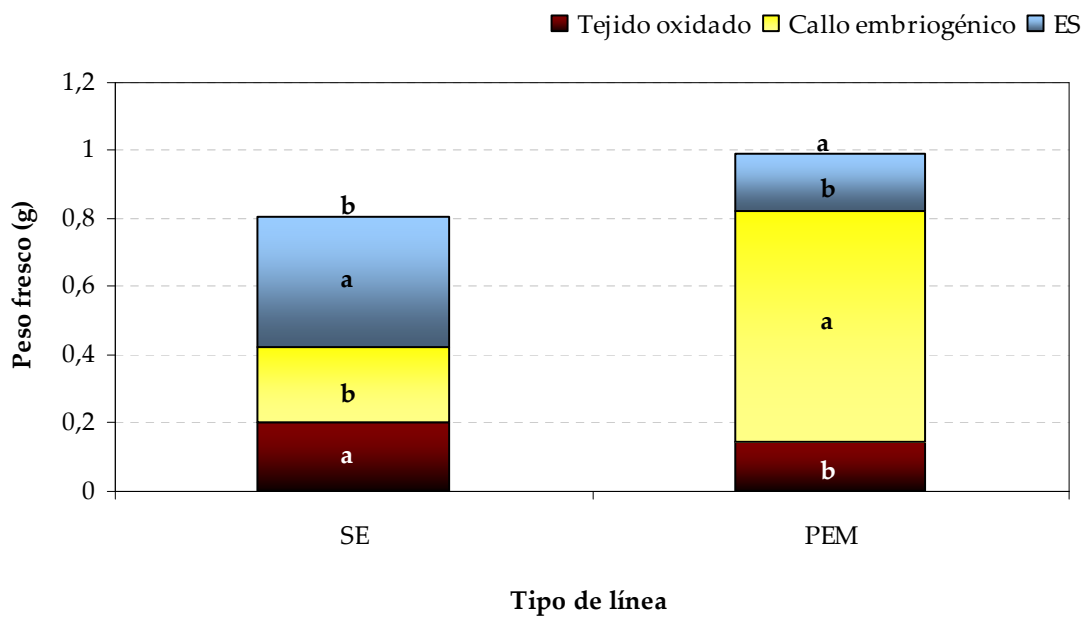


Figura 44. PF registrado en líneas SE y PEM al final de un ciclo de cultivo en medio de mantenimiento. Cada color representa un tipo de tejido específico: material oxidado, callo embriogénico y ES. Letras distintas indican diferencias significativas obtenidas mediante ANOVA al 5% al comparar el mismo tipo de tejido en ambos tipos de líneas.

En las líneas SE la frecuencia de aparición de los distintos tipos de ES fue inversamente proporcional al tamaño de los mismos. De este modo, los embriones de 1-2 mm fueron mucho más abundantes que los de 3-4 mm (Fig. 45). En las líneas tipo PEM, donde el número de ES en los diferentes estadios fue siempre menor que en las SE, no se observaron en ningún caso embriones mayores de 2 mm.

Monitorización fotográfica de la proliferación

La observación de la secuencia fotográfica correspondiente a las líneas SE y PEM puso de manifiesto la existencia de diferencias morfológicas entre ambas que se fueron haciendo más patentes conforme avanzaba el ciclo de cultivo en medio de mantenimiento

(Fig. 46) y que dan lugar a las características diferenciales observadas en el experimento anterior. En las líneas SE (Ah11 y Ah52) se observó una fuerte oxidación de los cultivos durante las dos primeras semanas. Sin embargo, este oscurecimiento no fue apreciable en las líneas PEM. En general, las líneas PEM eran más friables, con un color amarillo claro y las estructuras organizadas eran prácticamente inexistentes. En ellas, se producía una rápida proliferación del callo durante las primeras dos semanas y ningún cambio morfológico o diferenciación era apreciable. Por el contrario, en las líneas SE pudo observarse la aparición de embriones globulares a partir de la segunda o tercera semana de cultivo. Estos embriones provocaban un cambio en la morfología del cultivo, caracterizado por presentar mayor nivel de organización que el observado en las líneas tipo PEM.

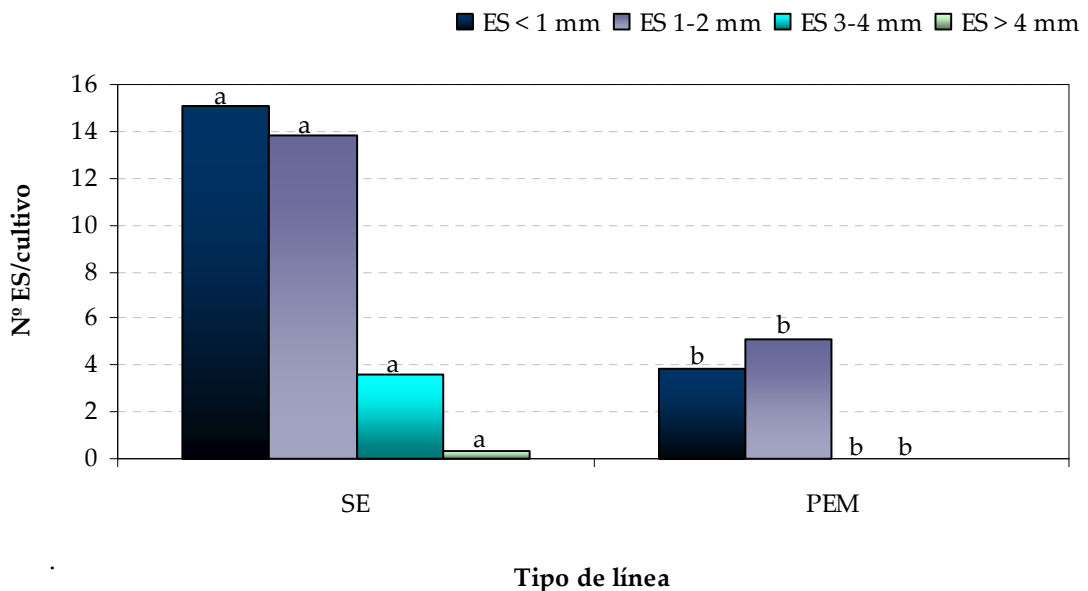


Figura 45. Número de ES de diferentes tamaños presentes en cada tipo de cultivo. Letras distintas indican diferencias significativas obtenidas mediante ANOVA al 5% al comparar cada tipo de ES en ambos tipos de líneas.

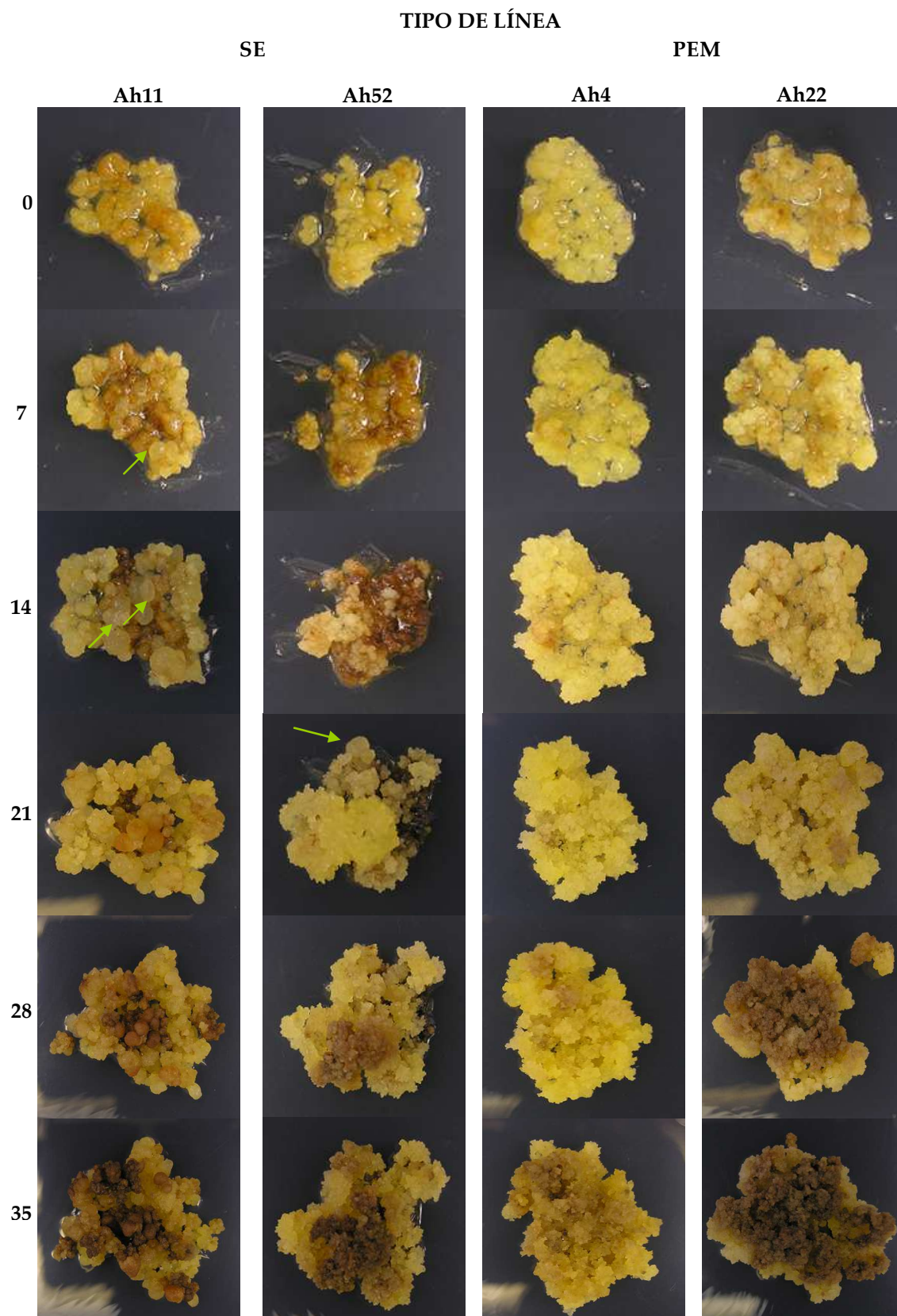


Figura 46. Seguimiento fotográfico de la evolución de las líneas SE y PEM a lo largo de un ciclo de mantenimiento de 35 días. Los números indican los días transcurridos desde el inicio del cultivo y las flechas señalan ES.

Curvas de crecimiento

A pesar de que la tasa de proliferación fue superior en las líneas PEM, las curvas de crecimiento fueron similares en ambos tipos de líneas (Fig. 47). En las curvas de PF y PS, la fase de latencia se prolongó durante los primeros 14 días en ambos tipos de cultivo. Sin embargo, en el caso del VCS, esta fase de adaptación se redujo a 7 días. A continuación, se observó la fase exponencial que también tuvo una extensión variable dependiendo del parámetro considerado. Así, en las curvas de PF y PS se extendió hasta los 35 días, no siendo evidente en estos casos la existencia de una fase estacionaria o de saturación. Dicha fase solo pudo apreciarse en la curva de VCS, y particularmente en las líneas tipo PEM.

El coeficiente de crecimiento también varió para cada uno de los parámetros dependiendo del tipo de línea (Tabla 6).

Tabla 6. Coeficientes de crecimiento obtenidos en líneas SE y PEM para los parámetros PF, PS y VCS. Los datos representan la media \pm error estándar.

Tipo de cultivo	Coeficiente de crecimiento		
	PF	PS	VCS
SE	3,7 \pm 0,04	5,3 \pm 0,00	4,1 \pm 0,08
PEM	6,9 \pm 0,05	8,9 \pm 0,00	7 \pm 0,09

La relación VCS/PS mostró diferencias debidas tanto al tipo de línea como al día del ciclo de cultivo (Tabla 7). En general, los valores obtenidos fueron ligeramente más elevados en los cultivos tipo PEM que en los SE. En ambos tipos de líneas este parámetro aumentó desde el inicio del cultivo hasta el día 14, en el que se alcanzaron los valores más elevados. A partir de ese momento, la ratio fue descendiendo obteniéndose los valores más bajos al final del ciclo de cultivo.

Tabla 7. Relación VCS/PS en líneas SE y PEM a lo largo de un ciclo de cultivo. Los datos representan la media \pm error estándar.

Tipo de cultivo	Ciclo de cultivo (días)					
	0	7	14	21	28	35
SE	0,026 \pm 0,006	0,029 \pm 0,006	0,030 \pm 0,003	0,025 \pm 0,002	0,018 \pm 0,002	0,017 \pm 0,001
PEM	0,035 \pm 0,006	0,029 \pm 0,006	0,033 \pm 0,004	0,028 \pm 0,003	0,024 \pm 0,001	0,020 \pm 0,001

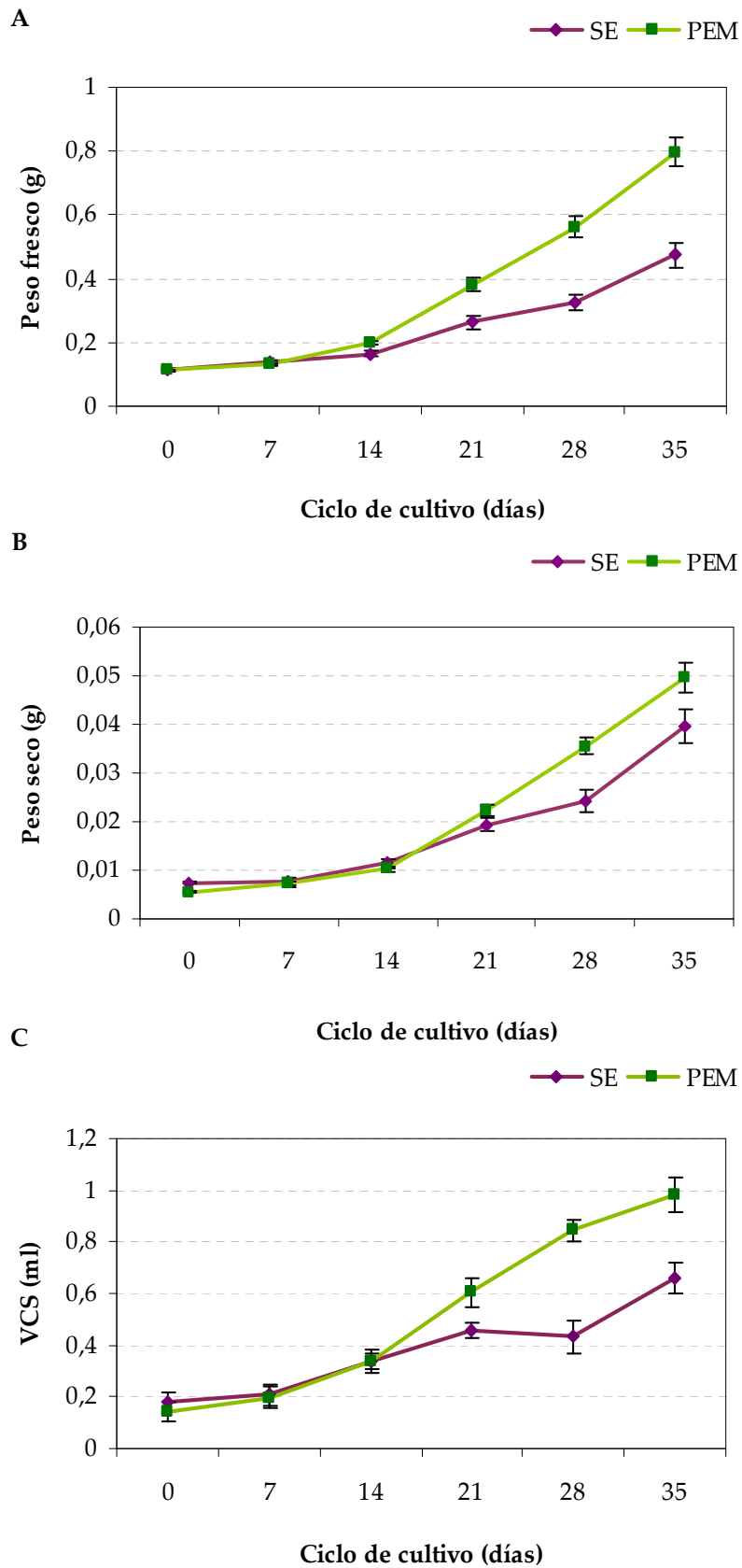


Figura 47. Curvas de crecimiento de líneas SE y PEM realizadas durante un ciclo de mantenimiento de 35 días en base al (A) PF, (B) PS y (C) VCS.

INFLUENCIA DE FACTORES ACONDICIONADORES SOBRE EL DESARROLLO DE EMBRIONES SOMÁTICOS BLANCO-OPACOS EN LÍNEAS SE Y PEM

Influencia del medio acondicionado añadido en la fase de suspensión

La utilización de MA a una concentración del 100% en el medio de suspensión tuvo un efecto perjudicial en la tasa de proliferación de las suspensiones de los dos tipos de líneas, que registraron un descenso significativo con respecto al control (Fig. 48). Sin embargo, el uso de MA al 50% no tuvo una influencia significativa en la tasa de proliferación de los cultivos.

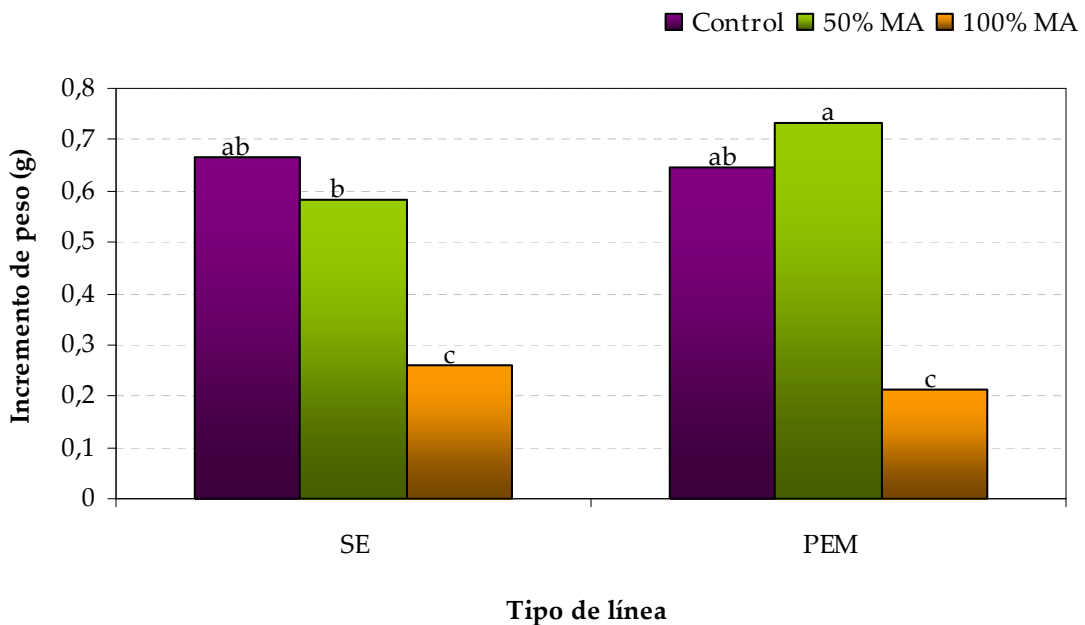


Figura 48. Efecto del MA añadido en la fase de suspensión sobre la proliferación de suspensiones embriogénicas iniciadas a partir de líneas SE y PEM. Letras distintas indican diferencias significativas obtenidas mediante ANOVA al 5%.

La utilización de MA en la fase de suspensión afectó de forma diferente al crecimiento en la fase de maduración dependiendo del tipo de cultivo. Mientras que en las líneas SE no se observó efecto alguno, en las líneas PEM tuvo lugar un descenso significativo de esta variable cuando fue utilizado al 100% (datos no mostrados).

En cuanto al efecto del MA en la fase de suspensión sobre la posterior capacidad de los cultivos para formar ESBO, la utilización de MA al 50% provocó en las líneas SE un aumento significativo en el número de ESBO formados por cultivo (Fig. 49). Cuando el MA fue empleado como medio de cultivo de las suspensiones embriogénicas (100% MA), los valores obtenidos fueron más bajos, aunque no significativamente distintos de los obtenidos

con el control. El uso del MA no tuvo un efecto significativo en el desarrollo de ESBO en las líneas PEM. Aunque su uso al 50% provocó un ligero aumento en la producción de este tipo de embriones, los valores obtenidos continuaron siendo muy bajos.

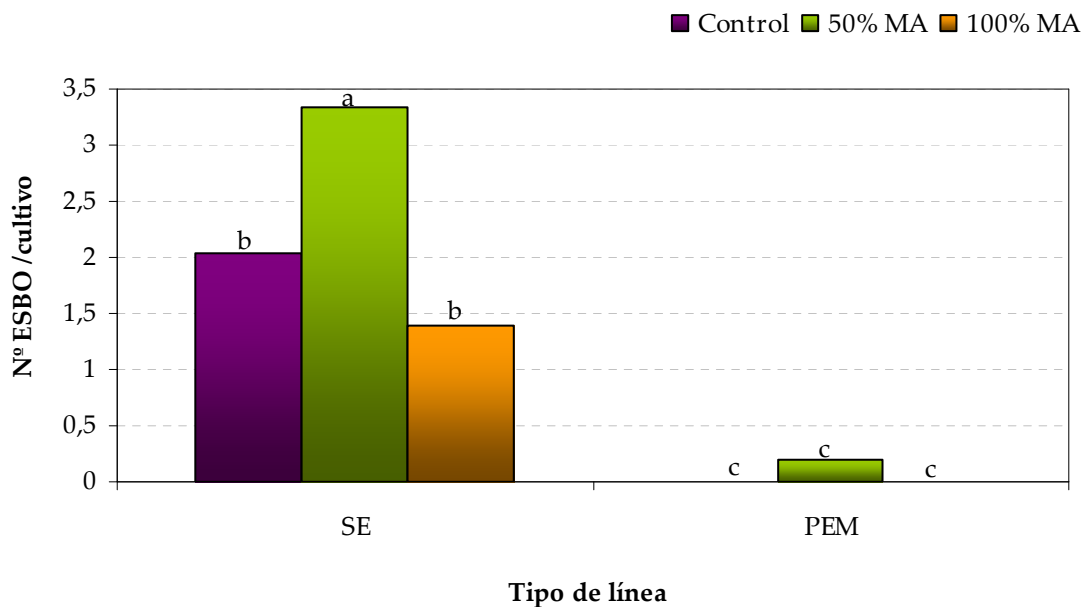


Figura 49. Efecto del MA añadido en la fase de suspensión sobre el posterior desarrollo de ESBO en líneas SE y PEM. Letras distintas indican diferencias significativas obtenidas mediante ANOVA al 5%.

La producción de ESBO ≥ 4 mm siguió la misma tendencia observada para ESBO totales (datos no mostrados).

Influencia del arabinogalactano añadido en la fase de suspensión

En este experimento, diferentes concentraciones de AG fueron añadidas al medio de cultivo líquido de las suspensiones embriogénicas.

La adición de AG no tuvo influencia ni en el crecimiento de las suspensiones ni en el posterior incremento de peso de los cultivos en la fase de maduración (datos no mostrados).

Sin embargo, la utilización de este compuesto provocó un descenso significativo en el número de ESBO formados por cultivo en las líneas SE (Fig. 50). De este modo, los resultados obtenidos en el tratamiento control fueron significativamente más elevados que los obtenidos tras añadir AG a cualquiera de las concentraciones testadas. El uso de AG en las líneas PEM, a pesar de no tener una influencia significativa, mostró la misma tendencia que en las líneas SE, provocando un descenso del número de ESBO formados.

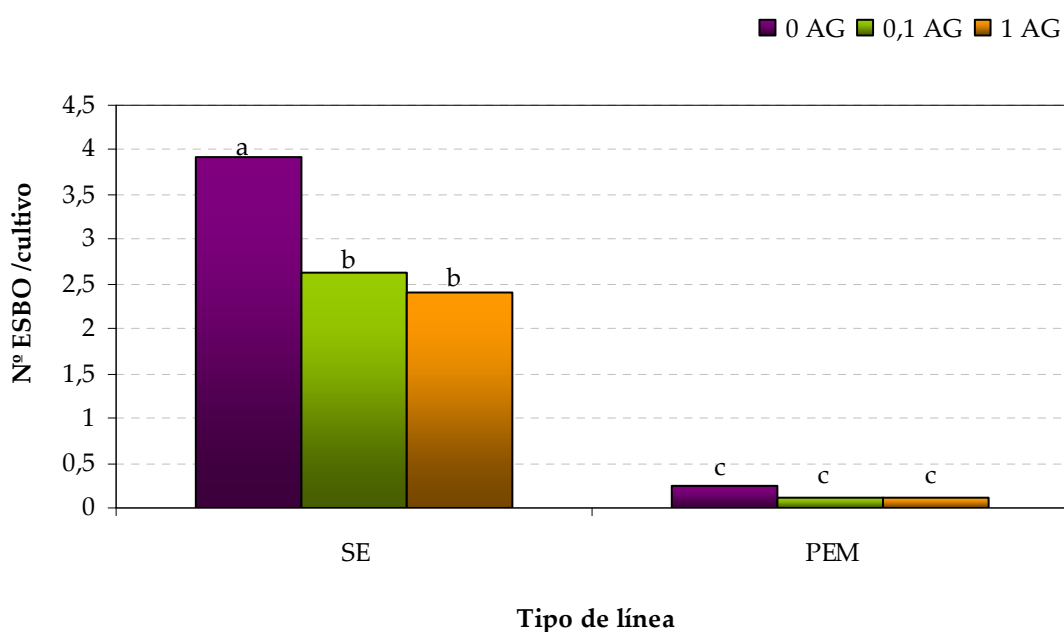


Figura 50. Efecto del AG añadido en la fase de suspensión sobre el posterior desarrollo de ESBO en líneas SE y PEM. Letras distintas indican diferencias significativas obtenidas mediante ANOVA al 5%.

Los resultados obtenidos para los ESBO ≥ 4 mm siguieron la tendencia observada en ESBO totales (datos no mostrados).

Influencia del arabinogalactano añadido en la fase de desarrollo

En este experimento, el AG fue añadido al medio B5m10a de desarrollo y maduración de ES.

En esta ocasión no se observó un efecto significativo del AG en ninguno de los parámetros evaluados, ni en las líneas SE ni en las líneas PEM (datos no mostrados). Así, la producción de ESBO mantuvo valores muy similares para el control y los distintos tratamientos con AG.

Influencia del reactivo de Yariv β -D-glucosil añadido en la fase de suspensión

En este experimento se estudió el efecto del reactivo β GlcY añadido al medio de cultivo de las suspensiones embriogénicas con el objetivo de comprobar si el efecto del MA observado anteriormente podía estar mediado por AGP.

El crecimiento de los cultivos en suspensión no se vio influenciado por ninguno de los reactivos de Yariv, β GlcY o α GalY, a las concentraciones testadas (datos no mostrados). Sin embargo, la adición de β GlcY a las suspensiones tuvo una influencia significativa en el

incremento de peso de los cultivos en la fase posterior de desarrollo de ES (Fig. 51). En las líneas SE, la adición de β GlcY a cualquiera de las concentraciones testadas, dio lugar a un descenso significativo de la proliferación de los cultivos. Este efecto fue específico de este reactivo ya que la adición de α GalY no provocó ningún cambio en el crecimiento de los mismos (Fig. 51), dando lugar a valores de incremento de peso similares a los obtenidos en el control y en 50% MA. En las líneas PEM se observó la misma tendencia pero en este caso las diferencias observadas fueron menos evidentes.

El desarrollo de ESBO, que tuvo lugar exclusivamente en las líneas SE, se vio influenciado por la adición del reactivo β GlcY al medio de cultivo de las suspensiones (Fig. 52). La tendencia fue la misma que para el incremento de peso, aunque en este caso las diferencias observadas solo fueron significativas para la concentración más elevada (25 μ M). De acuerdo con experiencias previas, la utilización de MA provocó un aumento en el desarrollo de ESBO con respecto al control, pero cuando el MA fue suplementado con el reactivo β GlcY, la producción de ESBO disminuyó notablemente. En el caso del reactivo α GalY también se observó una disminución en la producción de ESBO, aunque menos pronunciada.

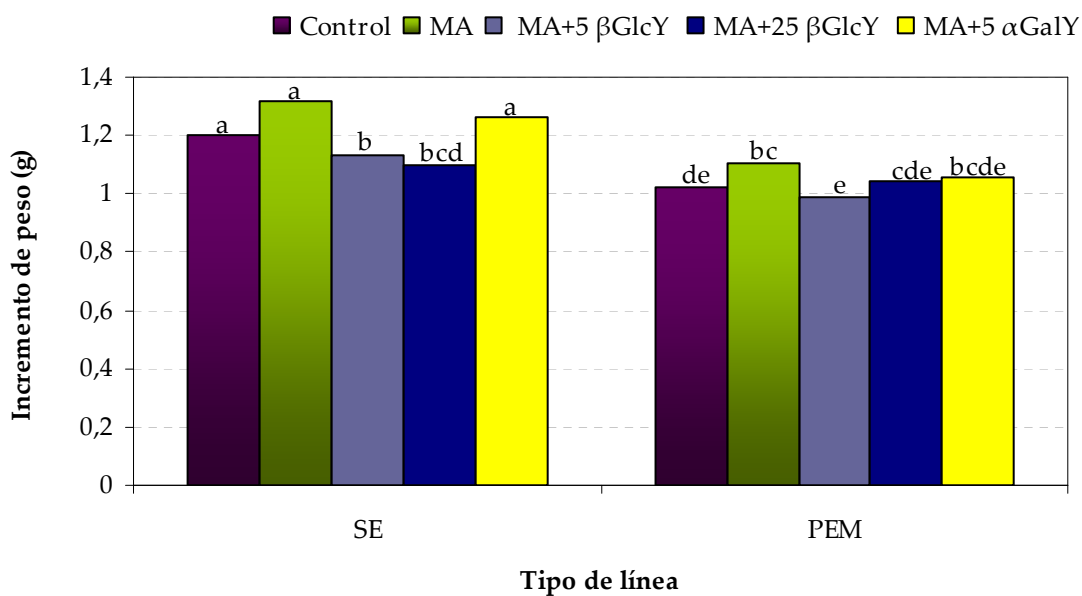


Figura 51. Efecto del MA y de los reactivos β GlcY y α GalY sobre la proliferación de líneas SE y PEM en la fase de maduración. Letras distintas indican diferencias significativas obtenidas mediante ANOVA al 5%.

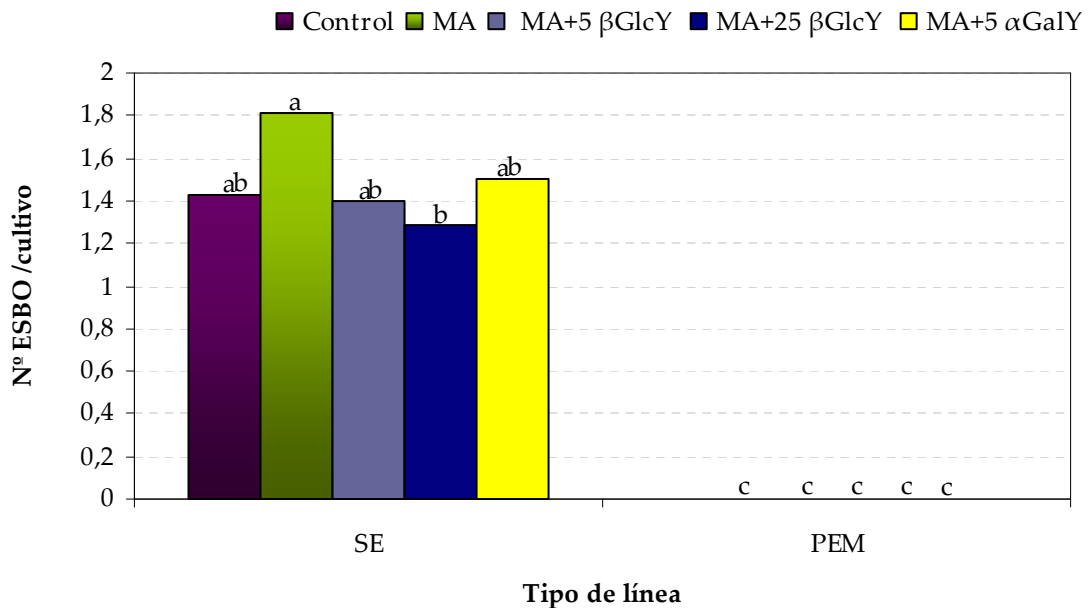


Figura 52. Efecto del MA y de los reactivos β GlcY y α GalY sobre el desarrollo de ESBO en líneas SE y PEM. Letras distintas indican diferencias significativas obtenidas mediante ANOVA al 5%.

ANÁLISIS PROTEÓMICO

El experimento 2D-DIGE combinado con PCA reveló que existían claras diferencias entre los proteomas de las líneas SE y PEM. Los componentes principales 1 (PC1) y 2 (PC2) explican el 39,7 y el 18,8% de las variaciones observadas, respectivamente (Fig. 53A). Mientras que el PC1 se asocia con la capacidad morfogénica, el PC2 se relaciona con las variaciones tanto biológicas como técnicas que existen entre las distintas líneas embriogénicas. Las proteínas representadas en azul indican que la diferencia de abundancia de las mismas entre los dos tipos celulares se ha comprobado estadísticamente (Fig. 53B).

Tras el análisis de los geles se observó que 710 proteínas presentaban mayor abundancia en las líneas con alta capacidad morfogénica (tipo SE), mientras que 775 proteínas fueron más abundantes en las líneas con baja capacidad morfogénica (tipo PEM). De estas proteínas, en 209 y 206, respectivamente, las diferencias en abundancia fueron confirmadas por ANOVA al 1% (Tabla 8).

Ochenta proteínas fueron identificadas mediante homología con secuencias peptídicas de otras especies. Del total de proteínas identificadas, 42 presentaban una abundancia significativamente diferencial en las distintas líneas. Estas proteínas se encuentran enumeradas en la tabla 9 y representadas en el gel de referencia (Fig. 54).

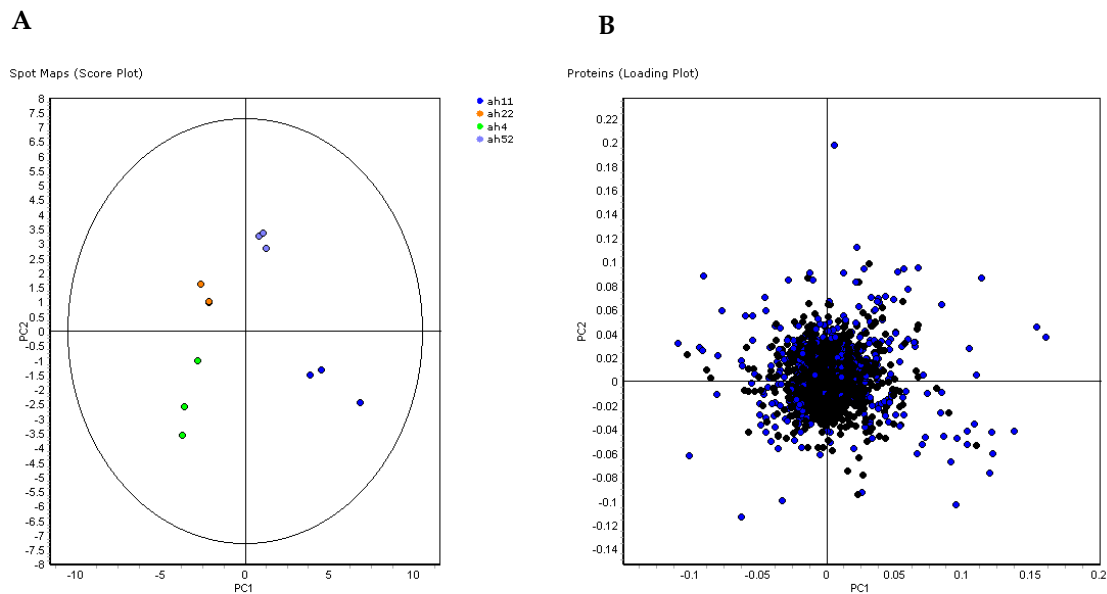


Figura 53. Representación del PCA realizado para el análisis proteómico de las líneas SE y PEM. (A) Score plot con la representación de las cuatro líneas embriogénicas con sus correspondientes réplicas y (B) loading plot representando gráficamente las proteínas detectadas e indicando en azul aquellas que presentaban una abundancia diferencial entre líneas.

Tabla 8. Esquema representativo con el número de proteínas detectadas en total y por tipo de cultivo (SE o PEM) así como el número de proteínas cuya diferencia en abundancia se corroboró estadísticamente mediante ANOVA.

	Confirmadas por ANOVA ($\alpha \leq 0,01$)	
Cantidad total de proteínas detectadas	1790	
Proteínas más abundantes en líneas SE	710	209
Proteínas más abundantes en líneas PEM	775	206

De las 42 proteínas identificadas en las 4 líneas embriogénicas se seleccionaron exclusivamente aquellas cuya abundancia fue significativamente diferencial en las 2 líneas pertenecientes a cada tipo de cultivo, SE o PEM. De este modo, se encontraron 9 proteínas cuya abundancia fue significativamente más elevada en las líneas SE (Ah11 y Ah52) y 3 proteínas que eran más abundantes en las líneas PEM (Ah4 y Ah22).

Tabla 9. Proteínas identificadas que presentaban una abundancia significativamente diferencial, según muestra el test de comparación múltiple, en alguna de las líneas embriogénicas de aguacate seleccionadas para el presente estudio. El color rosa indica las proteínas cuya abundancia fue significativamente más elevada en las líneas tipo SE y el color amarillo las proteínas cuya abundancia fue significativamente más elevada en las líneas tipo PEM.

Numero maestro	Descripción	ANOVA FDR	Test comparación múltiple			
			Ah11	Ah52	Ah22	Ah4
611	subunidad complejo adaptador de clatrina	0.0001	b	a	b	c
446	proteína TPR	0.0001	b	b	a	c
1198	fenilcumaran benzileter reductasa	0.0005	a	a	b	c
779	DEAD BOX RNA helicasa	0.0021	a	b	a	a
886	actina	0.0255	a	ab	ab	b
973	alcohol deshidrogenasa	0.0072	ab	b	a	b
951	alcohol deshidrogenasa	0.0141	a	a	ab	b
714	UDP-glucosa deshidrogenasa	0.0021	b	a	b	b
1099	malato deshidrogenasa	0.0013	b	b	a	a
1079	malato deshidrogenasa citosólica	0.0134	ab	a	a	b
872	isocitrato deshidrogenasa específica NADP	0.0438	ab	a	ab	b
569	3-fosfoglicerato deshidrogenasa	0.0014	a	a	b	b
1383	ascorbato peroxidasa	0.0061	a	a	ab	b
1545	manganeso superóxido dismutasa	0.0002	a	b	c	d
693	aldehído deshidrogenasa	0.0025	b	b	b	a
390	HSP70; isoforma 1 enlace ATP	0.0001	a	a	b	c
461	HSP70; mitocondrial	0.0016	a	a	b	b
1471	HSP70	0.0021	a	a	b	b
455	HSP70; mitocondrial	0.0099	a	a	ab	b
360	metionina sintasa	0.0004	ab	a	b	c
345	metionina sintasa	0.0008	b	b	a	a
350	metionina sintasa	0.0010	a	a	b	b
341	metionina sintasa	0.0014	a	ab	b	b
1464	glutacion-S-transferasa	0.0083	a	a	c	bc
820	S-adenosilmetionina sintetasa	0.0001	c	a	b	b
1050	adenosina quinasa	0.0000	c	b	b	a
1093	fructoquinasa	0.0023	a	a	b	b
1081	fructoquinasa	0.0088	bc	ab	c	c
965	fosfoglicerato quinasa	0.0005	b	a	a	b
684	UTP-glucosa-1-fosfato uridililtransferasa	0.0117	ab	a	ab	b
331	fosfolipasa D	0.0009	b	b	b	a
681	adenosilhomocisteinasa	0.0013	ab	a	c	bc
1404	pirofosfatasa inorgánica	0.0010	a	ab	b	c
453	H ⁺ -ATPasa vacuolar	0.0008	c	bc	a	ab
447	H ⁺ -ATPasa vacuolar	0.0067	b	b	a	b
561	piruvato descarboxilasa	0.0001	b	a	b	a
1257	glioxalasa I	0.0006	b	b	a	a
1133	glioxalasa I	0.0112	b	a	a	a
1390	triosafosfato isomerasa; cloroplasto	0.0013	b	b	b	a
507	fosfoglicerato mutasa independiente del 2,3-bifosfoglicerato	0.0022	a	b	b	b
501	fosfoglicerato mutasa independiente del 2,3-bifosfoglicerato	0.0034	b	a	a	a
1004	glutamina sintetasa citosólica	0.0143	a	b	ab	ab

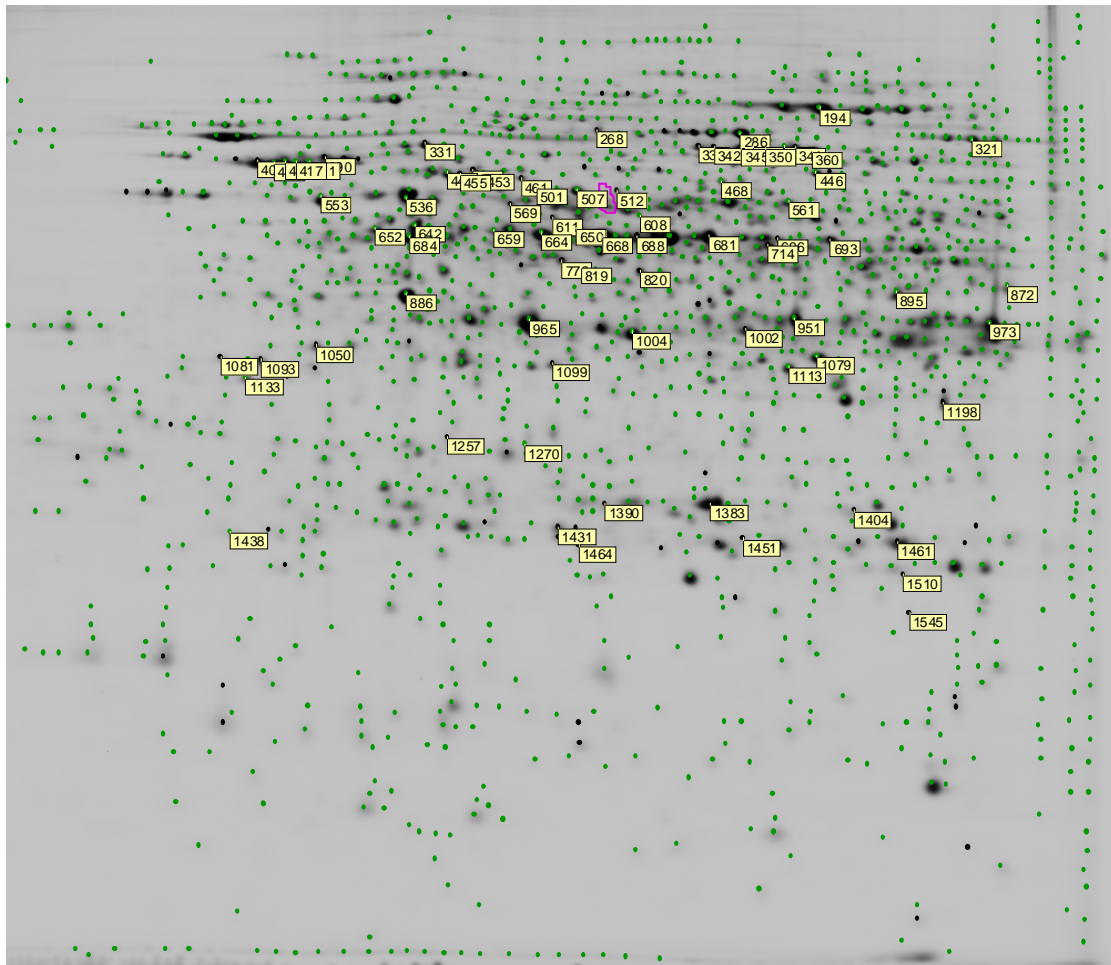


Figura 54. Gel de referencia con las proteínas identificadas en este estudio.

CUANTIFICACIÓN DE LOS NIVELES ENDÓGENOS DE ÁCIDO INDOLACÉTICO

Los niveles de IAA en el callo aislado de cultivos embriogénicos de las diferentes líneas SE y PEM se representan en la figura 55.

Las concentraciones de IAA presentaron diferencias significativas entre las distintas líneas embriogénicas analizadas. Los valores más elevados se obtuvieron en las líneas Ah11 y Ah 52, la línea Ah22 registró concentraciones de IAA endógeno intermedias y los valores más bajos se obtuvieron en la línea Ah4.

Cuando los niveles de IAA se analizaron de forma conjunta, estos eran significativamente más elevados en las líneas SE que en las PEM (datos no mostrados).

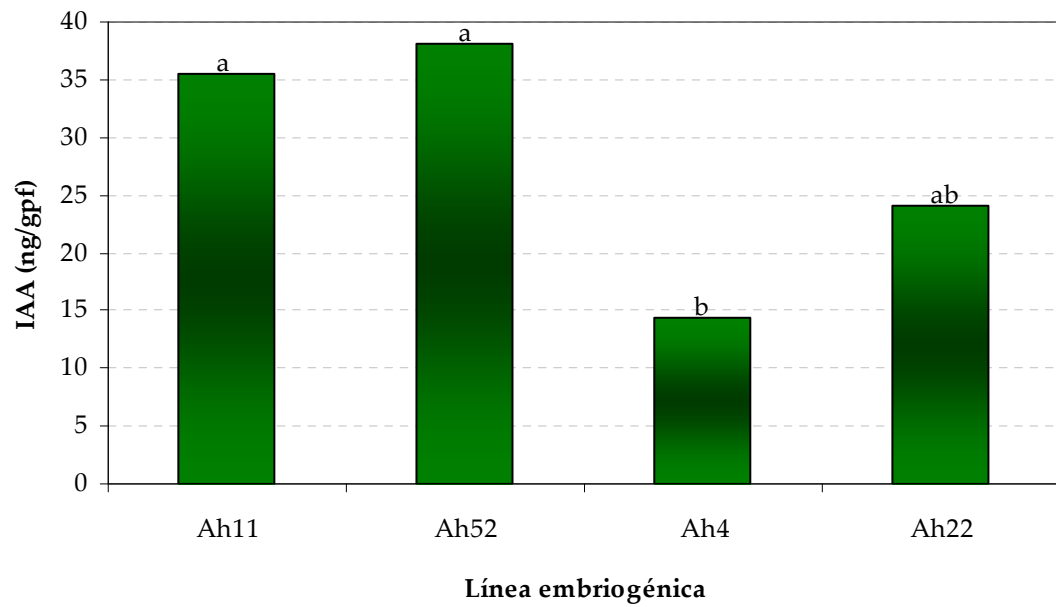


Figure 55. Concentración de IAA endógeno en callo de líneas SE (Ah11, Ah52) y PEM (Ah4, Ah22) de aguacate. Letras distintas indican diferencias significativas obtenidas mediante ANOVA al 5%.

DISCUSIÓN

CARACTERIZACIÓN DE CULTIVOS TIPO SE Y PEM

El estudio reveló que las líneas SE y PEM tienen diferentes tendencias a la hora de formar agregados celulares y que el número de estructuras embriogénicas presentes en cada tipo de cultivo fueron significativamente diferentes. Estos resultados corroboran las observaciones que a nivel morfológico realizaron Witjaksono and Litz (1999a) y que sirvieron de base para dividir los cultivos embriogénicos de aguacate en dos tipos. Posteriormente, Márquez-Martín et al. (en prensa) demostraron que los cultivos SE y PEM presentan distinta capacidad para dar lugar a ES maduros. Aunque esta capacidad morfogénica diferencial se había comprobado utilizando como material de partida PM, con los resultados obtenidos en el presente estudio se puede afirmar que dichas diferencias entre las líneas SE y PEM se mantienen cuando el material inicial utilizado es callo embriogénico.

Al igual que en aguacate, en otras especies tales como *Pinus caribea* (Laine y David 1990), *Picea abies* (Jalonen y von Arnold 1991) o *Carya illinoensis* (Burns y Wetzstein 1997) también se ha establecido una correlación entre la morfología de los cultivos y su capacidad morfogénica. Así, en cultivos embriogénicos de *Picea abies* las líneas tipo A, que son las únicas capaces de desarrollar ES maduros que posteriormente darán lugar a plantas, presentan en fase de proliferación ES con una morfología más compacta y organizada que los de las líneas tipo B (Jalonen y von Arnold 1991). En una línea embriogénica de *Pinus caribaea*, constituida por ES poco organizados, también se observó la incapacidad para formar plantas (Laine y David 1990).

De acuerdo con Jalonen y von Arnold (1991), las líneas tipo B de *Picea abies* podrían encontrarse bloqueadas en el desarrollo y, por lo tanto, no podrían avanzar a través de un proceso normal de maduración. Posteriormente, von Arnold et al. (2002) propusieron la importancia en la formación del ES de la transición PEM-ES, como paso regulador de la embriogénesis somática. Por un lado esta transición es el vínculo entre el estado proliferativo de las PEMs y el desarrollo organizado de los ES, pero al mismo tiempo mantiene estos dos procesos separados e independientes. El hecho de que algunas líneas embriogénicas sean incapaces de desarrollar ES maduros está estrechamente relacionado con una defectuosa o inexistente transición PEM-ES (von Arnold et al. 2002).

En cuanto a la tasa de proliferación, las líneas PEM mostraron mayor capacidad proliferativa que las SE, aunque en estas últimas se alcanzó un grado de diferenciación más

elevado. De acuerdo con estos resultados, en *Picea abies* se observó que era imprescindible un descenso en la tasa de crecimiento celular para que en los cultivos tuviera lugar la diferenciación (Jalonen y von Arnold 1991). Además, estos autores dividieron las líneas A en dos subtipos diferentes, A1 y A2. Mientras que las líneas A1 desarrollaron un gran número de ES maduros de características normales, las líneas A2 dieron lugar a pocos ES maduros, que además germinaban precozmente (Jalonen y von Arnold 1991). Estos dos tipos de líneas eran intercambiables entre sí, y este cambio parecía estar regulado por la tasa de crecimiento de las mismas. Así, cuando la tasa de crecimiento de una línea disminuía, se producían más ES del tipo A1 mientras que cuando se establecían suspensiones embriogénicas, caracterizadas por tasas de crecimiento más elevadas, los ES formados tendían a ser del tipo A2 (Jalonen y von Arnold 1991). Del mismo modo, George (1993) apuntó que el proceso de diferenciación solo puede ser inducido en células que se encuentran en una fase de crecimiento lento o estacionaria. No obstante, Egertsdotter y von Arnold (1993) encontraron que las líneas de *Picea abies* con mayor capacidad embriogénica crecieron de forma ligeramente más rápida que las líneas B. A pesar de esta diferencia, las curvas de crecimiento de ambas líneas fueron prácticamente idénticas, tal y como ocurre en los cultivos embriogénicos de aguacate. En un trabajo desarrollado en la misma especie para relacionar diferencias en morfología y hábitos de crecimiento con capacidad morfogénica, Find et al. (1998a) observaron una diferencia destacable en relación a las curvas de crecimiento de ambos tipos de líneas. Estos autores encontraron que las líneas A y B presentaban diferencias en la relación VCS/PS lo que demostraba una composición celular distinta. Esta ratio fue menor en las líneas A, lo que revelaba que estaban constituidas por una proporción elevada de células pequeñas pero densas. Resultados similares fueron obtenidos en aguacate por Márquez-Martín et al. (en prensa). El análisis histológico de cultivos tipo SE y PEM reveló diferencias en el patrón de proliferación de los mismos. Mientras que en los cultivos tipo SE el callo presentaba una distribución celular claramente diferenciada, con una alta proporción de células pequeñas en las regiones periféricas, en los cultivos tipo PEM no se apreciaron signos de organización celular y la mayoría de las células eran grandes y altamente vacuoladas. Otro estudio que coincide con nuestros resultados es el realizado en líneas embriogénicas de nuez por Burns y Wetzstein (1997). En este caso también se encontraron diferencias significativas respecto a la tasa de crecimiento, la composición celular y la capacidad embriogénica de las líneas. Las

líneas A, que presentaban una mayor capacidad morfogénica presentaron también tasas de crecimiento más elevadas (Burns y Wetzstein 1997).

En definitiva, la existencia de diferencias en la capacidad morfogénica entre líneas embriogénicas de una misma especie es un hecho común y que en algunos casos ha podido relacionarse con diferencias a nivel morfológico. Una característica observada en la mayoría de los trabajos, y que también se da en aguacate, es la existencia de una morfología más compacta y organizada en los cultivos con mayor capacidad embriogénica. Sin embargo, no ha podido establecerse una relación clara entre la tasa de crecimiento de los cultivos y su capacidad para dar lugar a ES maduros.

INFLUENCIA DE FACTORES ACONDICIONADORES SOBRE EL DESARROLLO DE EMBRIONES SOMÁTICOS BLANCO-OPACOS EN LÍNEAS SE Y PEM

Como se ha indicado anteriormente, existe una gran variedad de compuestos que son secretados al medio de cultivo y que estimulan la proliferación celular y el desarrollo del ES en distintos sistemas de cultivo *in vitro* (Massonneau et al. 2005). Una de las prácticas más habituales para conseguir dicha estimulación es la utilización de MA. En *Vitis vinifera*, el MA provocó un aumento de la proliferación celular que posteriormente fue atribuido a sustancias de naturaleza proteica (Mães et al. 1997). En aguacate, sin embargo, la utilización de MA procedente de líneas altamente morfogénicas no tuvo un efecto positivo en la proliferación de los cultivos. De hecho, cuando se utilizó exclusivamente MA como medio de cultivo (100% MA) se observó un descenso drástico de la proliferación celular, tanto en las líneas SE como en las PEM. Las posibles razones de este descenso podrían ser una falta de nutrientes en el medio, agotado durante el cultivo previo para obtener el MA, o una excesiva acumulación de sustancias inhibitoras. El efecto de estos compuestos es dependiente de la concentración a la que se encuentren y es el balance entre sustancias inhibitoras y estimuladoras el que determinará el efecto global, positivo o negativo, en cada sistema embriogénico.

Sin embargo, la utilización de MA aumentó de forma significativa el posterior desarrollo de ES maduros en las líneas SE. Las proteínas excretadas al medio de cultivo que favorecen el acondicionamiento del mismo fueron caracterizadas por Ben Amar et al. (2007) como genóticamente independientes. Estos autores comprobaron que el MA obtenido a partir de suspensiones de calabacín era capaz de estimular la proliferación celular en suspensiones de uva. En nuestro caso, el MA obtenido de líneas embriogénicas tipo SE solo

fue capaz de aumentar la capacidad morfogénica en este tipo de líneas, pero no tuvo ningún efecto en las líneas PEM. El hecho de que las líneas PEM no respondan al estímulo del MA podría deberse a que en este sistema embriogénico la respuesta sea dependiente del genotipo, de manera que para inducir algún efecto en las líneas PEM el MA debería haber sido obtenido a partir de este tipo de cultivos. No obstante, también es posible que las líneas PEM no sean capaces de responder al MA o que presenten requerimientos distintos.

Entre los factores segregados al medio de cultivo se encuentran las AGP, que juegan un papel regulador en la embriogénesis somática de diversas especies (Samaj et al. 2008). En la mayoría de ellas se ha demostrado un papel estimulador de estos compuestos y su uso se ha extendido para aumentar el rendimiento del proceso (Tang et al. 2006). Con el objetivo de aumentar la capacidad morfogénica de las distintas líneas de aguacate, se añadió AG de madera de alerce en los medios de cultivo en dos etapas distintas, la de suspensiones embriogénicas y la de desarrollo de ES. En ninguno de los dos casos tuvo efectos positivos. Sin embargo, su influencia varió dependiendo de la fase en la que fue aplicado. El uso de AG durante la fase de suspensión hizo que disminuyese el posterior desarrollo de ESBO en las líneas SE, siendo este descenso proporcional a la concentración de AG utilizada. Sin embargo, cuando el AG fue suministrado en el medio de maduración, no se observó ningún efecto. Estos resultados podrían indicar que el efecto beneficioso obtenido por el MA no se debe a la presencia de AG en el mismo o no al AG suministrado en el experimento siguiente. La variabilidad de las AGP es un hecho comprobado y, de hecho, se ha descrito que varios tipos distintos pueden estar involucrados en la regulación de la embriogénesis, cada uno de ellos jugando un papel aislado y/o en colaboración con el resto de AGP (Tang et al. 2006). De hecho, Toonen et al. (1997) demostraron en zanahoria que diferentes clases de AGP eran capaces de incrementar o disminuir el potencial embriogénico de las suspensiones. Por consiguiente, para llevar a cabo una manipulación precisa de la embriogénesis somática mediante AGP es imprescindible determinar previamente los efectos estimuladores o inhibidores de dichas sustancias (Yang y Zhang 2010).

La adición del reactivo β GlcY a las suspensiones embriogénicas de aguacate disminuyó significativamente la proliferación de los cultivos durante la fase de desarrollo y maduración de ES. Ben Amar et al. (2007) también observaron en vid una drástica inhibición de la proliferación de las suspensiones embriogénicas cuando suplementaron el medio de cultivo con este reactivo. Teniendo en cuenta que el β GlcY provoca una inhibición

específica de las AGP (Guan y Nothnagel 2004), la disminución de la proliferación observada en presencia de este reactivo podría ser atribuida, tal y como proponen Ben Amar et al. (2007), a una perturbación de las mismas, poniendo así de manifiesto la participación en el proceso de este tipo de proteínas.

En la producción de ESBO se observó la misma tendencia. Sin embargo, en este caso, el descenso provocado por el reactivo β GlcY solo fue significativo cuando se utilizó a una concentración de 25 μ M. Aunque la función biológica de las AGP no ha sido identificada de forma precisa, existen diferentes evidencias acerca de su papel como reguladoras en el desarrollo del ES (Egertsdotter y von Arnold 1995; Kreuger y van Holst 1993). El bloqueo en la embriogénesis somática tras la adición de β GlcY ha sido descrito por varios autores (Saare-Surminski et al. 2000; Tang et al. 2006; Thomson y Knox 1998) y en zanahoria ha sido atribuido a una restricción de la división celular (Thomson y Knox 1998).

ANÁLISIS PROTEÓMICO

El análisis proteómico reveló la existencia de proteínas que se encontraban en mayor abundancia en las líneas SE y otras más abundantes en las líneas PEM. De esta forma, se puede establecer un patrón de proteínas diferencial para cada uno de los tipos de cultivo que se obtienen en aguacate.

La comparación proteómica de cultivos embriogénicos distintos en base a su capacidad morfogénica también se ha realizado en otras especies como *Medicago truncatula* (Imin et al. 2005), donde se comparó una línea denominada Jemalong con otra mutante, 2HA, cuya capacidad regenerativa era significativamente superior. Ambas líneas presentaban el mismo aspecto morfológico durante los primeros estadios del proceso de embriogénesis somática; sin embargo, se encontraron 54 proteínas que presentaban una abundancia significativamente distinta. No obstante, solo 16 proteínas fueron finalmente identificadas (Imin et al. 2005).

Proteínas más abundantes en las líneas SE

Fenilcumaran benzileter reductasa

La fenilcumaran benzileter reductasa (PCBER) forma parte de una familia proteica cuyos miembros más importantes son las isoflavona reductasas (Ganj et al. 1999), enzimas relacionadas con la biosíntesis de compuestos derivados de los fenilpropanoides, como la lignina. La PCBER también ha sido identificada como una de las proteínas sobreexpresadas

ante estrés de tipo abiótico (Nam et al. 2003; Vander-Mijnsbrugge et al. 2000). Vander-Mijnsbrugge et al. (2000) relacionaron la presencia de esta enzima con una protección frente al estrés oxidativo y a las ROS generadas en los procesos de lignificación. En *Picea glauca*, esta proteína ha sido identificada como una de las que cambia su expresión durante el desarrollo de la embriogénesis somática (Lippert et al. 2005), siendo relativamente abundante al inicio del proceso y disminuyendo su expresión conforme avanza el desarrollo del ES. En *Vitis vinifera* se encontraron tres puntos proteicos identificados como isoflavona reductasas (Zhang et al. 2009). Estas proteínas aparecían de forma exclusiva en el callo embriogénico y se ha comprobado que su sobreexpresión podía ser inducida por radiación ultravioleta o estrés oxidativo (Babiychuk et al. 1995). Relacionadas con estas proteínas se encuentran enzimas implicadas en la biosíntesis de flavonoides, encontradas de forma diferencial en cultivos embriogénicos de *Vitis* (Marsoni et al. 2008) y *Medicago* (Imin et al. 2005) o la peroxidasa tipo I, involucrada en la síntesis de neolignan durante la embriogénesis somática de espárrago (Takeda et al. 2003). El papel de estas enzimas en la embriogénesis somática podría estar relacionado con el hecho de que los neolignan han demostrado tener una actividad similar a las citoquininas, promoviendo la división celular en callo de tabaco (Teutonico et al. 1991).

Proteína de choque térmico 70

Las HSP70 ejercen la función de minimizar la agregación de proteínas sintetizadas *de novo* y facilitar el plegamiento de las mismas (Fink 1999).

Esta familia proteica es una de las detectadas con mayor frecuencia en cultivos embriogénicos. Miembros de la familia de las HSP se han encontrado sobreexpresados durante el inicio de la embriogénesis somática a partir de células somáticas, microesporas o polen en alfalfa y tabaco, y en hipocótilos de zanahoria (Györgyey et al. 1991; Kitamyra et al. 2000; Zarsky et al. 1995).

En dos estudios realizados en *Vitis vinifera* (Marsoni et al. 2008; Zhang et al. 2009) se ha señalado la utilización de estas proteínas como marcadoras de la capacidad embriogénica ya que sus niveles eran más elevados en callos embriogénicos que en no embriogénicos. Este incremento en cultivos embriogénicos se relacionó con una mayor habilidad de estos cultivos para controlar el estrés oxidativo, mediante la regulación del sistema de ROS y la preservación de la estructura proteica a través de las HSP (Marsoni et al. 2008).

Estas chaperonas también fueron detectadas en *Medicago* (Imin et al. 2005), tanto en una línea embriogénica como en otra no embriogénica. Sin embargo, su expresión disminuyó notablemente tras ocho semanas de cultivo, indicando que puede ser necesaria una mayor cantidad para mantener los cultivos en los primeros estadios de desarrollo. Estos resultados coinciden con los obtenidos en *Picea glauca*, donde la expresión de HSP70 en ES maduros fue inexistente (Lippert et al. 2005). El estrés atribuido al cultivo *in vitro* parece ser el responsable de que las HSP se encontraran de forma más abundante en ES que en ZE de *Cyclamen persicum* (Winkelmann et al. 2006).

Glutación-S-transferasa

Las GST son uno de los grupos de proteínas más comunes y universales y catalizan la transformación de diversos tipos de sustratos en glutación. Se les atribuye un papel importante en la respuesta a distintos tipos de estrés como el oxidativo, el causado por patógenos o el debido a metales pesados (Kathleen 1996). Se activan y expresan independientemente del sistema de embriogénesis somática empleado (Lin et al. 2009).

En un estudio proteómico realizado en *Citrus sinensis* (Pan et al. 2009) se encontraron tres isoformas de GST. El patrón de expresión de cada una de estas proteínas cambió de forma diferente durante el desarrollo de la embriogénesis somática. De este modo, una de las isoformas disminuyó gradualmente a lo largo del proceso, la segunda aumentó su abundancia durante los últimos estadios y la tercera mostró un descenso transitorio en las primeras semanas volviendo finalmente a los niveles iniciales. En este sistema de embriogénesis somática, a estas GST se les atribuyó un papel en la regulación de los estados redox, crítica para mantener un estado de diferenciación celular (Phyllis 2007). También se propuso su participación como protectoras frente a la toxicidad observada en cultivos mantenidos *in vitro* durante largos periodos de tiempo (Pan et al. 2009).

En contraposición a la existencia de una relación directa entre el estrés oxidativo y la inducción de embriogénesis somática propuesta por Feher et al. (2003), en cultivos embriogénicos de cebada se aisló un gen de GST que se sobreexpresaba en condiciones de estrés, pero sin que estén conllevadas a una mayor formación de ES, sugiriendo que el papel de las GST es de defensa general frente al estrés (Maraschin et al. 2005). De hecho, no se puede asegurar si las GST juegan un papel de protección específica durante el cultivo *in vitro* o si su función está relacionada con un desarrollo embrionario adecuado (Joosen et al. 2007).

Es importante destacar que los miembros de la familia génica de las GST se encuentran sobreexpresados durante la inducción de la embriogénesis somática mediada por auxina (Galland et al. 2001; Thibaud-Nissen et al. 2003). De hecho, en trigo se les ha atribuido un papel importante en la regulación de los genes expresados en respuesta a auxina (Singla et al. 2007) y en la detoxificación de cantidades excesivas de esta hormona (Guilfoyle 1999).

Además de su presencia asociada al estrés oxidativo, es destacable la utilización de las GST como marcador de la transición entre PEMs y ES ya que su expresión fue cambiando a lo largo del proceso de embriogénesis somática en cultivos de diferentes especies tales como soja (Thibaud-Nissen et al. 2003), cebada (Vrinten et al. 1999), achicoria (Galland et al. 2001), *Brassica napus* (Joosen et al. 2007; Malik et al. 2007) y palmera (Low et al. 2008).

Manganeso superóxido dismutasa

La familia enzimática de las superóxido dismutasas (SOD) tiene como función principal catalizar la descomposición del anión superóxido proporcionando defensa frente al estrés oxidativo (Bowler et al. 1992; Slooten et al. 1995).

Las SOD se han detectado, y con gran abundancia, en varios sistemas *in vitro* como *Cyclamen persicum* (Winkelmann et al. 2006), *Quercus suber* (Gómez et al. 2009) o *Vitis vinifera* (Zhang et al. 2009). En *Cyclamen persicum*, las SOD fueron muy abundantes tanto en ES como en ZE (Winkelmann et al. 2006), pero en *Quercus* su abundancia fue mucho mayor en ES que en embriones gaméticos (Gómez et al. 2009). De acuerdo con Zhang et al. (2009), una respuesta adaptativa frente al estrés oxidativo es la causa de la mayor abundancia de dos SOD en cultivos embriogénicos de *Vitis*.

Fructoquinasa

Las fructoquinasas son enzimas responsables de la fosforilación de la fructosa (Renz y Stitt 1993) y por lo tanto juegan un papel imprescindible en el metabolismo de este compuesto, que podrá ser utilizado como sustrato de la respiración o para la biosíntesis de almidón. De hecho, varios estudios sugieren para la fructoquinasa un papel regulador en la síntesis de almidón (Odanaka et al. 2002; Zhang et al. 2003).

Esta enzima también ha sido identificada en cultivos embriogénicos de *Citrus sinensis*, donde se comprobó que su abundancia era mayor durante las primeras fases del proceso

embriogénico y que además era una de las proteínas inducidas por la acción del 2,4-D (Pan et al. 2009). La fructoquinasa también ha sido encontrada en el mapa proteómico de cultivos embriogénicos de *Medicago truncatula* (Imin et al. 2004).

3-fosfoglicerato deshidrogenasa

La enzima 3-fosfoglicerato deshidrogenasa (PGDH) cataliza uno de los primeros pasos en la biosíntesis de serina, convirtiendo el ácido fosfoglicérico en ácido hidroxipirúvico fosfato, utilizando NAD⁺ como coenzima (Walsh y Sallach 1966).

La síntesis de serina es imprescindible para desarrollar numerosas funciones celulares: participa en la biosíntesis de purinas y pirimidinas y desempeña un papel importante en la función catalítica de muchas enzimas.

Es la primera vez que en cultivos embriogénicos esta proteína se relaciona con una mayor capacidad morfológica.

Metionina sintetasa

La metionina sintetasa es una enzima que cataliza la transferencia de un grupo metilo del 5-metiltetrahidrofolato a la homocisteína, para dar lugar a la síntesis de metionina, a partir de la cual se producen el etileno y las poliaminas (Xu et al. 2010).

Cambios en la abundancia de esta enzima tras la exposición de hojas de grama a estrés salino, se relacionaron con cambios en el metabolismo de los aminoácidos y en la síntesis de otros metabolitos derivados de los mismos (Xu et al. 2010). En dicho estudio se planteó que una mayor acumulación de esta enzima podría conllevar a un incremento en la síntesis de poliaminas. Este aumento en los niveles de poliaminas ante situaciones de estrés ambiental ya fue previamente observado en otras especies (Flores et al. 1989). Además, entre las principales funciones de estas sustancias destacan la regulación de la replicación del ADN y la división celular o el control de la senescencia y la morfogénesis (Evans y Malmberg 1989; Galston y Sawhney 1990). La cantidad y distribución de las poliaminas en los tejidos embriogénicos de semillas de maíz se relacionaron con una reactivación de la división celular previa a la germinación (Sepúlveda y Sánchez de Jimenez 1988). Del mismo modo, en un estudio más reciente, se detectó un rápido incremento en los niveles de metionina sintetasa con el inicio de la germinación en semillas de *Arabidopsis* (Gallardo et al. 2002).

La metionina sintetizada gracias a la acción de la metionina sintetasa tiene funciones fundamentales en el crecimiento celular de las plantas (Huang et al. 2006). La disminución en los niveles de esta enzima ante situaciones de estrés por encharcamiento, en especies como la soja o el trigo, parece indicar que existe un mecanismo de defensa mediante el cual las plantas reducen el gasto energético deteniendo su elongación y crecimiento (Kong et al. 2010).

Proteínas más abundantes en las líneas PEM

Malato deshidrogenasa

Las malato deshidrogenasas son enzimas que catalizan la oxidación de malato a oxalacetato utilizando NAD^+ que pasa a NADH.

La malato deshidrogenasa se ha relacionado con el desarrollo embrionario, mostrando altos niveles de expresión en las etapas más tempranas y disminuyendo con rapidez conforme avanza el desarrollo del embrión (Lippert et al. 2005).

En *Quercus suber* también ha sido considerada como marcadora del estado de desarrollo embrionario, a pesar de encontrar niveles diferentes de expresión en ES y gaméticos que morfológicamente se encontraban en estadios similares (Gómez et al. 2009).

Glioxalasa I

La glioxalasa I es una enzima que cataliza el primer paso en el sistema de detoxificación del metilglioxal, compuesto que se produce de forma espontánea a partir de intermediarios glicolíticos o fotosintéticos (Richard 1993). La alta toxicidad del metilglioxal radica en su capacidad para detener el crecimiento y reaccionar con el ADN, el ARN y las proteínas (Kalapos 1999).

Todavía no existe una relación causal totalmente comprobada entre la actividad de la glioxalasa y una rápida proliferación celular (Jain et al. 2002); sin embargo, varios estudios han propuesto la posibilidad de utilizar esta enzima como marcador del crecimiento y división celular (Ghosh et al. 1999; Paulus et al. 1993). Además, el efecto antagonista entre el metilglioxal y la glioxalasa ha sido confirmado en la diferenciación de callo en plántulas de patata y zanahoria (Roy et al. 2004).

Metionina sintetasa

Además de la metionina sintetasa que presentaba una mayor abundancia en cultivos SE (punto 350), otro punto (345), significativamente más abundante en cultivos tipo PEM, también fue identificado como esta enzima. Esto pone de manifiesto la existencia en aguacate de dos isoformas de esta proteína con una abundancia diferencial dependiendo del tipo de línea embriogénica.

Una de las principales diferencias encontradas en el presente trabajo, es una mayor abundancia de proteínas relacionadas con la respuesta al estrés en los cultivos SE. A pesar de que los dos tipos de líneas embriogénicas habían sido mantenidas en las mismas condiciones de cultivo *in vitro*, las líneas SE parecen ser más sensibles al estrés que estas provocan, presentando niveles significativamente más altos de las proteínas HSP, GST y SOD. De acuerdo con Lichtenthaler (1998), la respuesta fisiológica frente a condiciones de estrés depende de dos factores principales: el estado fisiológico de las células y el grado de estrés al que sean sometidas. Dado que el nivel de estrés se supone igual para ambos tipos de líneas, ambas líneas podrían presentar un estado fisiológico distinto.

Tanto las GST como las SOD son enzimas especialmente involucradas en el estrés oxidativo. Este tipo de estrés está muy documentado en el cultivo *in vitro* de especies vegetales (Cassells y Curry 2001) y se ha demostrado que mejora el proceso de embriogénesis somática, tanto induciendo una mayor división celular (Marsoni et al. 2008), como estimulando la diferenciación y formación de ES (Pan et al. 2009). En este sentido, se ha descrito que las ROS producidas en este tipo de estrés actúan como segundos mensajeros en sistemas embriogénicos inducidos por auxina o estrés (Maraschin et al. 2005; Nagata et al. 1994). Sin embargo, para un buen funcionamiento celular es imprescindible mantener un balance apropiado entre los sistemas de oxidación y de antioxidación (Mittler 2002; Shualey y Oliver 2006). De acuerdo con esto, las líneas SE podrían presentar el estado redox adecuado debido a la existencia de un equilibrio entre el estrés oxidativo y la acumulación de sustancias antioxidantes. Las líneas PEM, sin embargo, parecen no percibir que la situación sea estresante y, por lo tanto, no desarrollan una respuesta antioxidante.

Diferencias en el estrés oxidativo entre ambas líneas ya habían sido evidentes durante el cultivo *in vitro* de las mismas. Así, durante los primeros días de cultivo en medio sólido las líneas SE se oscurecían visiblemente observándose también un oscurecimiento del medio de cultivo cuando se establecían suspensiones embriogénicas a partir de las mismas.

Por el contrario, las líneas PEM se caracterizan por presentar un color amarillo más claro y el medio de cultivo de sus suspensiones embriogénicas se mantiene transparente (Márquez-Martín et al. en prensa). En *Medicago truncatula* se detectaron un gran número de proteínas relacionadas con el estrés y asociadas a la embriogénesis somática (Imin et al. 2004), comprobándose posteriormente, tal y como ocurre en aguacate, que una gran parte de ellas se encontraban expresadas diferencialmente en líneas con distinta capacidad morfológica (Imin et al. 2005).

En el presente estudio también se han identificado proteínas metabólicas que presentan una abundancia diferencial dependiendo del tipo de cultivo. En cultivos embriogénicos es frecuente encontrar un gran número de enzimas metabólicas. Esto corrobora que la adquisición de competencia embriogénica debe ir acompañada de una serie de cambios a nivel metabólico (Feher et al. 2003). En *Brassica napus*, muchas proteínas implicadas en la glicólisis fueron detectadas en los primeros estadios de la formación de embriones derivados de microesporas, siendo las responsables de aportar la energía necesaria para el crecimiento rápido que se necesita en las primeras fases del proceso (Joosen et al. 2007).

En cultivos embriogénicos de aguacate, la enzima fructoquinasa es significativamente más abundante en cultivos SE que en PEM, mientras que en estos últimos, es la malato deshidrogenasa la que presenta una mayor abundancia. Los cultivos tipo PEM han demostrado presentar una tasa de proliferación mayor que los SE y por lo tanto requerirán un mayor aporte energético. La mayor abundancia de malato deshidrogenasa en los mismos podría indicar que una gran cantidad de la energía que necesitan podría ser conseguida incrementando la actividad del ciclo de Krebs, en el cual participa esta enzima.

A pesar de haber llevado a cabo el estudio proteómico con material que desde un punto de vista morfológico se encontraba en un estadio similar de desarrollo, los niveles de malato deshidrogenasa y glioxalasa I parecen revelar que el callo embriogénico de las líneas PEM se encuentra en un estadio más temprano.

Finalmente, resulta interesante la presencia de dos isoformas de metionina sintetasa con una abundancia diferencial en ambos tipos de línea. La existencia de varios puntos identificados como la misma proteína puede ser consecuencia de la existencia de isoformas distintas derivadas de diferentes genes pertenecientes a la misma familia multigénica (Xu et al. 2010). Los resultados obtenidos podrían poner de manifiesto, por tanto, la existencia de

diferentes genes de metionina sintetasa expresados de forma diferencial dependiendo del tipo de cultivo.

La realización de este tipo de estudios parece revelar que una diferente capacidad morfológica puede ser relacionada con la expresión de un determinado tipo de proteínas, al menos dentro de una misma especie.

CUANTIFICACIÓN DE LOS NIVELES ENDÓGENOS DE ÁCIDO INDOLACÉTICO

Con el objetivo de caracterizar desde un punto de vista hormonal los dos tipos de cultivos embriogénicos que se diferencian en aguacate, en el presente trabajo se cuantificaron los niveles endógenos de IAA.

Las auxinas se consideran las hormonas más importantes en la regulación de la embriogénesis somática *in vitro* (Cooke et al. 1993). Aunque de forma general la retirada de auxinas del medio de cultivo induce la formación de ES, se ha comprobado que se requiere una cantidad de auxina endógena para completar el desarrollo de los mismos (Michalczuk et al. 1992). Su participación en este proceso probablemente se lleva a cabo mediante el establecimiento de un gradiente de auxina durante la fase de inducción, que es esencial para iniciar la simetría bilateral que se establece durante la embriogénesis (Zimmerman 1993). De acuerdo con lo observado en ES (Schivavone y Cooke 1987) y ZE (Fischer y Neuhaus 1996; Liu et al. 1993), el transporte polar de las mismas parece ser un requisito imprescindible para la adecuada formación de los embriones hasta el estadio globular. De hecho, el tratamiento con inhibidores del transporte polar de auxinas bloqueó la morfológeneis en ambos tipos de embriones. No obstante, esta inhibición fue más drástica en ES que en ZE, probablemente debido a que en estos últimos los tejidos maternos pueden contribuir a una regulación adicional del desarrollo (Zimmerman 1993).

Utilizando dos tipos de tejidos embriogénicos distintos, Jourdain et al. (1997) establecieron en alerce una relación entre los niveles hormonales y la capacidad morfológica. Sin embargo, en *Pinus pinaster* se encontraron diferencias en el contenido endógeno de IAA en líneas embriogénicas que poseían la misma capacidad para producir ES maduros (Klimaszewska et al. 2008). Del mismo modo, Jiménez et al. (2001) encontraron diferencias en los niveles endógenos de IAA en cultivos embriogénicos de *Citrus* que eran genéticamente distintos pero no presentaban diferencias en su capacidad morfológica.

En aguacate, el contenido de IAA varió significativamente dependiendo de la línea embriogénica, obteniéndose los valores más elevados en las líneas Ah11 y Ah52,

pertenecientes al tipo SE y caracterizadas por presentar una mayor capacidad morfogénica. Sin embargo, valores intermedios fueron detectados en la línea Ah22, que presenta la capacidad morfogénica más baja. Estos datos demuestran que en esta especie no puede establecerse una correlación entre el contenido endógeno de esta hormona y la capacidad de los cultivos para formar ES maduros.

Los resultados obtenidos en la presente investigación así como las discrepancias observadas entre distintos trabajos apuntan a que el contenido en IAA de los cultivos embriogénicos no puede ser utilizado como marcador de la capacidad morfogénica de los mismos, ya que pueden darse variaciones dependiendo del genotipo, probablemente debidas a diferencias en la biosíntesis y metabolismo de esta hormona (Klimaszewska et al. 2008).

Chapter III

Cryopreservation

INTRODUCTION

The development of biotechnology has led to the production of a germplasm of high-added value which includes embryogenic cell lines with special attributes. Embryogenic cultures have been used for the application of biotechnological methods such as the production of synthetic seeds (Lambardi et al. 2006), the scale-up production of plants in bioreactors (Denchev et al. 1992) or the utilization in genetic transformation studies (Jackson and Linskens 2003).

Storage of this high valued material is of extreme importance. Cryopreservation involves storage of living tissues at very low temperatures (-196°C) in LN to arrest mitotic and metabolic activity. The cessation of biological activity allows the material storage without alteration for a theoretically unlimited period of time. Thus, cryopreservation is a useful tool for long-term maintenance of selected plant germplasm (Reed 2008). Moreover, this type of storage is considered to meet two basic criteria for the *ex situ* conservation: a minimal maintenance and the genetic integrity of the stored material (Razdan and Cocking 1997). Cryopreservation techniques provide the storage of very different plant propagules such as pollen, dormant bud, shoot apices, embryonic axes, callus, embryogenic cultures and ES. For all these reasons, cryopreservation can be applied to a wide range of prospects such as genetic resources preservation, conservation of biotechnology products, cryoselection and cryotherapy.

When applied to embryogenic cultures, cryopreservation can also avoid the detrimental effects of long-term subculture such as contamination, somaclonal variation or loss of morphogenic potential, which can occur with time. In addition, the integrated use of somatic embryogenesis and cryopreservation will enable the storage and efficient recovery of clones obtained from young reactive tissues, elite genotypes, cell lines with special attributes and genetically transformed material until field test results are available (Engelmann 1992).

Cryostorage is pivotal and well established in conifer biotechnology and forestry (Cyr 2000) where the use of *in vitro* clonal tissue culture in combination with cryopreservation is now widely used to produce elite plus trees on a routine basis (John et al. 2007; Park 2002). The totipotency of juvenile embryogenic culture tissues can be secured, concomitant with the long-term field selection trials of elite 'mother-trees' (Benson 2008b). In this manner, the maintenance of cryopreserved embryogenic cultures is successfully integrated into the global commercial clonal conifer forestry in Europe, Canada, New Zealand, South Africa

and the United States (Cyr and Klimaszewska 2002). The cryopreservation of these embryogenic cultures demonstrated to be one of the most powerful examples of how cryobanks support the clonal plant and tree biotechnology industry (Benson 2008b). The added value of using cryobanking in forestry relies on that it enables consistency in production of the same elite genotypes, the flexible use of clones at strategic times in breeding programs, genetic resources conservation and the management of plantation programs (Park 2002). Moreover, cryobanking maintains transgenic combinations of tree germplasm (Corredoira et al. 2007; Menges and Murray 2004).

Based on similar principles of elite cell lines, cryopreservation has contributed to the clonal production of high-value food and horticultural crop species (Benson 2008b). New embryogenic cell lines of cacao and coffee have been produced and stored by cryopreservation in the Biotechnology Laboratory of the Nestlé Company (Florin et al. 1999).

Cryopreservation has an important role in the future security of plants producing high value/small volume medicinal phytochemicals (Sanayaima et al. 2006; Sharma and Sharma 2003). Similarly, the cryopreservation of traditional European crops such as garlic and mint (Keller et al. 2005; Senula et al. 2007), which possess culinary and healthcare attributes, is important to meet the demands of nutraceutical and natural food additives markets (Benson 2008b).

Cryobanks can also provide an influential service for the molecular biology-genomics sector since genome mapping and molecular taxonomy require axenic, authenticated reference strains, cell lines and cultures (Stacey 2004). With this purpose, cryobanks are used to hold cell suspensions (Ribeiro et al. 1996) and shoot tips (Towill et al. 2006) of the plant model *Arabidopsis thaliana*. In a functional genomics project of *Populus*, cryopreservation is a key factor (Tsai and Hubscher 2004).

In all these applications, cryopreservation is a storage method that not only avoids detrimental effects of long-term subculture, but also leads to a costs reduction by minimizing the labour-intensive maintenance (Reed et al. 2004).

CRYOPRESERVATION THEORY

Cryopreservation is based on the unique physico-chemical properties of water, essential for cell function, and assumes that different water status can be influenced by cryobiological manipulations (Benson 2008a). The osmotic equilibrium related to

movements of water into and out of the cells is of particular importance for cryopreservation (Mazur 2004). Water removal, cryoprotection and physiological factors play an important role in cryopreservation and, in fact, they are the most influential determinants of survival after cryopreservation.

In cryopreservation protocols is critical the control and/or avoidance of intracellular ice nucleation, or 'seeding', defined as the point at which ice crystals are initiated. This spontaneous process occurs during cooling at a temperature lower than the melting point of the pure crystalline phase (ice). In most biological systems this temperature is around -40°C (Benson 2008b). At this temperature, water molecules form an 'ice embryo' upon which growth of the crystal is possible (Reid 1994). Ice nucleation affects the structural, osmotic and colligative integrity of cells causing physical ruptures and mechanical injury. After seeding, ice formation takes place in the extracellular solution, which becomes more and more concentrated, and thus hypertonic to the cell (Panis 1995). In order to restore the osmotic equilibrium produced by ice transition, an efflux of water occurs from the cytoplasm and vacuoles to the external space, where it finally freezes (Farrant 1980; Taylor 1987).

In cryopreserved plants the dynamics of factors involved in cryoinjury are moderated by differences in the ability of the intracellular and extracellular components to initiate ice crystals (Benson 2008a). Different cryopreservation techniques have been developed to minimize those damages.

CRYOPRESERVATION TECHNIQUES

Different cryopreservation techniques are worldwide used according to plant type, the needs of the facility involved, such as personnel, equipment or expertise, and the final aim of the cryopreservation. Successful cryopreservation procedures aim to reduce water content to levels at which ice crystal formation is non-lethal (Touchel et al. 2002). Depending on the physical mechanism they are based on, two types of cryopreservation protocols can be distinguished: classical, or conventional protocols, and new-vitrification procedures. In classical cryopreservation techniques the freezing takes place in the presence of ice, while in the vitrification-based protocols ice formation is avoided (Gonzalez-Arno et al. 2008).

Classical techniques

Conventional or classical protocols were some of the first techniques developed (Sakai 1966; Withers 1975; Withers and King 1980) and they are based on the osmotic regulation of cell contents and dynamics of freeze-induced dehydration (Reed and Uchendu 2008). They can also be termed as controlled freezing, slow freezing (SF) or two-step freezing methods.

These methods aim to optimize two injurious components: damaging colligative solution effects and ice formation (Benson 2008a). The standard protocol involves first a slow cooling down by a reduction of temperature at a fixed rate ($0.5\text{-}1^{\circ}\text{C min}^{-1}$) to a defined prefreezing temperature, usually -40°C , followed by rapid immersion in LN. When this controlled gradual rate cooling is applied to cells, ice forms in the extracellular medium first and the cytoplasm remains unfrozen due to solute concentration. A differential water gradient is created across the cell membrane and cells equilibrate by loss of water to external ice (Reed and Uchendu 2008). The icier the extracellular solution is, the more concentrated the intracellular solutes become. This induced dehydration has a very important cryoprotective effect since the intracellular freezable water is safely reduced before samples are plunged into LN. Depending on the amount of remaining intracellular water at the moment of immersing samples in LN, different physical events may take place (Gonzalez-Arno et al. 2008). If the cells are optimally dehydrated, the cytoplasm vitrifies on contact with LN. If the samples are under-dehydrated, leaving freezable water in the cytoplasm, large and lethal crystals will form. If over-dehydrated, the cells may die from desiccation.

Although an accurate cooling rate is crucial for the success of these protocols, implementing a high warming rate is also a critical step to prevent recrystallization during thawing of samples (Mazur 1984; Sakai and Nishiyama 1978; Tyler and Stushnoff 1988). Slow warming has been reported to be much more damaging than rapid warming after following a SF regime (Rall and Polge 1984). By contrast, if warming is carried out rapidly, there is no time for devitrification to occur and post-thaw recovery will increase (Mazur 2004).

The main steps in a slow cooling protocol are preconditioning, preculture, cryoprotection, controlled cooling, immersion in LN and warming (Reed and Uchendu 2008).

Preconditioning

In this preliminary step different strategies are used to prepare plant materials for controlled rate cooling and they include cold acclimation, *in vitro* culture treatments or osmotic adjustments (Reed and Uchendu 2008).

Preculture

Culture of explants on specialized media prior to cryopreservation has demonstrated to be very effective in improving recovery in several species. In pine embryogenic cells, preculture for 24 h in sorbitol resulted in high viability after freezing (Malabadi and Nataraja 2006). In ES of *Pinus patula* the preculture with sorbitol reversed the toxicity of dimethyl sulphoxide (DMSO) (Ford et al. 2000).

Cryoprotection

In slow cooling, chemical cryoprotection is an important factor. Cryoprotective mixtures generally comprise colligative additives, such as DMSO and glycerol. These protective additives reduce the problems associated with ice crystal formation or dehydration injury. Most cryoprotectants are mixed in standard plant growth medium and they may be applied gradually to avoid osmotic shock (Benson 2008b).

Cooling

The germplasm has to be transferred to a programmable freezer to cool the tissues at a specific cooling rate. Specifically designed cooling containers are also commercially available (Mr. Frosty®, Nalgene). They cool at about $-1^{\circ}\text{C min}^{-1}$ when filled with isopropanol and placed on a low temperature freezer. The cooling resumes to a terminal temperature, usually -40°C , where the sample is directly transferred to LN.

Warming

Rapid warming is usually performed in order to prevent ice recrystallization within plant cells (Sakai and Nishiyama 1978; Tyler and Stushnoff 1988). Thus, thawing is usually performed in a water bath at 40°C until all the ice has melted.

The main advantage of these techniques is to process large numbers of samples at a time and with little technician time (Reed 2008).

Slow cooling has been mainly applied to undifferentiated culture systems such as cell suspensions and calluses (Kartha and Engelmann 1994; Lynch 2000; Withers and Engelmann 1998). This technique is usually not very effective to cryopreserve complex biological systems like embryos or shoot-tips (Gonzalez-Arno et al. 2008). However, apices of cold-tolerant species, has successfully been cryopreserved by slow cooling methods (Reed and Chang 1997). The traditional controlled rate cooling method is still the most common approach for the cryopreservation of embryogenic callus cultures (Lambardi et al. 2008). In recent years, this approach has resulted in successful cryopreservation of embryogenic cultures of many hardwood species (Lambardi et al. 2008), including several conifers such as *Pinus roxburghii* (Mathur et al. 2003), *Pinus pinaster* (Marum et al. 2004) or *Pinus patula* (Ford et al. 2000). Moreover, embryogenic cultures from *Hevea brasiliensis* (Lardet et al. 2007), *Pinus nigra* (Salaj et al. 2007), *Fraxinus excelsior* (Ozudogru et al. 2010), *Liriodendron tulipifera* and *Liquidambar* spp. (Vendrame et al. 2001) have also been cryopreserved by slow cooling techniques. Thus, this slow cooling technique proved to be of large applicability in terms of botanical origin of the tested species (Ozudogru et al. 2010).

The special importance of this technique relies on its application in embryogenic cultures used in clonal forestry industry (Gale et al. 2008; Park 2002).

Vitrification-based techniques

New techniques are based on vitrification, which can be defined as 'the solidification of a liquid brought about not by crystallization but by an extreme elevation in viscosity during cooling' (Fahy et al. 1984). These techniques are also called ice-free cryopreservation because this cryoprotective regime eliminates ice formation inside and outside the cell (Benson 2008a). Vitrification comprises a 'glassy state' as it is an amorphous system, which lacks organized structure as a liquid but possesses the mechanical and physical properties of a solid (MacFarlane 1987; Taylor et al. 2004).

The key to developing cryoprotective vitrification strategies is to increase cell viscosity to the point at which ice formation is inhibited and water becomes vitrified (Benson 2008a). Water vitrification in biological systems is very difficult to achieve because the growth rate of crystals is very high. However, it can be achieved either by exposure of tissues to highly concentrated and viscous cryoprotective solutions or by physical

desiccation (Sakai et al. 2008). This vitrified state is considered as *metastable* because it can be easily reverted back to a liquid or devitrify to form ice.

These systems are particularly unstable during rewarming (Benson 2008a). A balance between rapid and slow warming should be achieved in vitrification techniques. Rapid rewarming is prescribed to avoid the possibility of ice nucleation (Gonzalez-Arno et al. 2008) but stress cracks and fractures can occur if rewarming is too rapid (Taylor et al. 2004). Empirical optimization of this phase may be required for each biological system.

Most of the sequential steps of the classical vitrification techniques are common and can be summarized as: preconditioning of the samples, osmoprotection or loading treatment, dehydration with a vitrification solution, immersion in LN, warming, unloading and plating.

Preconditioning

Optimizing the preconditioning treatments before the cryopreservation procedure is often required in vitrification methods to guarantee a successful cryopreservation protocol. Preconditioning of samples includes cold acclimation, for temperate species, and preculturing on media containing high sugar levels (Sakai and Engelmann 2007).

In several tropical plants pretreatment with sucrose has proved to enhance survival after cryopreservation (Tsai et al. 2009). A number of authors have addressed the positive influence of sucrose preculture on cryopreservation (Dumet et al. 1993; Fang et al. 2004) and the importance of defining an adequate concentration and duration for each specie. However, there are also studies in which sucrose preculture did not improve survival posthawing. In this sense, it has been reported that sucrose preculture led to a blackening of tissues and a lower posthawing survival in banana (Panis et al. 1996) and yam (Leunufna and Keller 2003).

The protective role of sugars in plants is not completely understood but two main different functions, sometimes difficult to be distinguished, have been proposed (Travert et al. 1997): osmotic adjustment and cryoprotection. The concentration of the sugar and the duration of the preculture should be examined (Fang et al. 2004). If preculture treatment is too short, there will be no time for explants to acquire dehydration tolerance. By contrast, if preculture is too long, changes in the physiological condition of explants may led to a decrease in survival (Wu et al. 2003). These variables will depend on the species and the

explant used as differences among plant species in their tolerance to high sucrose concentrations have been found (Wang et al. 2002ab).

Osmoprotection or loading treatment

For many species, direct exposure to highly concentrated vitrification solutions is toxic and a loading treatment is required. This treatment consists of incubating samples with a cryoprotective loading solution (LS) of an intermediate concentration to prepare them for exposure to the vitrification solution (Sakai and Engelmann 2007). The protective effect of loading treatment is not well understood (Panis et al. 2005) but two main functions may be attributed: mitigate mechanical stress (Charoensub et al. 1999) and increase dehydration tolerance through modification of cell structures and the stabilisation of membranes (Matsumoto et al. 1998).

The application of this loading treatment is a crucial step in the vitrification procedures developed for many plant materials (Sakai and Engelmann 2007), especially for those which present a high dehydration sensitivity, as banana (Panis et al. 2005). However, in species such as garlic (Baek et al. 2003), persimmon (Matsumoto et al. 2001) or *Cymbidium* (Thin et al. 2000), loading treatment proved not to be an essential step.

Different sensibility to LS has been observed between species and while for taro meristems (Sant et al. 2008) or olive embryogenic cultures (Sánchez-Romero et al. 2009) optimal treatment was defined at 20 min, for banana, no decrease in viability was observed after loading treatments up to 7 h (Panis et al. 2005). This differential effect of the LS was also observed between different types of olive embryogenic tissues. In this sense, Sánchez-Romero et al. (2009) found that LS exposure was more toxic for ES than for non-organized tissues.

Length of the loading treatment can also influence the subsequent length of PVS2 dehydration (Panis et al. 2005).

Dehydration with a vitrification solution

This is a crucial step in vitrification procedures in which explants must be sufficiently dehydrated by exposure to the vitrification solution without causing injury, in order to withstand the subsequent vitrification upon rapid cooling in LN (Sakai and Engelmann 2007).

There are several vitrification solutions, however the most commonly used are the glycerol-based vitrification solutions PVS2 (Sakai et al. 1990) and PVS3 (Nishizawa et al. 1993). Vitrification solution PVS2 (Sakai et al. 1990) is the most frequently used and contains 30% (w/v) glycerol, 15% (w/v) ethylene glycol, 15% (w/v) DMSO and 0.4 M sucrose. The combination of several cryoprotectants reduces the toxicity of any single additive (Fahy et al. 1986). The PVS2 solution easily supercools below -100°C upon rapid cooling and solidifies into a metastable glass at about -115°C.

In a vitrification protocol, tolerance to PVS2 is acquired by optimizing the preconditioning and loading treatments, as well as the duration of exposure to the vitrification solution (Sakai and Engelmann 2007). An optimal exposure time to this solution is the key to find a balance between the appropriate dehydration and the chemical toxicity that can cause different injuries (Panis et al. 2005). The optimum incubation time to the vitrification solutions is explant dependent and species specific (Niino and Sakai 1992). In cryopreservation of woody species such as *Quercus robur* (Sánchez et al. 2008), *Quercus suber* (Valladares et al. 2004) or *Castanea sativa* (Corredoira et al. 2004), where cryovial vitrification method was applied, a strong tolerance to PVS2 solution was found. Survival and embryo recovery achieved 100% with incubation times up to 120 min. However, Hong and Yin (2009) limited to 30 min the maximum PVS2 incubation time for *Emmenopterys henryi* because higher or lower values reduced significantly survival rates. These significant differences between incubation times were also shown by Wang et al. (2002a) in 'Troyer citrange' but the tolerance to PVS2 was greater and 210 min incubation time was allowed. Some explants, as pineapple, require longer PVS2 exposures in order to facilitate the penetration of the solution into the cells (Sakai and Engelmann 2007). Taro (Sant et al. 2008) is another species with low sensitivity towards dehydration with PVS2, and 100% of recovery was obtained after 120 min.

Besides the duration of the exposure to PVS2, the temperature at which dehydration takes place is another important factor. In several tropical species, injurious effects caused by PVS2 solution were eliminated or reduced by performing the treatment at 0°C (Sakai and Engelmann 2007).

If all these first steps (preconditioning, loading and dehydration) have been performed accurately, and samples have withstood dehydration without a drop in survival, the subsequent phases of freezing and warming should be successfully applied.

Freezing and warming

In vitrification techniques only one-step freezing is performed and dehydrated samples with vitrification solutions are immersed directly in LN to achieve a rapid cooling (Gonzalez-Arno et al. 2008).

There are two main types of new cryopreservation techniques, encapsulation-dehydration and vitrification (*sensu stricto*) although combinations and modifications of them have led to seven different vitrification-based procedures (Gonzalez-Arno et al. 2008):

Pregrowth: this technique consists of preculturing of samples in the presence of cryoprotectants and subsequent rapid freezing by direct immersion in LN. It was developed for a type of regenerative meristematic tissue in banana (Panis et al. 2002).

Dehydration: it consists of dehydrating explants before rapid freezing by direct immersion in LN. Dessication can be performed in the air current of a laminar airflow cabinet, using a flow sterile compressed air or silica gel (Gonzalez-Arno et al. 2008). Optimal survival is generally obtained when samples are frozen with water contents between 10 and 20% (PF basis) (Gonzalez-Arno et al. 2008). This technique has been applied to embryos of a large number of recalcitrant and intermediate species (Engelmann 2000).

Encapsulation-dehydration: in this technique the encapsulation of explants allows the application of subsequent drastic dehydration processes prior to cryopreservation. The protocol usually comprises encapsulation of tissues in alginate beads, preculture of alginated coated samples in liquid medium with high sucrose concentration, dessication and rapid cooling (Gonzalez-Arno et al. 2008). This technique was developed by Fabre and Dereuddre (1990) and it has been very effective for freezing apices of temperate and tropical species (Gonzalez-Arno and Engelmann 2006).

Vitrification: this freezing procedure comprises a pretreatment of samples with LS followed by dehydration with a highly concentrated vitrification solution, rapid cooling and warming, final removal of the cryoprotectants and recovery.

Encapsulation-vitrification: this procedure is a combination of two methods in which samples are encapsulated in alginate beads and then subjected to freezing by vitrification. It has been applied to apices of yam (Hirai 2001), pineapple (Gamez-Pastrana et al. 2004), sweet potato (Hirai and Sakai 2003), cassava (Hirai 2001) and other species (Sakai and Engelmann 2007).

Droplet-freezing: initially, this technique developed for shoot tips of cassava involved a cryoprotective treatment with a solution containing DMSO followed by SF in droplets of cryoprotective medium (Kartha et al. 1982). Later on, it was developed a modification of this method for *in vitro* shoot tips of potato (Schäfer-Menuhr et al. 1996). In this case, explants are treated with DMSO and frozen ultra rapidly in a droplet of this solution that is placed on a small piece of aluminium foil. Meristems of yam (Leunufna and Keller 2003) and *Asparagus* (Mix-Wagner et al. 2000) have also been cryopreserved following this protocol.

Droplet-vitrification: it is a very recent technique derived from the droplet-freezing (Kartha et al. 1982). It consists of a combination of the vitrification procedure with the droplet-freezing method. This technique is characterized by increased cooling and warming rates since samples are frozen in minute droplets of PVS2 placed on aluminium foil strips which are plunged directly in LN.

The main advantage of all these vitrification techniques is eliminating the need for controlled freezing and enabling complex structures to be cryopreserved (Sakai and Engelmann 2007). Hence, differentiated explants, irrespective of their origin and genomic group have been cryopreserved using these techniques (Gonzalez-Arno et al. 2008).

ARTIFICIAL CRYOPROTECTION

Cryoprotectants are used in most of the techniques described in order to provide an artificial cryoprotection to the plant tissues. Cryoprotectants can be classified as penetrating or non-penetrating depending on their ability to penetrate cells.

Penetrating or colligative cryoprotectants

These substances act as antifreezers in two different ways. Firstly, they increase the osmolality of the cell before the freezing process is initiated (Benson 2008a). Hence, the

level of water that needs to be frozen out to achieve osmotic equilibrium is less and the extent of the dehydration that occurs in the cell will be better tolerated (Meryman and Williams 1985). A secondary or additional protective advantage of these cryoprotectants is the drop in the freezing point (Benson 2008a).

Any solute can function as a colligative cryoprotectant provided it meets two essential attributes: first, it must be able to penetrate the cell, otherwise it will cause osmotic dehydration and the very injury they are used to protect against; second, it must be not toxic to the cell at the concentrations required for its efficacy (Benson 2008a). The most common penetrating cryoprotectants used in plant cryopreservation are glycerol, DMSO, methanol and the smaller molecular weight glycols (Benson 2008a).

Non-penetrating cryoprotectants

These cryoprotectants remain in the intercellular spaces and become concentrated at the ice crystal front. Their basic function is to decrease the rate of ice growth and protect against mechanical deformation. In this group, sugars and sugar alcohols are included, but the most effective is the polymer polyvinylpyrrolidone (Benson 2008a).

In classical cryopreservation techniques, DMSO is the main penetrating colligative cryoprotectant used, although it can be combined with non-penetrating additives such as sugars or PEG.

In vitrification techniques, different cryoprotective solutions have been developed by various research teams worldwide (Sakai and Engelmann 2007). The most commonly used solutions are the, previously mentioned, glycerol-based vitrification solutions designated PVS2 (Sakai et al. 1990) and PVS3 (Nishizawa et al. 1993).

RECOVERY

Recovery of viable propagules (growing shoots, multiplying cells, etc.) is the ultimate goal of all cryopreservation protocols. Recovery of true-to-type plants and actively growing cultures requires an appropriate cryopreservation protocol, including the best regrowth conditions. Regrowth generally takes place on standard semi-solid culture medium (Engelmann et al. 2008).

If the cryopreserved explants are meristems, the recovery assessment will take into account if there is resumed growth and developed shoots after cryopreservation. (Sakai et al. 2008). When embryogenic cultures are cryopreserved, recovery is generally assessed in

terms of explants showing resumption of embryogenesis. Nevertheless, other data such as survival, callus proliferation or weight of *de novo* formed callus (Marum et al. 2004) are also usually considered to evaluate the success of a cryopreservation protocol.

Viability testing

For determining the final success of a cryopreservation protocol, different viability tests can be applied as additional tools to estimate recovery.

Triphenyltetrazolium chloride (TTC) staining

Developed by Stenpokus and Lanphear (1967), this is the most widely applied technique. Cells are incubated in a colorless solution of a tetrazolium salt. The compound acquires red colour by reduction to a formazan derivative by mitochondrial dehydrogenases, and becomes water insoluble. It can be extracted with ethanol and gives a measure of the activity of these dehydrogenases. The major advantage is that this test provides a quantitative result without counting cells.

Fluorescein diacetate (FDA) staining

This assay is based on the fact that only cells with intact plasma membranes can accumulate fluorescein (Malpique et al. 2007). After entering into a living cell, FDA is transformed by cytoplasmic esterases into fluorescein, a derivative showing fluorescence under blue light (Jones and Senft 1985). Therefore, FDA staining is an indication of cell viability due to the assessment of membrane integrity and the presence of active esterases.

In these tests, the term 'viability' is erroneously used interchangeably with survival (Reed and Uchendu 2008). Initial signs of life detected may not further develop or the cessation in cell division can not be detected. In fact, it has been repeatedly reported (Duran-Vila 1995; Engelmann 1991) that TTC vital staining test does not provide accurate data about survival since there was no correlation between this test and the actual regrowth of cryopreserved cultures. In order to have realistic results by using viability tests it has been suggested to assess cell viability not just after thawing but during long-term cultures in order not to overestimate the viability (Pérez et al. 1999) and to find their proliferation capacity (Malpique et al. 2007).

In conclusion, although useful indicators, viability tests must be applied with caution and they must be confirmed by indicators of regrowth, regeneration or cell division (Benson 2008b).

PHYSIOLOGICAL STATE OF PLANT MATERIAL

Successful cryopreservation is reliant, not only on the 'artificial' cryoprotection and technique but also on the innate ability of germplasm to survive cryogenic stresses (Benson 2008b). This is influenced by cell type (Volk and Caspersen 2007), totipotent potential (Benson et al. 1992) or the capacity to overcome stress (Benson et al. 1995). Physiological factors will have an impact on the way in which different cell and tissue types survive different cryoprotective treatments (Benson 2008b).

The cells and tissues to be cryopreserved must be in a physiologically optimal status for the acquisition of dehydration tolerance and to produce vigorous recovery of growth (Dereuddre et al. 1988; Withers 1979). Several factors, such as developmental stage and size of the explants, growth conditions of the starting material, cell viability, synchronization of embryogenic cultures, as well as the culture method utilized may influence the physiological condition of the explants and thus play an important role to achieve successful cryopreservation (Sakai and Engelmann 2007). Differential responses obtained after cryopreservation in *Fraxinus* (Ozudogru et al. 2010), *Citrus* (Pérez 2000) or *Pinus* (Laine et al. 1992) have been attributed to different developmental stages of the embryogenic cultures used. Furthermore, Pérez (2000) reported in *Citrus* that small and rapidly growing cells proved to survive better after cryopreservation than bigger cells. Fang et al. (2004) and Iida et al. (1992) addressed that the developmental stage of ES had influence on the water loss and, consequently, on the success of cryopreservation.

GENETIC STABILITY AFTER CRYOPRESERVATION

Cryopreservation is usually claimed as the only safe storage method, in comparison with other *in vitro* long term storage procedures, which guarantees genetic stability (Martín and González-Benito 2009). In fact, the applicability of cryogenic protocols depends on the assumption of obtaining recovered material without any genetic modification with respect to the starting genotype (Condello et al. 2009). Most of the studies performed up to date have shown that the cryopreservation process does not affect genetic stability of the stored lines (Condello et al. 2009; Harding 2004). However, genetic variation has been occasionally

reported (Harding 2004) and some investigations (Martín and González-Benito 2005) suggest that attention should be paid to the evaluation of the genetic stability in cryopreserved materials.

In a study performed in wild pear the genetic stability was evaluated by a combination of randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) and simple sequence repeat (SSR), markers showing a different polymorphism capability. Identical patterns were obtained with both markers when cryopreserved plantlets were compared with the control plants (Condello et al. 2009). Similar results regarding genetic stability were also obtained when cryopreserved hop accessions were evaluated by using RAPD (Peredo et al. 2009). In this case, no variations after cryopreservation were confirmed by the technique of amplified fragment length polymorphism (AFLP) (Peredo et al. 2009). Using these markers, several reports coincide with these demonstrations of genetic stability in cryopreserved material; for example, in apple (Hao et al. 2001; Lui et al. 2004), *Abies cephalonica* (Aronen et al. 1999), grape and kiwi (Zhaj et al. 2003). In *Pinus nigra*, although cryopreserved embryogenic tissues showed unaltered DNA fragment patterns compared with the introduced controls, an intraclonal variation in RAPD profiles was detected in two cell lines (Salaj et al. 2011a). Since this variation was only observed in unfrozen samples pretreated with DMSO and sorbitol, the change was neither attributed to freezing itself nor to somaclonal variation after cryopreservation or *in vitro* culture variation. The alteration was probably caused by DMSO, which has proved to cause genetic alterations by DNA damaging in several species (Salaj et al. 2011a). This mutagenic effect of DMSO was also observed when Aronen et al. (1999) evaluated the genetic fidelity of Greek fir embryogenic lines five weeks after cryopreservation. These authors showed that despite no genetic aberrations were detected in the cryopreserved samples, genetic changes were found in the DMSO treated, non-frozen explants (Aronen et al. 1999).

The somaclonal variation due to the *in vitro* culture itself rather than the cryopreservation has been utilized to justify genetic differences in multiple occasions (De Verno et al. 1999; Moukadiri et al. 1999; Peredo et al. 2009; Sales et al. 2001; Wang et al. 1994). In other systems, the number of new DNA fragments was very limited (Fernandes et al. 2008; Martín and González-Benito 2005) or varying levels of genomic DNA were only showed in a low percentage of the genotypes analysed (Kaity et al. 2008).

Epigenetic changes in cryopreserved plant material, such as modifications in DNA methylation pattern, have been ascertained in studies carried out in *Fragaria gracilis* (Hao et

al. 2002a), *Citrus sinensis* (Hao et al. 2002b), *Carica papaya* (Kaity et al. 2008), *Humulus lupulus* (Peredo et al. 2009) or *Prunus dulcis* (Channuntapitat et al. 2003). However, in studies performed in *Gentiana cruciata*, the methylation status of genomic DNA was very similar between frozen and unfrozen regenerants (Mikula et al. 2011).

DNA methylation in plants has a pivotal role in regulating development and organ tissue differentiation (Lambe et al. 1997); however, the observed changes may be an indication of adaptative responses to stresses associated with the conditions of cryopreservation and subsequent recovery and regeneration steps (Harding et al. 2000; Johnston et al. 2009; Kaity et al. 2009).

APPLICABILITY OF CRYOPRESERVATION TO SOMATIC EMBRYOGENESIS SYSTEMS

In embryogenic cultures, the resumption of embryogenesis after cryopreservation is assumed as a positive recovery. Nevertheless, post-thaw calli regrowth and embryo regeneration after cryopreservation may not lead to plant regeneration. Hence, the influence of cryopreservation on post-thaw morphogenic competence needs to be evaluated in all the stages of the somatic embryogenesis process.

The majority of studies prove that cryopreservation does not affect embryogenic potential of calli or suspension cultures, as was demonstrated in *Hevea brasiliensis* (Lardet et al. 2007) or *Mangifera indica* (Wu et al. 2007). In fact, it has been described an increase of embryogenic capacity after cryopreservation in tissues of *Citrus deliciosa* (Aguilar et al. 1993), *Festuca arundinacea* (Wang et al. 1994), *Hevea brasiliensis* (Engelmann et al. 1997), *Vitis vinifera* (Wang et al. 2002b) and *Cyclamen persicum* (Winkelmann et al. 2004). Investigations are needed to determine whether the regeneration enhancement effect is caused by pretreatment, freezing or by a combination of both (Mikula et al. 2011). Although the majority of reports describe no drop in embryogenic competence after cryopreservation, in *Quercus robur* (Martínez et al. 2003) the number of new ES per explant was always lower in frozen explants than in those unfrozen.

As well as the fact that it does not influence the somatic embryogenesis process, the applicability of the technique to a broad range of genotypes, should be considered an important factor.

Diverse genotypes can be usually cryopreserved but sometimes several techniques may be required due to differential genotypic response (Staats et al. 2006). Developing a

new cryopreservation protocol for every plant accession is difficult and time consuming but nowadays it is possible to choose a technique and adapt it to a new genotype (Reed 2008). In a standard and feasible cryopreservation protocol, none or a slight genotypic dependence must be observed and it should be suitable for all, or the majority of accessions and genotypes tested. Although highly recommendable for this purpose, to perform controlled comparisons of commonly used protocols before selecting one for a new species is uncommon (Uchendu and Reed 2008).

Droplet vitrification on aluminium foil strips (Panis et al. 2005) is a highly valuable method whose promising results, more than 700 and 850 accessions successfully cryopreserved in potato (Panta et al. 2009) and *Musa* (Van den Houwe et al. 2011), respectively, call for a broader utilization in a large number of different plant species (Sakai and Engelmann 2007). In fact, this procedure has already been successfully applied to a number of crops such as *Allium sativum* (Kim et al. 2006), *Musa* spp. (Panis et al. 2005) and *Olea europaea* (Sánchez-Romero et al. 2009).

CRYOPRESERVATION OF AVOCADO

The only previous work on avocado cryopreservation was reported by Efendi (2003) and Efendi and Litz (2003). Air-dried embryogenic cultures from six embryogenic lines, representing five cultivars, were used for cryopreservation experiments. Two different techniques, slow cooling and classical vitrification, were applied. Only when using the slow cooling method different factors, such as the composition of the cryoprotectant solution or washing the cultures after thawing, were tested. The effects of the different treatments were evaluated by determining post-thaw viability based upon TTC staining and regrowth on recovery medium. They found that the TTC vital staining test does not provide accurate data about survival and, as previously described by Engelmann (1991) and Duran-Vila (1995), there was no correlation between TTC vital staining test and the actual regrowth of cryopreserved cultures. Results based on the actual regrowth of cultures showed that, although significant differences were found related to some of the factors tested, the genotype appeared to be the main factor determining cultures survival after cryopreservation. Using the slow cooling protocol three of the five embryogenic lines tested were successfully cryopreserved, with recovery values ranging from 52 to 80%. Zero and 4% regrowth were obtained for the rest of the lines. Following the vitrification protocol, only one embryogenic line reached acceptable recovery values (62%), significantly lower

rates (18% and 5%) were obtained with the other two lines. In conclusion, none of the protocols applied by Efendi (2003) gave rise in all the embryogenic lines tested to recovery values higher than the 40%, minimum required for secure long-term storage of germplasm collections (Uchendu and Reed 2008). Consequently, none of these protocols could be considered as generally applicable to cryopreserve avocado embryogenic culture. This fact revealed that further research on cryopreservation of avocado embryogenic cultures is required.

MATERIAL AND METHODS

PLANT MATERIAL AND CULTURE CONDITIONS

Embryogenic cultures of avocado (*Persea americana* Mill.) initiated and maintained as previously described in chapter I, were used for cryopreservation experiments.

CRYOPRESERVATION EXPERIMENTS

Unless otherwise stated, explants utilized for cryopreservation experiments consisted of 100 mg of embryogenic tissue selected from established cell lines, five-six weeks after the last subculture, and the cryopreservation experiments were conducted following the droplet-vitrification method developed by Panis et al. (2005) with 60 min PVS2 incubation time.

The pH of the cryoprotective solutions used was adjusted to 5.74 prior to sterilization by filtration.

Comparison of three cryopreservation protocols

Three cryopreservation protocols were compared: 1) a SF method (Panis et al. 1990), 2) the vitrification-based protocol of Sakai et al. (1990) (vial) and 3) an ultra-fast freezing method using droplet-vitrification on aluminium foil strips (droplet) (Panis et al. 2005).

Two embryogenic cell lines, D31 and D1, which represent the diversity of cell lines that can be obtained in avocado (Márquez-Martín et al. in press; Witjaksono and Litz 1999a), were used in this experiment. D1, belonging to the PEM-type, proliferated as friable calli and non-organized embryogenic tissue with few ES; D31, representative of the SE-type, was mainly constituted by ES at early developmental stages.

In the SF method (Panis et al. 1990), embryogenic cultures corresponding to 2.5 ml VCS were mixed with 2.5 ml of liquid basal MS medium supplemented with 0.52 M sucrose in 10 ml test tubes. Then, incubation medium consisting of liquid basal MS medium with 0.52 M sucrose and 15% (v/v) DMSO was gradually added over a period of 60 min up to a final concentration of 7.5% (v/v) DMSO. A 100 mg of the cryoprotected plant material, suspended in 1 ml of incubation medium, were dispensed into cryovials and subsequently transferred to Mr. Frosty® (Nalgene™) containers containing 250 ml isopropanol. The containers were placed in an ultra freezer (-80°C) for controlled cooling at a rate of

approximately $1^{\circ}\text{C min}^{-1}$ (Fig. 56A). The temperature was monitored by a temperature probe inserted into a representative cryotube (Fig. 56B).

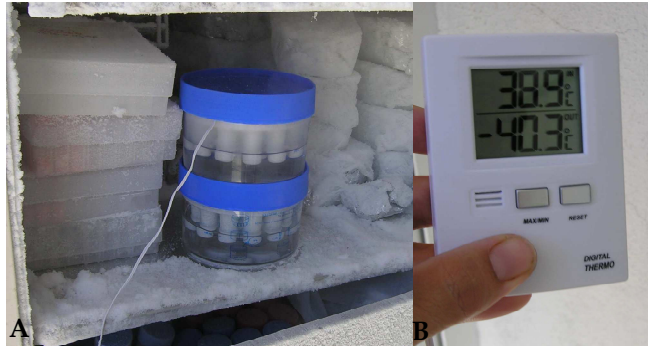


Figure 56. (A) Mr Frosty containers placed in an ultrafreezer and (B) thermometer used in the SF method.

When the temperature inside the cryotube reached -40°C , the cryovials were removed from the container and immediately immersed into LN. After freezing in LN for 30 min, cryopreserved embryogenic cultures were thawed by immersion of the cryovials in a 40°C sterile water bath until most of ice melted (Fig. 57). Thereafter, the content of each cryovial was poured onto two sterile filter paper discs placed in a Petri dish containing 25 ml of standard proliferation medium (MSPA). One day later, embryogenic cultures were transferred to standard proliferation medium.

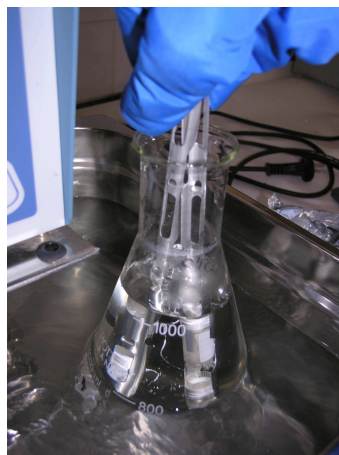


Figure 57. Thawing in a 40°C sterile water bath.

In both vitrification-based protocols, the first steps, including incubation in LS and PVS2 (Sakai et al. 1990), were common. Selected embryogenic tissues were transferred to 30 ml polystyrene containers with approximately 10 ml filter-sterilized LS solution. In this LS cryoprotective solution, consisting of 2 M glycerol and 0.4 M sucrose dissolved in basal MS medium, samples were maintained for 20 min in the dark at room temperature. Following removal of this solution, embryogenic cultures were dehydrated with PVS2 solution for 60 min at 0°C. The vitrification solution PVS2 consisted of 3.26 M glycerol, 2.42 M ethylene glycol and 1.9 M DMSO dissolved in basal MS medium containing 0.4 M sucrose. In the original vitrification procedure (vial procedure), just before the end of PVS2 incubation, samples were transferred to 2 ml cryovials and mixed with 1 ml of fresh ice-cold PVS2. When the PVS2 treatment was completed, the vials were immediately plunged into LN. In the droplet-vitrification method, just before the end of the PVS2 treatment, embryogenic cultures surrounded by a droplet of PVS2 were transferred onto a strip of aluminium foil (Fig. 58A). To keep the temperature of the strip around 0°C, all the manipulations were made on top of a frozen cooling element. Once finished the PVS2 incubation time, the aluminium strips were rapidly immersed in LN (Fig. 58B).

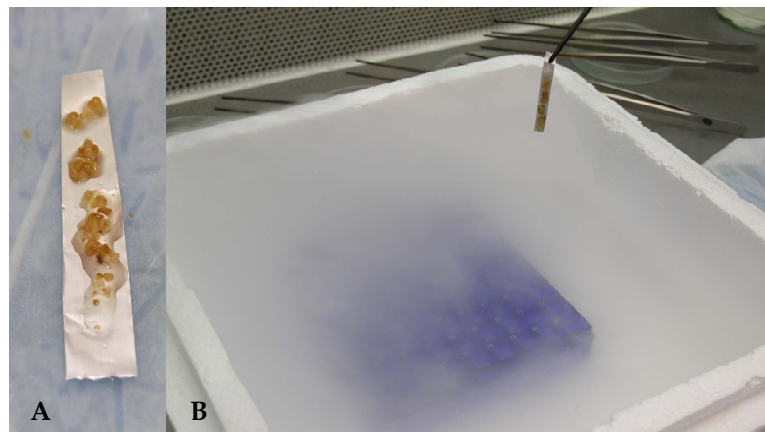


Figure 58. Droplet-vitrification method. (A) Aluminium foil strip with droplets of PVS2 and embryogenic calli. (B) Box with LN and aluminium foil just before freezing.

In both protocols, explants were maintained in LN for 30 min. In the vial procedure, rewarming was carried out by transferring the cryovials to a 40°C sterile water bath for 80 s. Subsequently, PVS2 was replaced by recovery solution, consisting of 1.2 M sucrose dissolved in basal MS medium, and explants were incubated for 15 min at room

temperature. In the droplet-vitrification method, the strips were taken out of LN and rinsed in recovery solution for 15 minutes in a Petri dish at room temperature. In both vitrification-based procedures, samples were subsequently placed on two filter paper discs on hormone-free basal MS medium containing 0.3 M sucrose and 0.001% (w/v) ascorbic acid. Twenty four hours later, they were transferred to MSPA medium.

Two different controls were included for each cryopreservation protocol: explants treated with the corresponding cryoprotective solutions without subsequent immersion in LN (treated controls) and non-treated, non-frozen tissues (untreated controls).

Effect of time of incubation in PVS2 solution

Following the droplet-vitrification method, an experiment was carried out to determine the optimal exposure time to the vitrification solution PVS2. Embryogenic samples from the cell lines D1 and D31 were incubated in LS for 20 min and subsequently subjected to dehydration with PVS2 solution at 0°C for 0, 30, 60, 90 and 120 min prior to be plunged in LN. In order to evaluate chemical toxicity of the vitrification solutions, treated and untreated controls were included.

Influence of the developmental stage of embryogenic tissue used as explant material for cryopreservation

Avocado embryogenic lines can be very heterogeneous and, depending on the cell line (SE or PEM), proliferation can mainly occur as callus or as ES at different developmental stages (Márquez-Martín et al. in press; Witjaksono and Litz 1999a). In this experiment, the influence of plant material used as explant for cryopreservation was tested. For this purpose, four different types of embryogenic tissue were selected from D31 line (Fig. 59): a) embryogenic callus, b) ES 1-2 mm in length, c) ES 3-4 mm in length and d) PM, consisting of the explant usually selected for avocado embryogenic cultures maintenance, e.g., a mixture of callus and globular ES 1-2 mm in length.

Treated and untreated controls were included for each treatment.

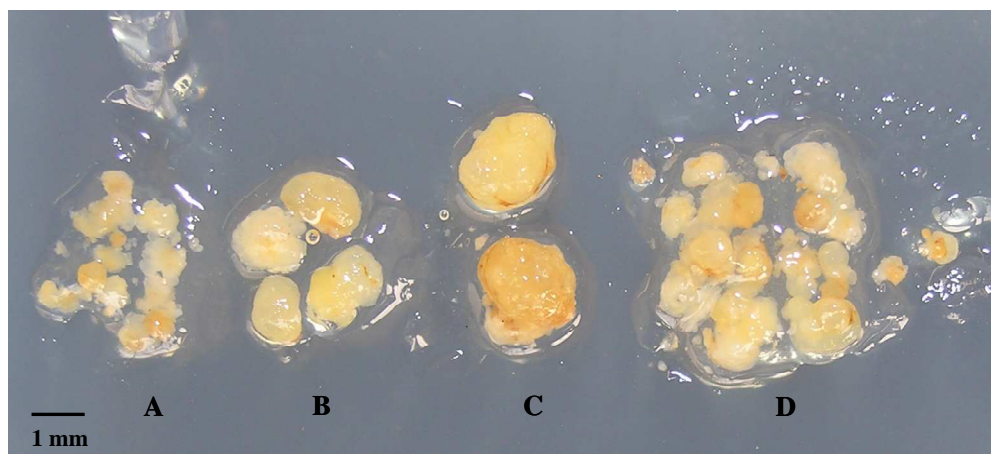


Figure 59. Different cryopreservation explants selected from line D31. (A) Embryogenic callus, (B) globular ES 1-2 mm in length, (C) ES 3-4 mm in length and (D) PM.

Effect of the culture method and the culture growth phase

To study the effect of the culture method and the culture growth phase on cryopreservation, embryogenic cultures from line D31 were initiated on solid and in liquid medium and selected as cryopreservation explants at different times corresponding to different growth phases.

For initiating the culture in solid medium, 0.1 g of embryogenic tissue were cultured in 25 ml MSPA medium contained in a 25 x 150 mm test tube. Growth of cultures was determined by assessing PF, PS and VCS, as previously indicated in chapter II. These parameters were monitored throughout a 42 day culture cycle, and different growth curves were plotted according to each growth parameter (PF, PS or VCS).

Growth curve in liquid medium was taken from previous investigations carried out in avocado by Márquez-Martín et al. (in press). As previously indicated in chapter I, suspension cultures were initiated by inoculating 0.4 g of embryogenic callus into 40 ml liquid MSP medium in a 100 ml Erlenmeyer flask. In this case, only PF data were monitored throughout a 29 day culture cycle.

Different growth phases were distinguished in the different growth curves. Explants corresponding to specific phases in solid and liquid medium were selected for cryopreservation experiments. Concisely, for cultures on solid medium explants were harvested 0, 14, 21 and 28 days after the last subculture while in the case of embryogenic suspensions explants were sampled 0, 9, 14 and 21 days after initiation. In both cases, 0

days' consisted of friable embryogenic structures (1–2 mm in length) taken directly from stock cultures maintained in standard conditions.

Treated and untreated controls were included in each treatment.

Effect of sucrose preculture

To analyse the cryoprotective effect of sucrose on cryopreservation of avocado embryogenic cultures, embryogenic tissues from line D31 were precultured in MSPA medium supplemented with 0.3 M sucrose during 0, 3, 7, 14 and 21 days. In order to evaluate the effect of sucrose preculture on both, freezing and explants tolerance to withstand the cryoprotective solutions, treated and untreated controls were included at each treatment.

Fluorescein diacetate viability assay

In order to monitor the evolution of cell viability after cryopreservation, the FDA staining was carried out after applying the droplet-vitrification method to both cell lines, D1 and D31, with 60 min of incubation time in PVS2 solution. The assay was performed at different time points after thawing: 0, 2, 4, 7, 10, 13, 17 and 21 days.

A stock solution of 1% (w/v) FDA in acetone was diluted with distilled water up to a final concentration of 2% (v/v). Several drops of this stain were added directly to the material and, after 4 min of incubation, green fluorescence was observed under UV illumination (Microscope: Multizoom AZ-100 (NIKON, Tokyo, Japan) equipped with epifluorescence system 100W, HBO 100 W/2 short arc mercury lamp (OSRAM, Berlin, Germany), filter GFP-B (EX 460-500; DM 505; BA 510-560) and zoom lens Nikon AZ Plan APO 1x).

The FDA stain was also carried out in the experiment performed to investigate the influence of the embryogenic tissue used as cryopreservation explant in order to detect a possible relationship between developmental stages and viability.

Three independent samples, representative of the proliferation pattern observed in each case, were stained per cell line and treatment. Photographies were taken under UV light.

INFLUENCE OF CRYOPRESERVATION ON SOMATIC EMBRYOGENESIS AND APPLICABILITY OF THE CRYOPRESERVATION PROTOCOL

Effect of cryopreservation on somatic embryogenesis

With the aim of assessing the influence of cryopreservation on the regeneration of avocado plants via somatic embryogenesis, the effect of cryopreservation was evaluated on the different phases of this process. For this purpose, embryogenic cultures from line D2.3 were cryopreserved and five months after thawing, the behaviour of cryopreserved cultures was compared with untreated unfrozen cultures in the phases of proliferation, development of ES and germination.

To check the effect on cultures proliferation, 0.1 g of embryogenic tissue were initiated in MSPA medium and PF increase was recorded five weeks later.

Development of ES was carried according to Márquez-Martín et al. (2011), as previously indicated in chapter I. The number of ESBO (< 4 mm and ≥ 4 mm) produced per culture was recorded after five weeks.

To test the effect on the germination phase, ESBO ≥ 4 mm were selected from B5m10a maturation medium and subsequently germinated in M1 medium following the protocol of Perán-Quesada et al. (2004) (chapter I). Germination percentage and the rest of germination-related parameters were recorded after two five-week culture cycles.

Applicability of the droplet-vitrification method for cryopreservation of avocado embryogenic cell lines

The applicability of the droplet-vitrification procedure to avocado embryogenic cultures was evaluated in 12 cell lines representing two cultivars, 'Duke 7' and 'Anaheim'. These cell lines had been initiated two years before carrying out this experiment, and had been maintained in MSPA medium with subcultures at five-six week intervals. Untreated and unfrozen cultures were utilized as controls.

DATA TAKEN AND STATISTICAL ANALYSIS

In cryopreservation experiments and when testing the applicability of the method, 5 replicates were used per treatment and embryogenic cell line and each experiment was repeated twice.

Different data were monitorized during two successive five-week culture cycles: culture PF increase (including both, embryogenic and non embryogenic tissues), survival

(percentage of explants exhibiting any sign of growth), recovery (percentage of samples showing resumption of embryogenesis) and minimum recovery (percentage of explants in which at least 40% of the new proliferation displayed embryogenic characteristics). Minimum recovery can be considered as a way of estimating the real embryogenic competence of a cryopreserved culture, as 40% can be considered in avocado the minimum percentage of embryogenic cells required to re-establish an embryogenic culture after cryopreservation.

When evaluating the effect of cryopreservation on the somatic embryogenesis process, 25 and 35 replicates were included in the proliferation and the development phases, respectively. All ESBO \geq 4 mm obtained (22-34) were transferred to germination conditions.

Percentage data were subjected to frequency analysis with an RxC test of independence or a three-way log-linear analysis to evaluate interactions between variables. PF increase data were analysed by ANOVA followed by mean comparison using the LSD test. The significance level used was 0.05 in all cases.

RESULTS

CRYOPRESERVATION EXPERIMENTS

Comparison of three cryopreservation protocols

In general, embryogenic tissues turned dark brown or grey after cryopreservation but, in most of cases, new proliferation of tissue was evident approximately three weeks later.

Significant interactions were observed between the embryogenic line and the cryopreservation protocol when parameters such as survival, recovery and minimum recovery were assessed ten weeks after freezing (Table 10). In embryogenic line D1, the three protocols were successfully applied and similar survival (data not shown), recovery and minimum recovery rates were obtained regardless of the cryopreservation technique used. However, in line D31, while vitrification-based protocols gave rise to high minimum recovery rates (90-100%), the SF method did not produce satisfactory results, in the sense that minimum recovery was not achieved in any samples. This result was mainly due to a drastic decrease in survival (33%) (data not shown) when explants of this line were cryopreserved following the SF method.

Table 10. Recovery and minimum recovery rates of avocado embryogenic cultures after cryopreservation following different cryopreservation protocols: the classical vitrification method (vial), an ultra fast freezing method (droplet) and the SF method, with (+LN) or without (-LN) subsequent immersion in LN. Assessment made five and ten weeks after treatment. Different letters within each column indicate significant differences by an RxC test of independence with a significance level of 0.05.

Treatment	Recovery (%)				Minimum recovery (%)			
	5 weeks		10 weeks		5 weeks		10 weeks	
	D1	D31	D1	D31	D1	D31	D1	D31
Control	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a
-LN	100 a	100 a	100 a	100 a	30 b	90 a	88.89 a	90 a
Vial +LN	77.78 a	100 a	77.78 a	100 a	55.56 b	100 a	77.78 a	100 a
Droplet +LN	77.78 a	100 a	77.78 a	100 a	44.44 b	90 a	66.67 a	90 a
SF -LN	80 a	90 a	90 a	100 a	40 b	40 b	70 a	80 a
SF +LN	70 a	0 b	80 a	33.33 b	40 b	0 c	50 a	0 b

The cell lines tested withstood the cryoprotective solutions used in both types of cryopreservation methods relatively well, that is, use of the solutions did not result in a

significant decrease in survival (data not shown) or recovery (Table 10). Nevertheless, as can be observed in the minimum recovery data, these solutions did cause some delay in embryogenic tissue regrowth (Table 10). In relation to their effect on PF increase, no detrimental effects compared to untreated controls were observed in samples treated with the cryoprotective solutions used in the SF method (SF -LN) (Fig. 60). Nevertheless, in this case a high proportion of culture regrowth was composed of non-embryogenic tissue (Fig. 61). Further, vitrification solutions had an adverse effect on cultures regrowth in line D1, the treated controls showing significantly less regrowth than the untreated controls (Fig. 60). In contrast, regrowth of D31 was not affected by these cryoprotective solutions.

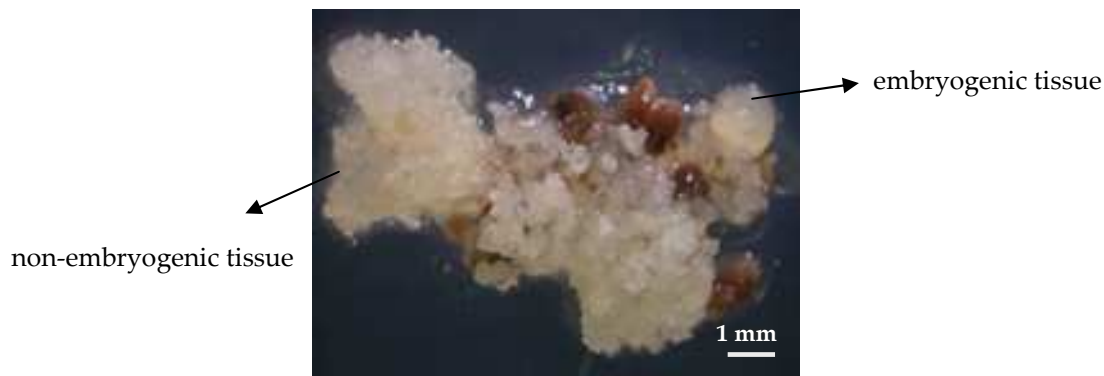


Figure 61. Embryogenic and non-embryogenic tissue after the treatment with the cryoprotective solutions of the SF method.

Cryoprotective solutions were effective at protecting explants from ice damage with the exception, in line D31, of the cryoprotective solution used in the SF method, in which a strong decline in survival and recovery was observed after freezing (Table 10). As previously indicated, no minimum recovery or regrowth were recorded in this case, confirming the ineffectiveness of this protocol to cryopreserve embryogenic tissues of this cell line. In contrast, when vitrification solutions were used, no significant differences in PF increase were observed between frozen samples and treated controls five weeks after freezing, demonstrating that freezing damage was avoided in both lines.

To summarize, the SF method was rejected because it only gave rise to satisfactory results in one of the embryogenic lines tested. The two vitrification-based protocols provided similar results in terms of survival, recovery and minimum recovery. However, the droplet-vitrification procedure was selected for further cryopreservation experiments as

it resulted in slightly higher regrowth rates and a more homogenous response in the cell lines used in this experiment.

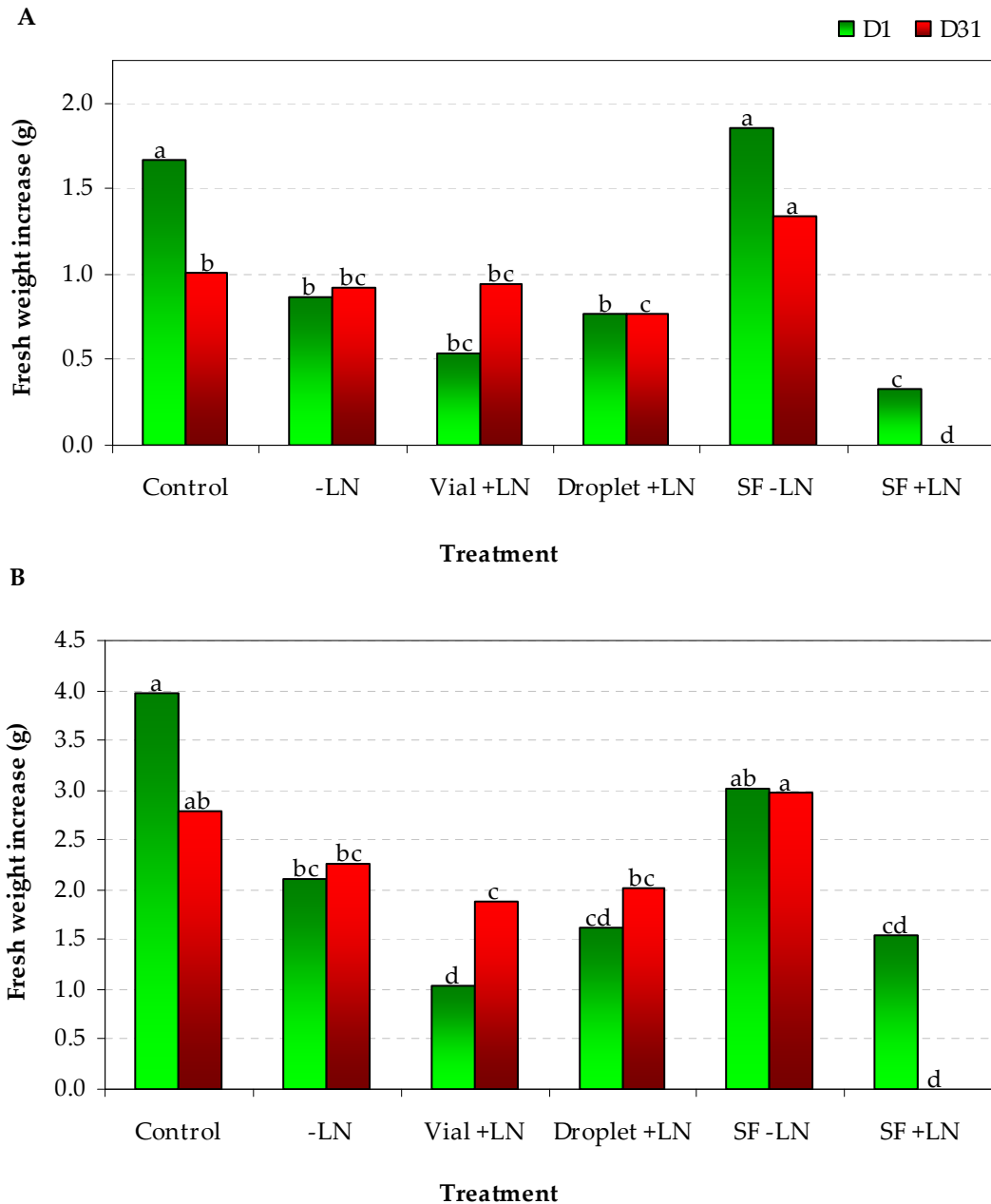


Figure 60. PF increase of avocado embryogenic cultures after preservation by the vial-freezing method (vial), an ultra fast freezing method using droplet-vitrification (droplet) and the SF method, with (+LN) or without (-LN) immersion in LN. Data were recorded (A) five and (B) ten weeks after treatment. Within each cell line, different letters indicate significant differences by ANOVA with a significance level of 0.05.

Effect of time of incubation in PVS2 solution

In this experiment, survival (data not shown) and recovery rates were identical, in all cases some cells of the regrowing explants exhibiting typically embryogenic features. Moreover, survival, recovery and minimum recovery rates assessed five and ten weeks after treatment were the same, meaning that culture response was rapid.

The cryoprotective effect of the PVS2 solution was demonstrated by the fact that no culture survival or recovery was observed when freezing in LN was carried out without prior dehydration by PVS2 treatment (+LN 0) (Table 11).

Table 11. Recovery and minimum recovery rates of embryogenic cultures after exposure to PVS2 solution for different time periods, with (+LN) or without (-LN) subsequent immersion in LN. Assessment made five weeks after treatment. Data recorded ten weeks after treatment were the same. Different letters within each column indicate significant differences by an RxC test of independence with a significance level of 0.05.

Treatment	Recovery (%)				Minimum Recovery (%)			
	D1		D31		D1		D31	
Control	100	a	100	a	100	a	100	a
-LN 0	100	a	100	a	50	b	100	a
-LN 30	100	a	100	a	50	b	100	a
-LN 60	100	a	100	a	70	b	100	a
-LN 90	100	a	70	b	50	b	70	b
-LN 120	90	a	80	ab	90	a	80	ab
+LN 0	0	b	0	c	0	c	0	c
+LN 30	83	a	100	a	66.67	b	100	a
+LN 60	100	a	100	a	75	ab	100	a
+LN 90	100	a	88.89	ab	55.56	b	88.89	ab
+LN 120	100	a	100	a	100	a	100	a

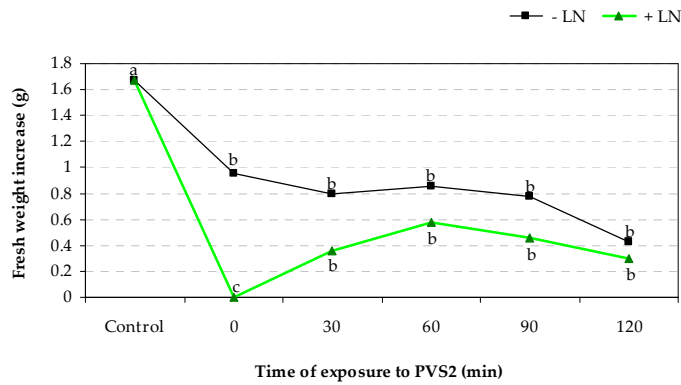
Embryogenic lines D1 and D31 showed different sensitivity to cryoprotective solutions, LS and PVS2. In the case of PVS2, it can be concluded that incubation with the solution for up to 120 min had no influence on survival or recovery in line D1, as no significant differences were observed between treated and untreated controls. On the other hand, in line D31, 100% recovery was obtained when explants were treated for 30 or 60 min, but lower rates were recorded for longer incubation times. A decrease in minimum

recovery was also observed in this line at incubation periods longer than 60 min (Table 11). In relation to the effect of LS, comparison of minimum recovery obtained in treated (-LN 0) and untreated controls revealed that this solution had detrimental effects on embryogenic potential in line D1 (Table 11). In contrast, LS solution was not observed to have any influence on the embryogenic capacity of D31. PF increase data provided further evidence that the tolerance to each of the vitrification solutions differed between the two embryogenic lines (Fig. 62). Five weeks after treatment, culture regrowth of unfrozen samples of line D1 showed a significant effect of incubation with the cryoprotective solutions. However, five weeks later, cultures had recovered from the toxic effect of LS though not from that of PVS2. In relation to line D31, only the PVS2 solution had some influence on regrowth five weeks after treatment. Nevertheless, this line was able to recover and, ten weeks after treatment, there was no significant difference in regrowth between untreated samples and those which had undergone PVS2 incubation periods of up to 90 min.

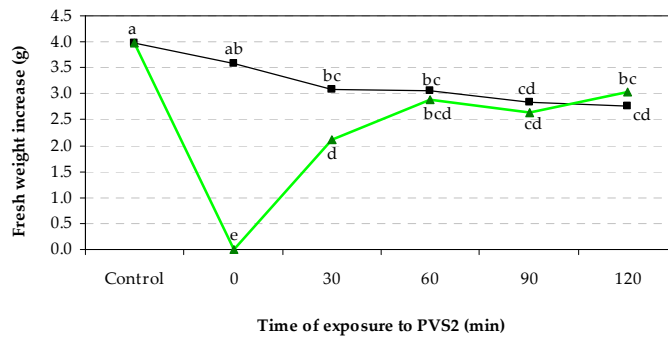
Freezing of samples treated with LS and PVS2 did not have any prejudicial effect on recovery or minimum recovery (Table 11). With respect to culture regrowth, ten weeks after freezing, in line D1 the highest values of this variable were obtained with PVS2 incubations of 60 to 120 min, while in D31 30 and 60 min incubations produced the best results (Fig. 62). Considering these data, 60 min was established as the optimum incubation period for cryopreserving avocado embryogenic cultures as it resulted in higher PF increases in both cell lines.

Despite the fact that regrowth could not be observed until 21 days after cryopreservation, cells showing FDA staining were already evident one day after thawing in line D31 and six days later in the case of line D1 (Fig. 63). After freezing, cells became dark brown, as a consequence of an oxidative process, and it was from some of these dark structures that initiation of new proliferation, characterized by intensely stained cells, could be observed. The intensity and number of fluorescent cells increased over time until day 21, at which point most cells were intensely stained. During the first thirteen days, FDA staining was more widespread and intense in line D31 than in line D1 indicating a higher proportion of viable cells after cryopreservation in the former embryogenic line. Nevertheless, from this day until the end of the monitoring, staining intensity was very similar in the two embryogenic lines.

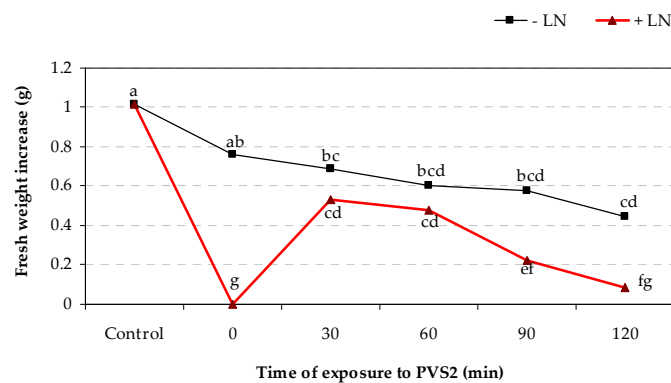
A.5



A.10



B.5



B.10

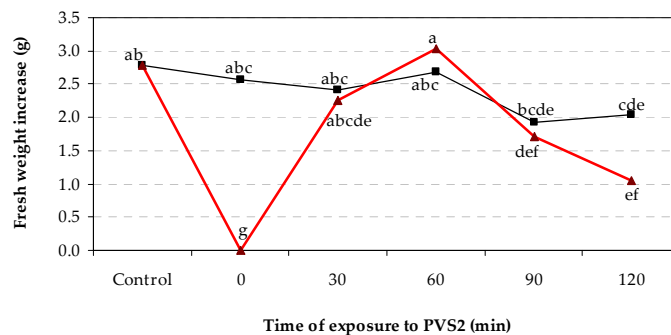


Figure 62. PF increase of (A) D1 and (B) D31 avocado embryogenic cultures after exposure to PVS2 solution for different time periods, with (+LN) or without (-LN) subsequent immersion in LN. Assessment made five and ten weeks after treatment. Different letters indicate significant differences by ANOVA with a significance level of 0.05.

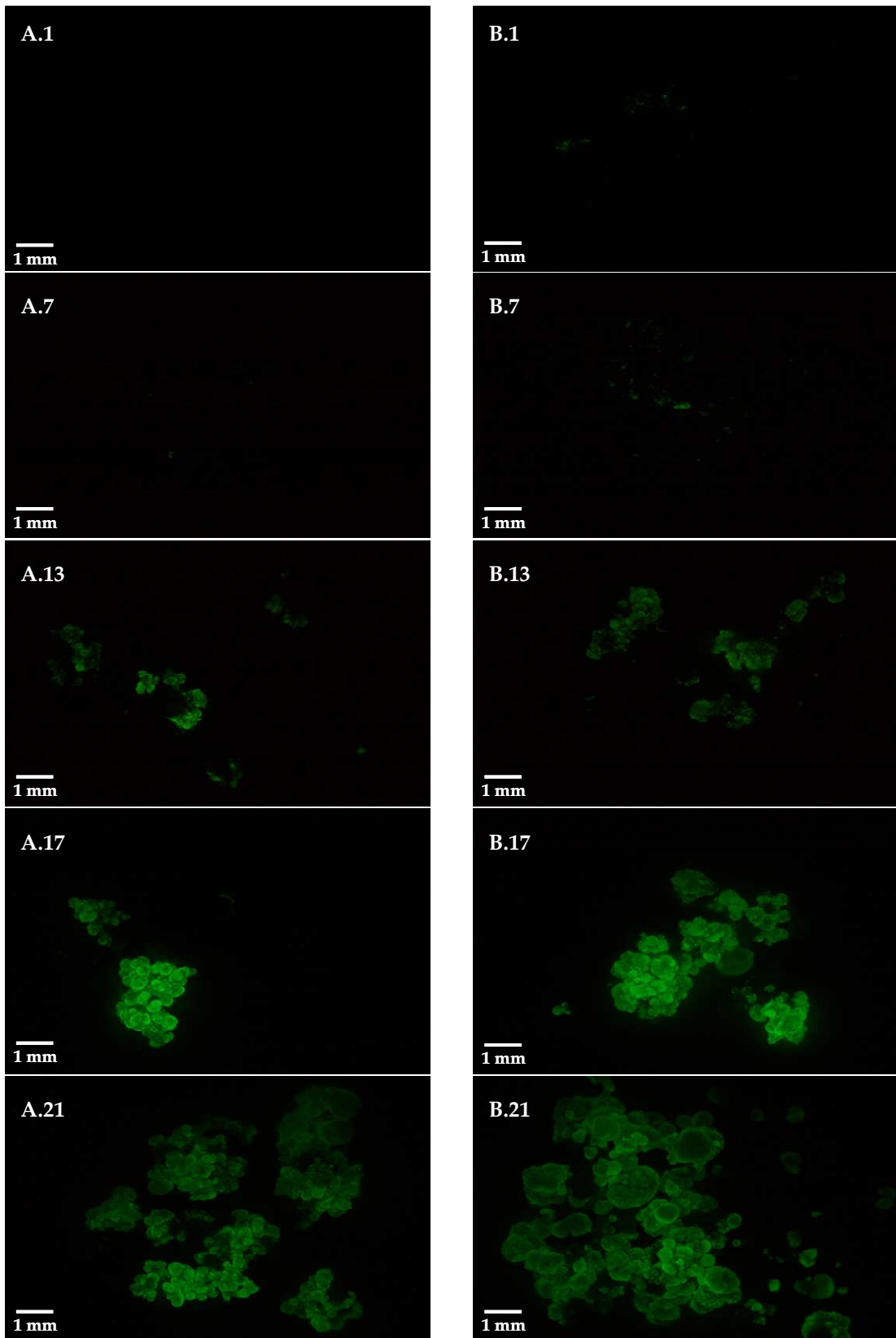


Figure 63. FDA vital staining of embryogenic samples of the lines (A) D1 and (B) D31 different lengths of time after cryopreservation following the droplet-vitrification method with 60 min exposure to PVS2. Numbers (1, 7, 13, 17 and 21) indicate the number of days after thawing.

Influence of the developmental stage of embryogenic tissue used as explant material for cryopreservation

Ten weeks after treatment, the developmental stage of the starting material did not have any significant influence on survival (data not shown) or recovery of unfrozen samples, treated or untreated (Table 12). However, among the frozen samples and considering untreated controls, 3-4 mm ES were found to have significantly poorer survival and recovery rates. Regarding minimum recovery, the combination of calli and small ES normally used for avocado cultures proliferation (PM) gave higher rates than the other explants in all types of samples, untreated (control), treated but not frozen (-LN) and cryopreserved (+LN) (Table 12). No significant decreases in minimum recovery were observed as a consequence of incubation with cryoprotective solutions or freezing in the different explants tested.

Table 12. Recovery and minimum recovery rates of different types of avocado embryogenic explants untreated (control), treated with cryopreservation solutions but not frozen (-LN) and cryopreserved (+LN). Assessment made five and ten weeks after treatment. Different letters within each column indicate significant differences by an RxC test of independence with a significance level of 0.05.

Explant	Treatment	Recovery (%)				Minimum recovery (%)			
		5 weeks		10 weeks		5 weeks		10 weeks	
PM	Control	100	a	100	a	100	a	100	a
	-LN	100	a	100	a	90	ab	90	ab
	+LN	88.89	a	88.89	ab	77.78	ab	77.78	ab
Calli	Control	88.89	a	100	a	55.56	b	55.56	b
	-LN	90	a	90	ab	50	b	50	b
	+LN	77.78	ab	88.89	ab	66.67	b	66.67	b
ES 1-2 mm	Control	100	a	100	a	44.44	b	44.44	b
	-LN	100	a	100	a	66.67	b	66.67	b
	+LN	80	ab	80	ab	70	b	70	b
ES 3-4 mm	Control	44.44	b	100	a	33.33	b	33.33	b
	-LN	90	a	90	ab	40	b	40	b
	+LN	40	b	55.56	b	30	b	30	b

Regrowth five weeks after culture initiation significantly differed in control non-treated samples as a function of the explant type (Fig. 64A). The best results were obtained with PM. Although this explant continued to be the most rapidly proliferating, five weeks later the differences were no longer significant (Fig. 64B).

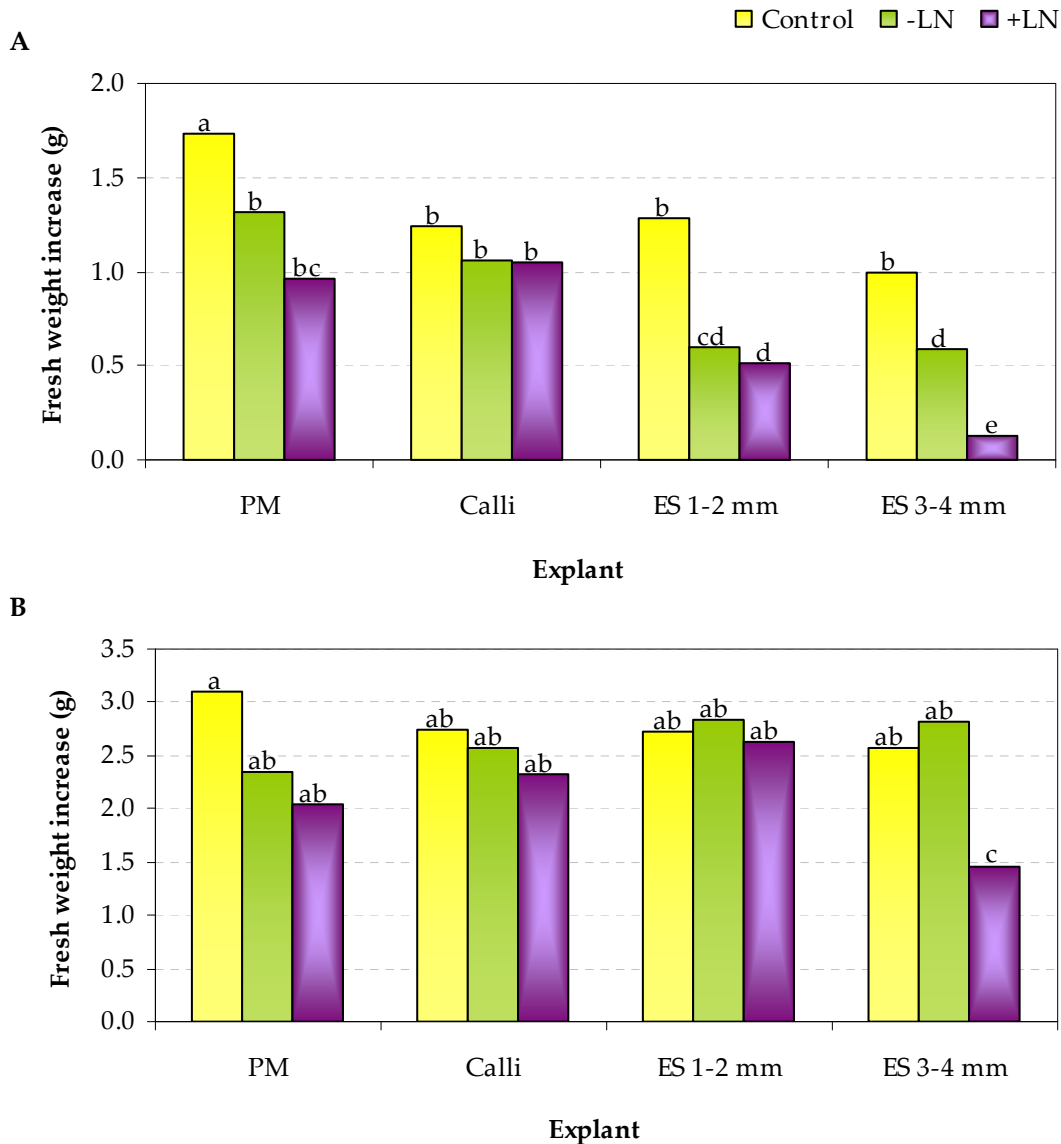


Figure 64. PF increase of different types of avocado embryogenic explants, untreated (control), treated with cryoprotective solutions but not frozen (-LN) and cryopreserved (+LN). Assessment made (A) five and (B) ten weeks after treatment. Different letters indicate significant differences by ANOVA with a significance level of 0.05.

As indicated by PF increase data (Fig. 64), sensitivity to cryoprotective solutions was dependent on the developmental stage of the explants, calli showing better tolerance to

these solutions than ES. However, the toxic effect of the solutions only retarded culture regrowth and ten weeks after treatment no significant differences could be observed between controls and -LN samples.

Comparing PF increases in -LN and +LN samples, cryoprotective solutions were seen to be effective in preventing freezing damage in all explants, except in 3-4 mm ES.

Differential vital staining was observed in the different embryogenic tissues used as cryopreservation explants (Fig. 65). Callus showed the highest staining intensity, while 3-4 mm ES appeared very faintly stained and staining intensity of 1-2 mm ES was intermediate.

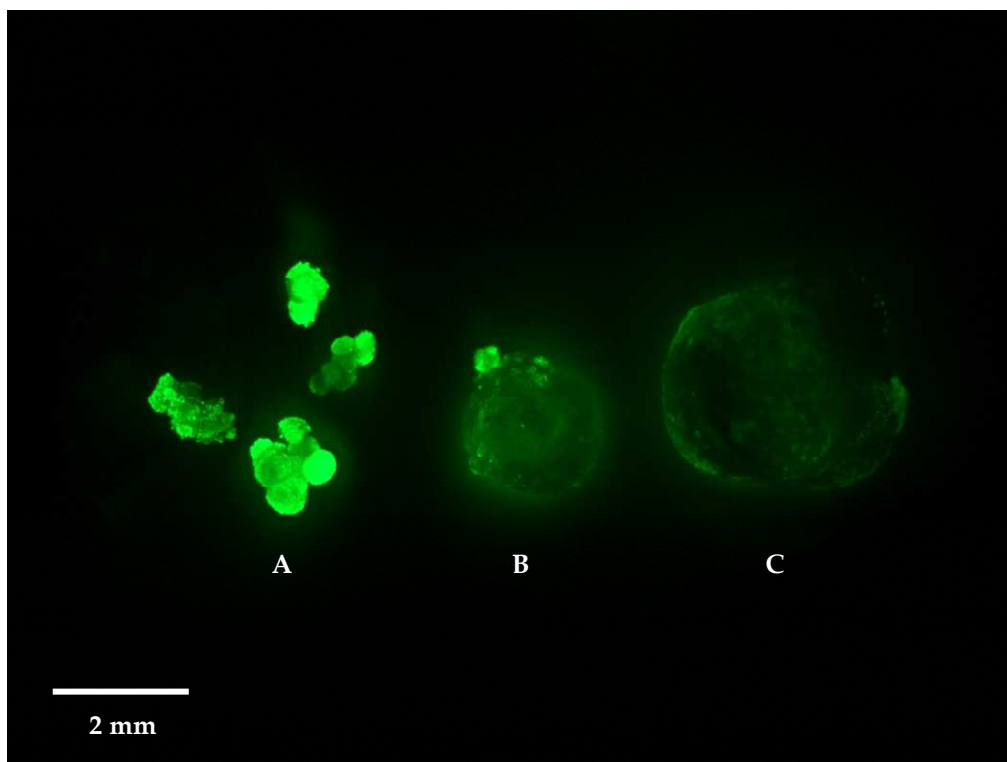


Figure 65. FDA vital staining of different types of embryogenic explants before any cryopreservation treatment: (A) calli, (B) ES 1-2 mm in length and (C) ES 3-4 mm in length.

Effect of the culture method and the culture growth phase

Growth curves of avocado embryogenic cultures in solid medium were plotted for PF (Fig. 66A), PS (Fig. 66B) and VCS (Fig. 66C).

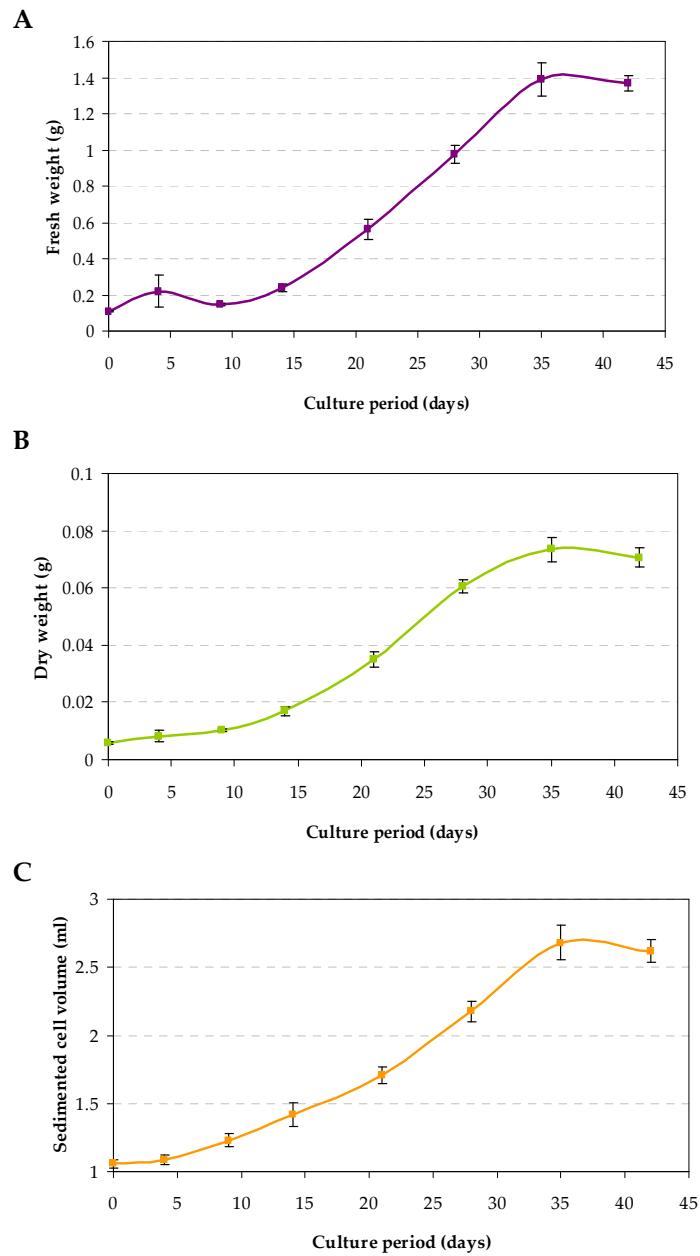


Figure 66. Growth of avocado embryogenic cultures in solid medium in terms of (A) PF, (B) PS and (C) VCS. Data represent mean \pm standard error.

Growth of cultures in liquid medium had been previously studied by Márquez-Martín (2007) and these data are represented in figure 67.

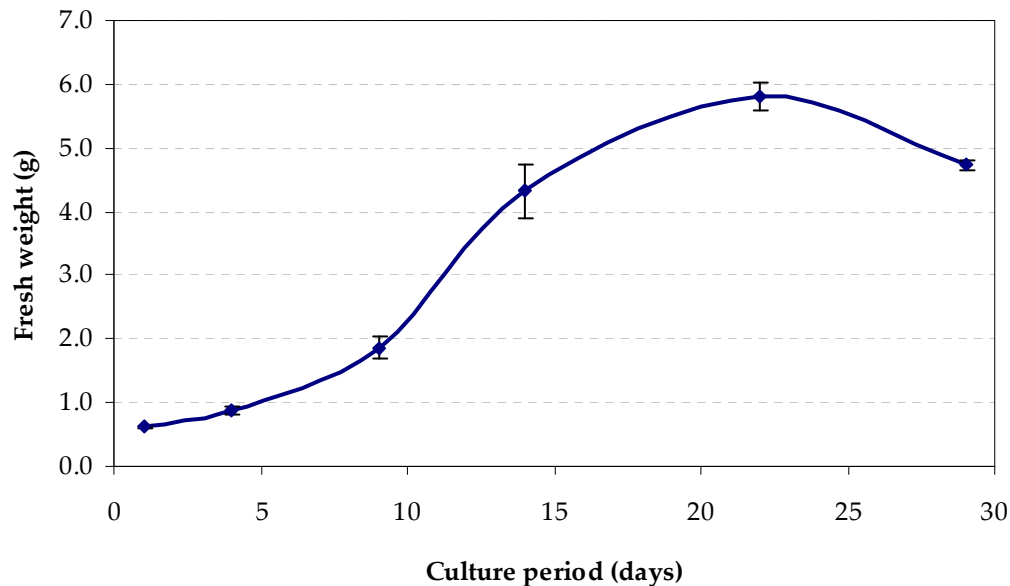


Figure 67. Growth curve (PF) of avocado embryogenic cultures in liquid medium. Data are expressed as mean \pm standard error (from Márquez-Martín 2007).

When culture growth on solid and liquid media was compared, it was observed that relative PF increase reached similar values (Fig. 68). However, cultures grew faster in liquid medium than on solid medium. As a consequence, a shorter lag phase and an earlier exponential phase was observed using liquid medium. These differences led to the establishment of the growth phases at different days depending on the culture method (Table 13).

To assess the effect of growth phase and culture method on cryopreservation of avocado embryogenic cultures, samples from days 0, 14, 21, and 28 were selected from those grown on solid medium, and samples from days 0, 9, 14 and 21 were harvested from liquid medium. These samples were then used as explants for cryopreservation experiments.

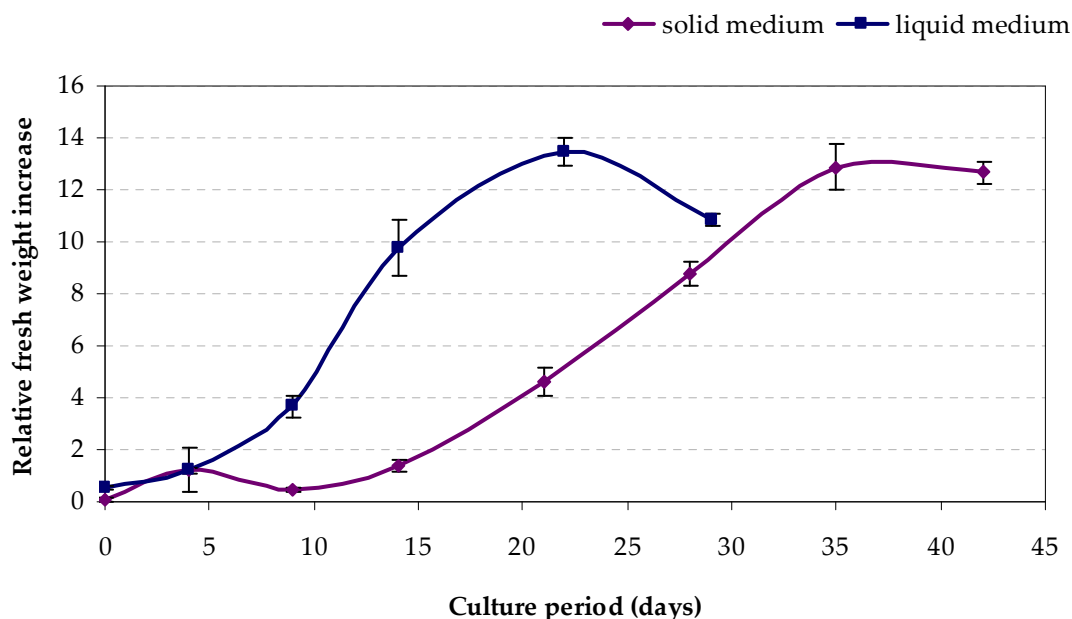


Figure 68. Growth curves of avocado embryonic cultures in liquid and solid proliferation medium. Data represent mean \pm standard error. Data for cultures in liquid medium taken from Márquez-Martín (2007).

Table 13. Growth phases of avocado embryonic cultures cultured on solid or in liquid proliferation medium. Growth phases in liquid medium based on data taken from Márquez-Martín (2007).

Growth phase	Time in culture (days)	
	Solid medium	Liquid medium
Lag	0-11	0-4
Exponential	12-34	5-17
Late exponential-stationary	35-42	18-29

The growth phase and the culture method were found to significantly affect survival (Table 14), recovery (data not shown) and minimum recovery (Fig. 69) of cryopreserved embryonic cultures. A significant interaction between growth phase and culture method was also observed for these variables. Notably, in the exponential phase, very different survival rates were obtained depending on the culture method (12.5% in solid medium versus 100% in liquid medium).

Culture response was rapid, as demonstrated by the fact that survival, recovery and minimum recovery data assessed five and ten weeks after treatment were the same. Survival and recovery data were almost identical.

Table 14. Survival percentages obtained when comparing different culture periods and methods in untreated (control), treated with cryoprotective solutions but not frozen (-LN) and cryopreserved (+LN) samples. Assessment made five weeks after treatment. Data recorded ten weeks after treatment were the same. Different letters within each column indicate significant differences by an RxC test of independence with a significance level of 0.05. ND: not determined.

Culture period	Survival (%)					
	Control		-LN		+LN	
	Solid	Liquid	Solid	Liquid	Solid	Liquid
0	100 a	100 a	100 a	100 a	90 a	90 a
9	ND	100 a	ND	100 a	ND	100 a
14	100 a	100 a	100 a	100 a	12.5 b	100 a
21	100 a	100 a	100 a	100 a	90 a	20 b
28	100 a	ND	100 a	ND	80 a	ND

Culture method had a significant impact on the embryogenic capacity of untreated cultures (controls). When culture was performed on solid medium very high minimum recovery rates (80-100%) were achieved in all culture periods, with the exception of samples harvested 14 days after the initiation of cultures, in which embryogenic capacity was significantly reduced to 35% (Fig. 69A). However, in liquid medium significantly lower minimum recovery rates were observed in all treatments compared to explants directly sampled from stock cultures (0 days) (Fig. 69B).

Tissues from both culture methods withstood cryoprotective solutions well, no significant decrease in survival (Table 14) or recovery rates (data not shown) being observed with the use of these solutions. Nevertheless, a significant decrease in minimum recovery was observed when samples cultured on solid medium were harvested 21 or 28 days after the last subculture (Fig. 69A). In contrast, the cryoprotective solutions did not have a significant effect on minimum recovery for culture in liquid medium (Fig. 69B).

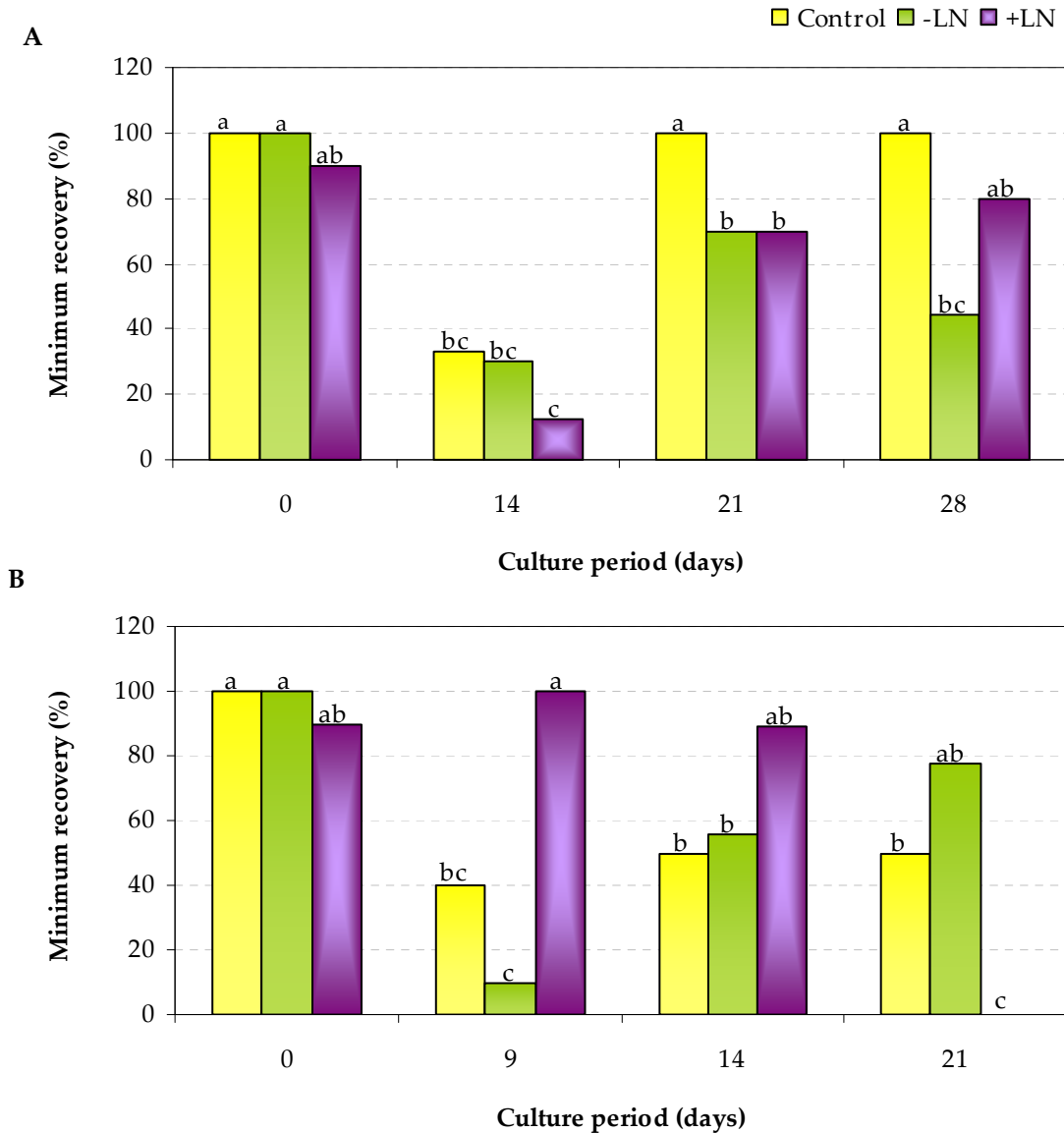


Figure 69. Minimum recovery rates obtained using explants harvested at different growth phases in (A) solid and (B) liquid medium in untreated (control), treated with cryoprotective solutions but not frozen (-LN) and cryopreserved (+LN) samples. Assessment made five weeks after treatment. Data recorded ten weeks after treatment were the same. Different letters indicate significant differences by an RxC test of independence with a significance level of 0.05.

Detrimental effects due to cryoprotective solutions were also observed when considering PF. Ten weeks after cryopreservation, all treated samples that had been previously cultured on solid medium presented lower PF increases than their non-treated counterparts. The only exception were explants sampled 14 and 28 days after culture initiation (Fig. 70A).

Cryoprotective solutions also had an adverse effect on regrowth of samples derived from embryogenic suspensions (Fig. 70B). Nevertheless, this effect was only evident five weeks after treatment and, five weeks later, significantly lower PF increases were only observed in explants directly sampled from the stock cultures (0 days).

Most samples withstood freezing in LN, that is, this process did not have any prejudicial effect on survival (Table 14) or recovery (data not shown). The only exceptions were samples from day 14 on solid medium and day 21 in liquid medium, in which much lower survival and recovery rates were observed after freezing. This drop in survival appears to be due to ice damage since no sensitivity to PVS2 dehydration was observed (all unfrozen treated samples (-LN) reached 100% survival).

In samples from the solid medium, embryogenic capacity was also not influenced by freezing, no decrease in minimum recovery being detected compared with treated unfrozen samples (Fig. 69A). In contrast, explants harvested after 21 days in liquid medium, showed a null rate of minimum recovery (Fig. 69B). This low value could, however, be a consequence of the low survival rate obtained in this treatment (12%).

The influence of freezing was evident in the regrowth of cultures derived from both solid and liquid media (Fig 70). Five weeks after freezing, cultures sampled from solid medium at 14, 21 or 28 days yielded significantly lower values than the corresponding unfrozen samples. However, explants selected at 0 days (i.e., harvested directly from stock cultures, 35 days after the last subculture) were not significantly influenced by freezing (Fig. 70A). These differences were maintained five weeks later: at this point, the regrowth of cultures sampled at 0 days reached similar values to those obtained in untreated unfrozen samples (control). The time in the liquid medium also influenced culture regrowth after freezing. The best results were obtained with samples harvested 9 days after suspension initiation. These samples not only produced the highest PF increase five weeks after freezing (1.2 g), but also the time required for cultures to regrow after cryopreservation fell from 21 to 10 days. Longer periods in liquid medium led to a significant reduction in culture regrowth and, in samples selected 21 days after initiation, a drastic decrease in PF increase was observed.

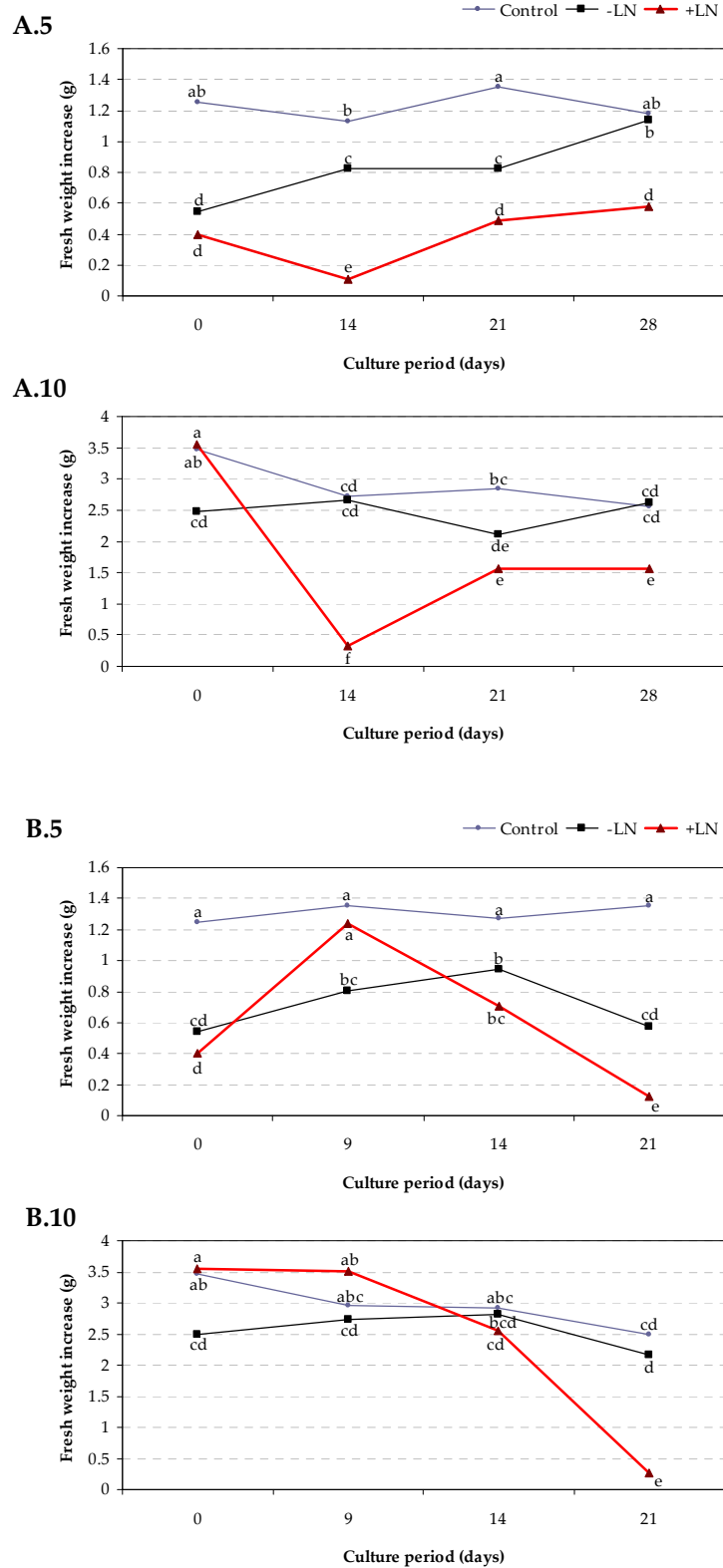


Figure 70. PF increase in (A) solid and (B) liquid medium in untreated (control), treated with cryoprotective solutions but not frozen (-LN) and cryopreserved (+LN) samples. Data recorded five and ten weeks after treatment. Different letters indicate significant differences by ANOVA with a significance level of 0.05.

Effect of sucrose preculture

Culture appearance significantly changed as a consequence of sucrose preculture (Fig. 71). While non-precultured tissues (day 0) exhibited a creamy-yellow colour, samples precultured for 3 or 7 days turned brownish. Longer sucrose preculture periods (14 or 21 days) resulted in an excessive oxidation and blackening of cultures and regrowth of whitish, non-embryogenic callus, that in the 21-day treatment was the predominant type of tissue.

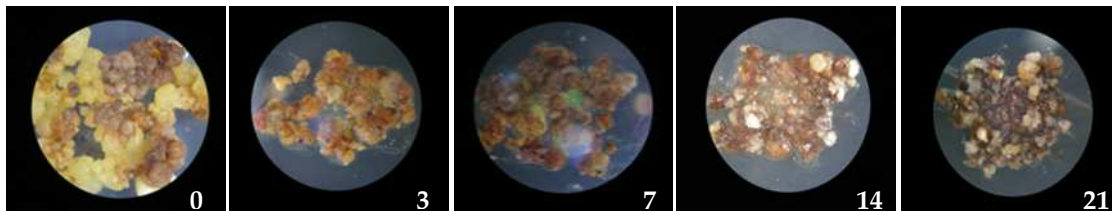


Figure 71. Appearance of avocado embryogenic cultures after sucrose preculture. Numbers indicate duration (days) of preculture.

Survival, recovery and minimum recovery assessed at five and at ten weeks after treatment were the same. Sucrose preculture did not have any significant influence on survival or recovery and high rates (75-100%) were achieved regardless the duration of the sucrose preculture (data not shown).

Nevertheless, avocado embryogenic cultures showed a high sensitivity to sucrose preculture in terms of minimum recovery (Fig. 72). Specifically, a significant decrease in this rate was observed in untreated controls that had been cultured in MSPA medium supplemented with 0.3 M sucrose. This effect was observed regardless the duration of sucrose preculture, although the lowest rate (12.5%) was obtained after 21 days of treatment.

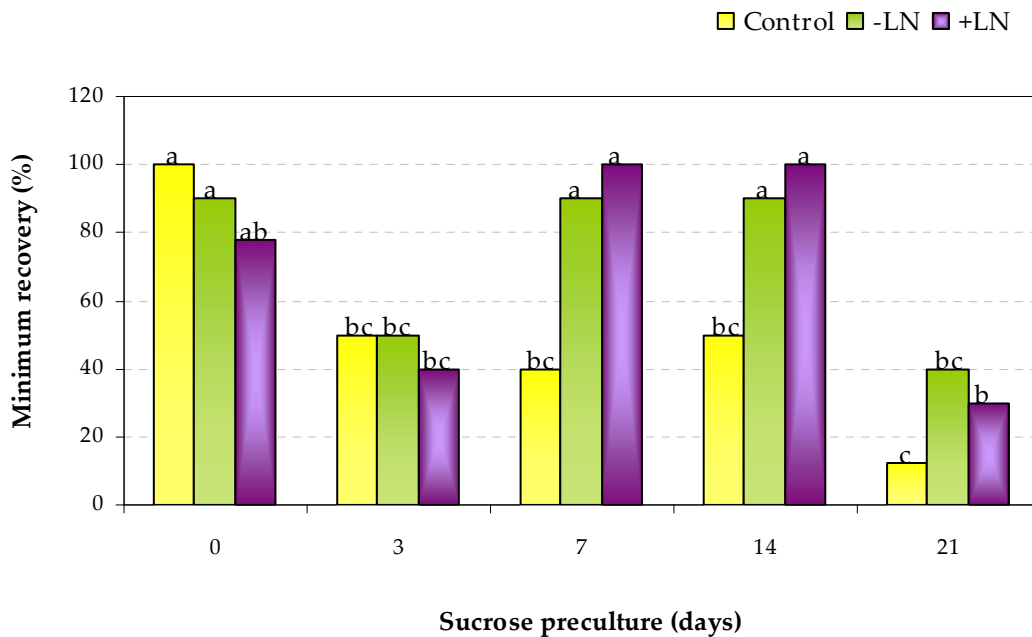


Figure 72. Minimum recovery rates obtained in different sucrose preculture periods in untreated (control), treated with cryoprotective solutions but not frozen (-LN) and cryopreserved (+LN) samples. Assessment made five weeks after treatment. Data recorded ten weeks after treatment were the same. Different letters indicate significant differences by an RxC test of independence with a significance level of 0.05%.

Cryoprotective solutions had no effect on survival or recovery (data not shown) while, on the other hand, they increased the embryogenic capacity in samples precultured for 7 and 14 days (Fig. 72). However, a negative effect of PVS2 incubation was revealed in the regrowth of samples five weeks after treatment (Fig. 73A). That is, regardless of the duration of sucrose preculture, all treated samples were found to have significantly lower PF increases than their untreated counterparts. Moreover, ten weeks after freezing, these differences were still evident in samples precultured for 0, 7 and 14 days (Fig. 73B).

Freezing itself had no prejudicial effects on survival, recovery (data not shown) or minimum recovery (Fig. 72). Indeed, the highest minimum recovery rate (100%) was achieved after freezing of samples that had been previously precultured for 7 or 14 days. The evidence of a positive influence of sucrose preculture was also revealed by PF increase data (Fig. 73). In general, sucrose preculture enhanced the proliferation of cryopreserved samples in the sense that, ten weeks after freezing, a positive relationship was observed between the duration of sucrose preculture and the PF increase of the cryopreserved samples (Fig. 73B). In tissues precultured for 7, 14 and 21 days no significant differences were found between control and

frozen samples. However, in cultures cryopreserved after 21 days in 0.3 M sucrose, most regrowth was non-embryogenic tissue.

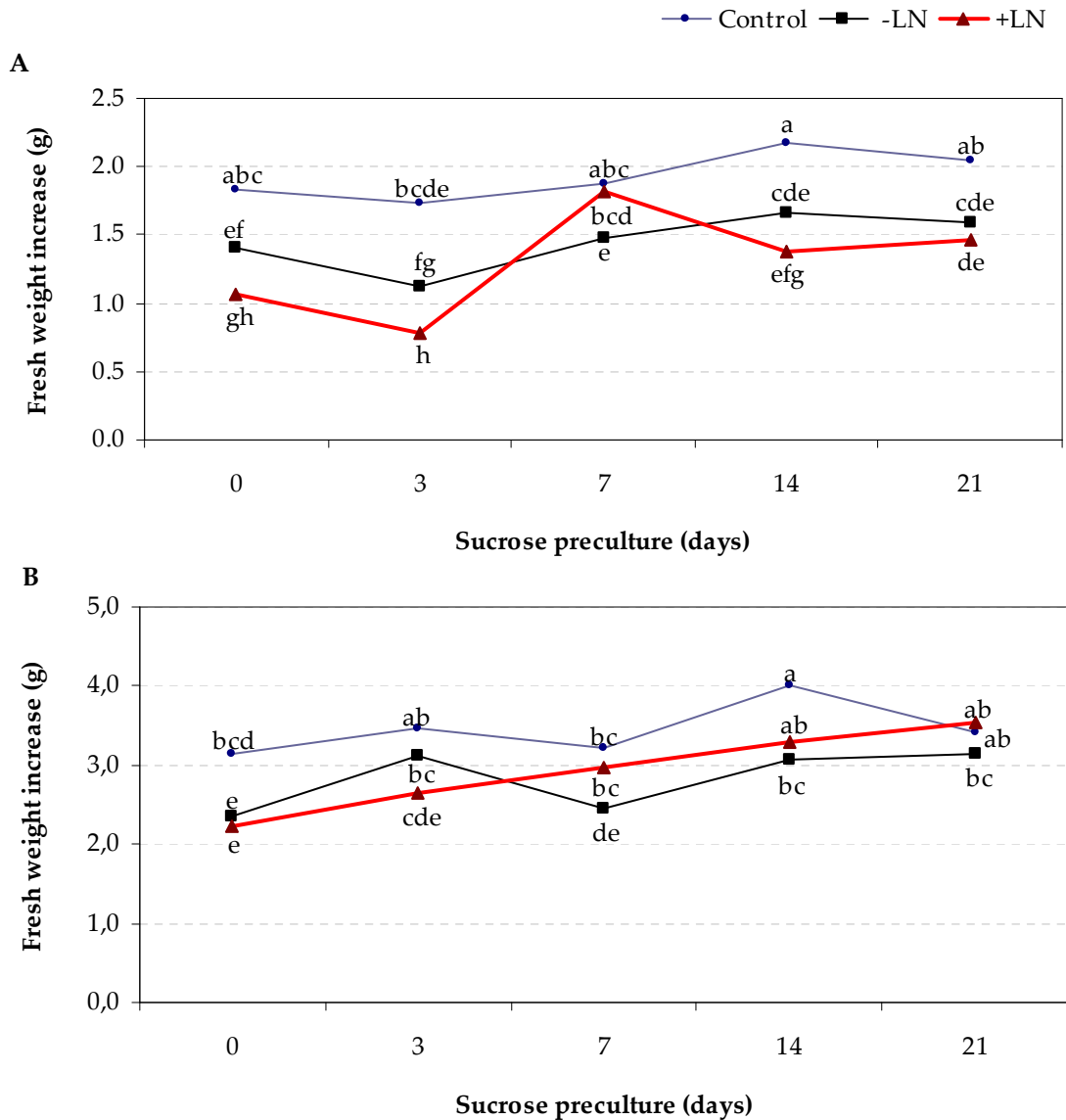


Figure 73. PF increases obtained in different sucrose preculture periods. Data assessed (A) five and (B) ten weeks after treatment in untreated (control), treated with cryoprotective solutions but not frozen (-LN) and cryopreserved (+LN) samples. Different letters indicate significant differences by ANOVA with a significance level of 0.05.

Sucrose preculture also had a significant influence on the initial response of cultures after cryopreservation. In explants precultured for 7 and 14 days, new proliferation was observed 16 days after thawing while in non-precultured tissues, there was no sign of growth (survival) until day 21.

INFLUENCE OF CRYOPRESERVATION ON SOMATIC EMBRYOGENESIS AND APPLICABILITY OF THE CRYOPRESERVATION PROTOCOL

Effect of cryopreservation on somatic embryogenesis

In this experiment, cultures that had been successfully cryopreserved were compared with control cultures in the different phases established in the somatic embryogenesis of avocado: proliferation of embryogenic cultures, development of ES and ES germination.

Despite similarities in the appearance of cryopreserved and control cultures (Fig. 74), proliferation of embryogenic cultures was negatively influenced by the cryopreservation performed five months earlier (Fig. 75), with significantly lower PF increases in cultures established from cryopreserved explants.

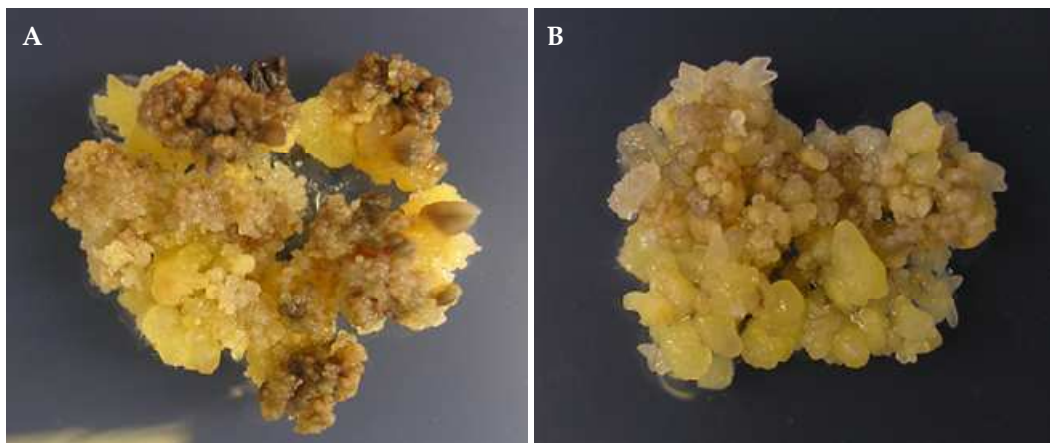


Figure 74. Appearance of (A) control and (B) cryopreserved embryogenic cultures of line D2.3 at the end of a proliferation cycle in MSPA medium.

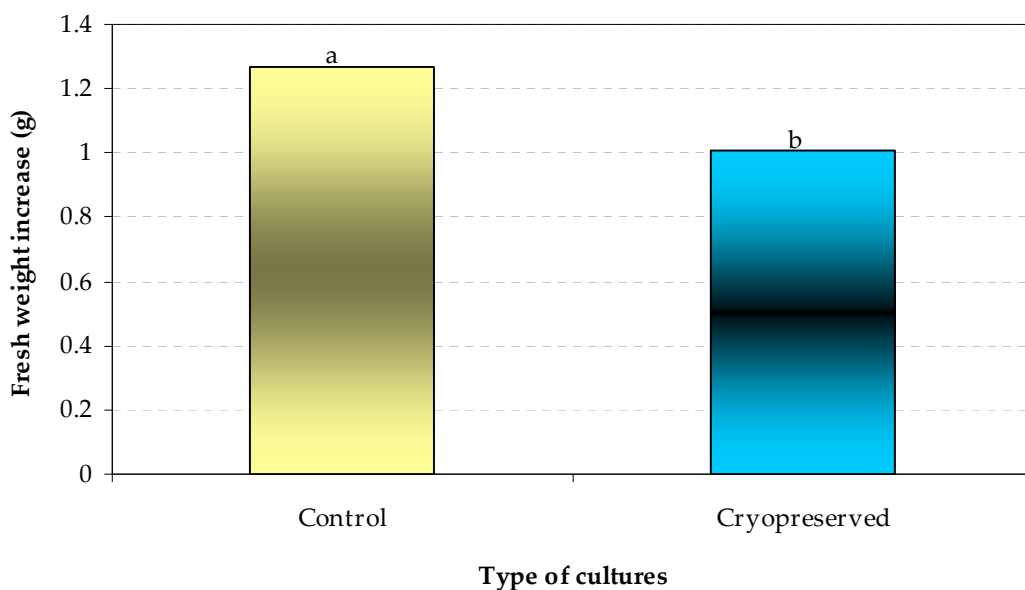


Figure 75. PF increase of control and cryopreserved avocado embryogenic cultures after a proliferation cycle in MSPA medium. Different letters indicate significant differences by ANOVA with a significance level of 0.05.

Development of ESBO was observed in both control and cryopreserved cultures (Fig. 76), but quantitative differences were identified. While no significant differences were observed considering small ESBO (1-3 mm), ESBO ≥ 4 mm were significantly less abundant in cryopreserved cultures (Fig. 77).

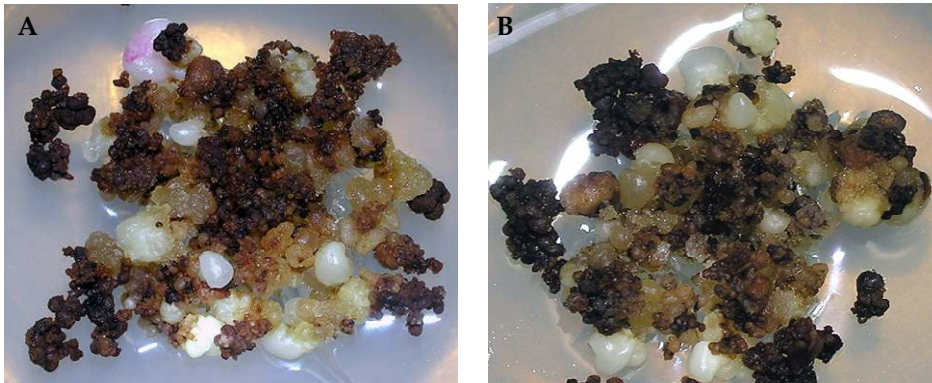


Figure 76. Development of ESBO in (A) control and (B) cryopreserved embryonic cultures after maturation in B5m10a.

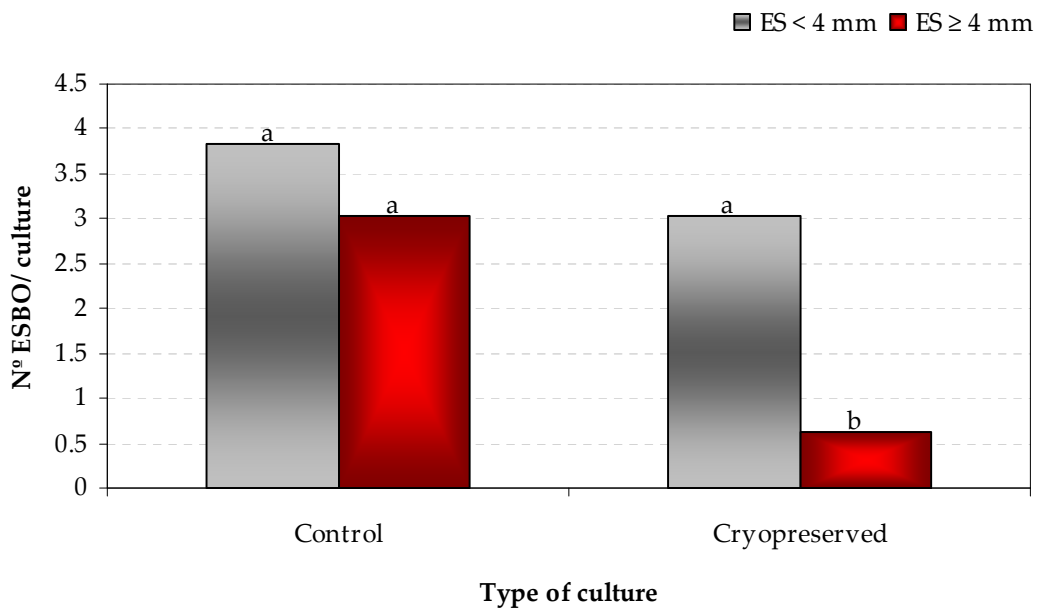


Figure 77. Development of ESBO from control and cryopreserved cultures. Data assessed after five weeks in maturation media. Different letters indicate significant differences by ANOVA with a significance level of 0.05.

Nevertheless, cryopreservation improved the germination capacity of the ES formed, with slightly higher germination percentages recorded in ESBO developed from cryopreserved cultures: 13.63% versus 5.88% obtained in ESBO formed from control non-cryopreserved

cultures. Only shoots were obtained in all cases and their appearance was similar. Likewise, the regeneration potential was slightly higher in cryopreserved cultures.

Applicability of the droplet-vitrification method for cryopreservation of avocado embryogenic cell lines

In general, culture morphology was very similar and, in the cell lines tested, no significant differences were observed between controls and cryopreserved cultures (Fig. 78). Nevertheless, in some cases embryogenic capacity seems to be improved in cryopreserved samples, in some of which ES regrew directly from the cryopreserved tissues (Fig. 79).

Survival, recovery and minimum recovery rates after cryopreservation were high in all the cell lines tested, ranging from 80 to 100%, with no significant differences by genotype.

PF increase of control and cryopreserved lines is represented in figure 80. Five weeks after cryopreservation, in all the embryogenic lines, cryopreserved samples gave significantly lower regrowth values than their respective controls. Five weeks later, differences between control and frozen samples were smaller, but significant differences still remained in most cases. Ah11 and D1 were the only embryogenic lines in which values obtained in control and frozen samples were not statistically different.

When data were grouped by cultivar, differential proliferation was also observed in both control and cryopreserved samples (Fig. 81). Nevertheless, the two cultivars displayed a similar behaviour.

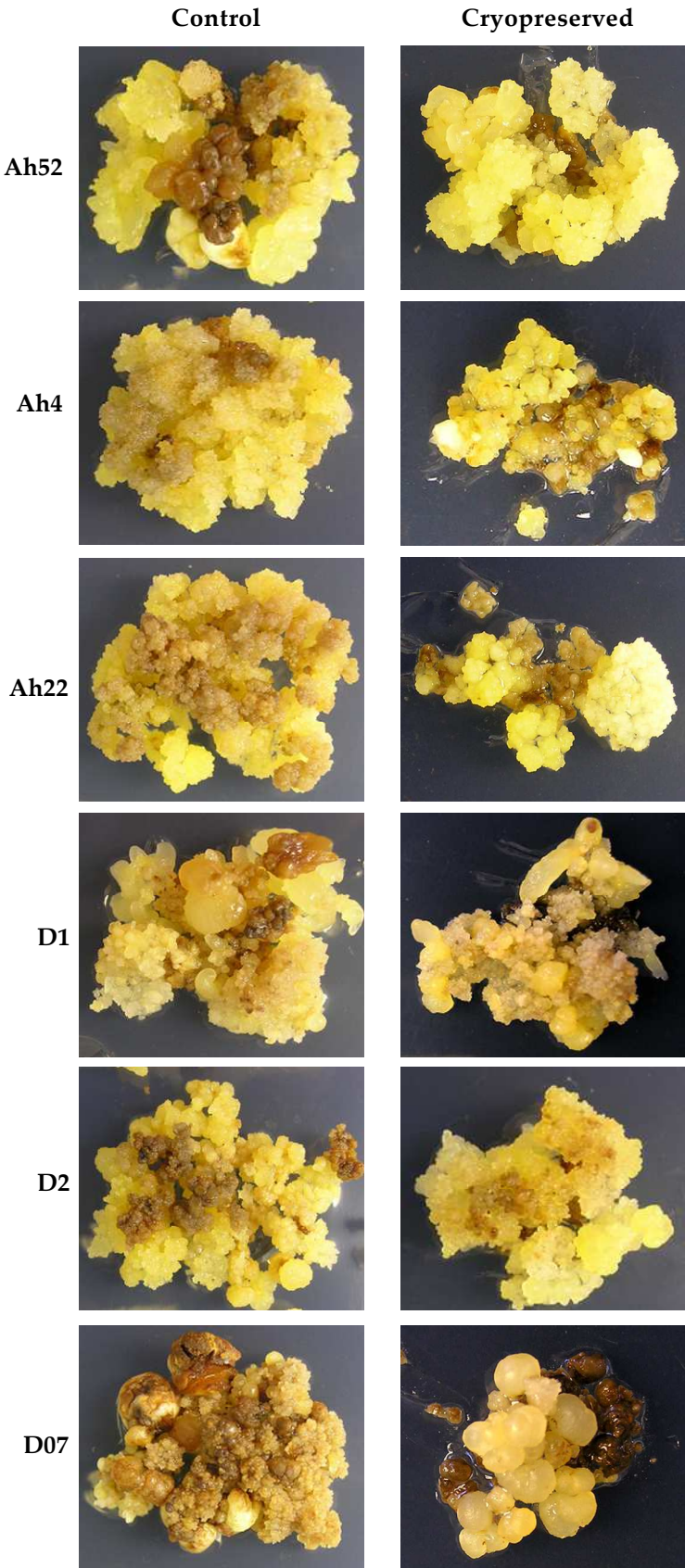


Figure 78. Control and cryopreserved avocado embryogenic cultures from six different cell lines after a proliferation cycle in MSPA medium.

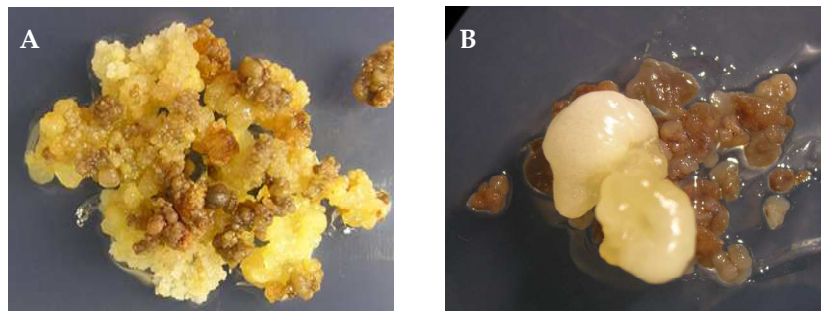


Figure 79. Appearance of (A) control and (B) frozen cultures from line D2.3 five weeks after cryopreservation.

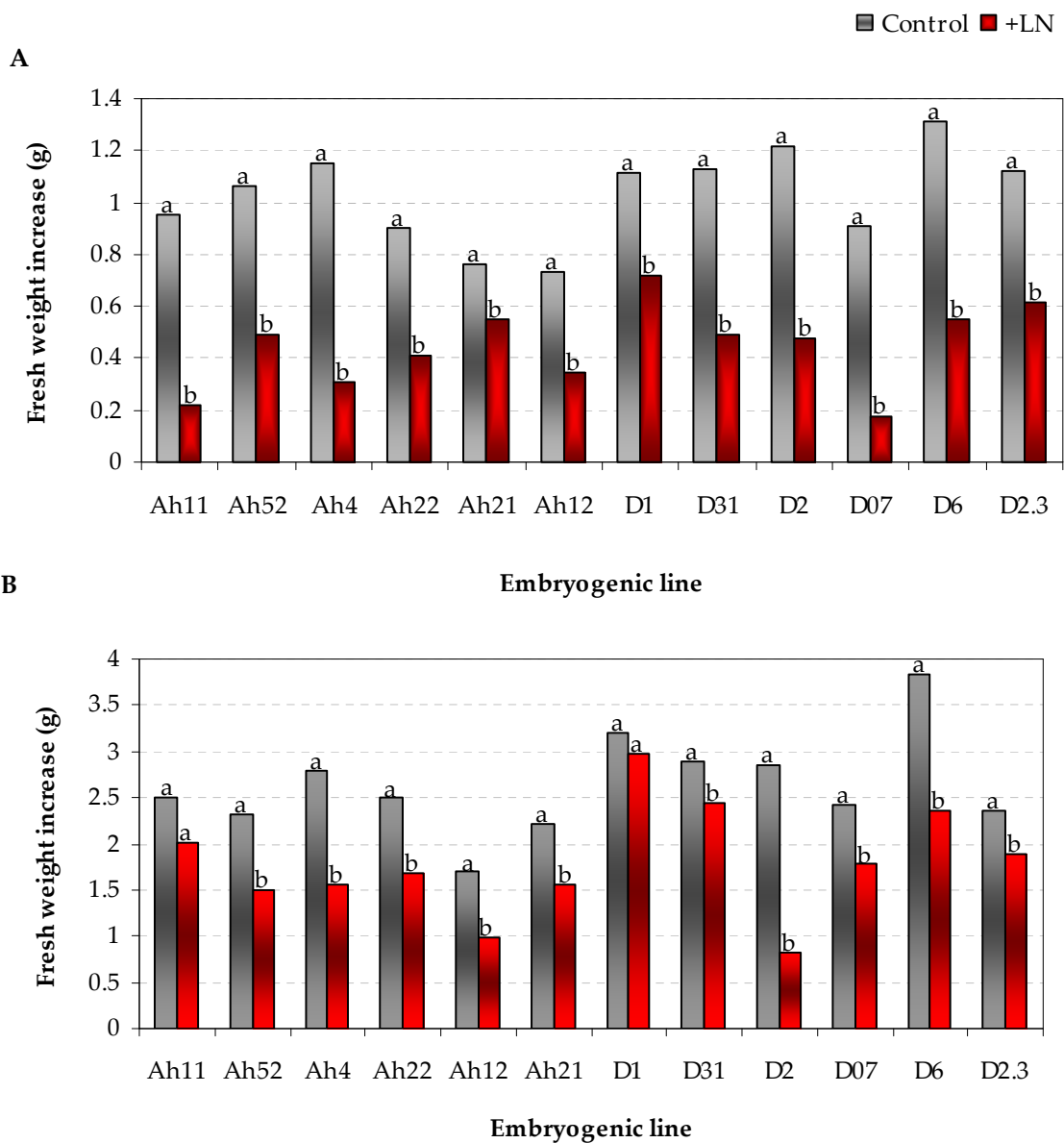


Figure 80. Applicability of the droplet-vitrification protocol to twelve avocado embryogenic lines. PF increase of control and cryopreserved cultures (A) five and (B) ten weeks after cryopreservation. Different letters indicate significant differences by ANOVA with a significance level of 0.05%.

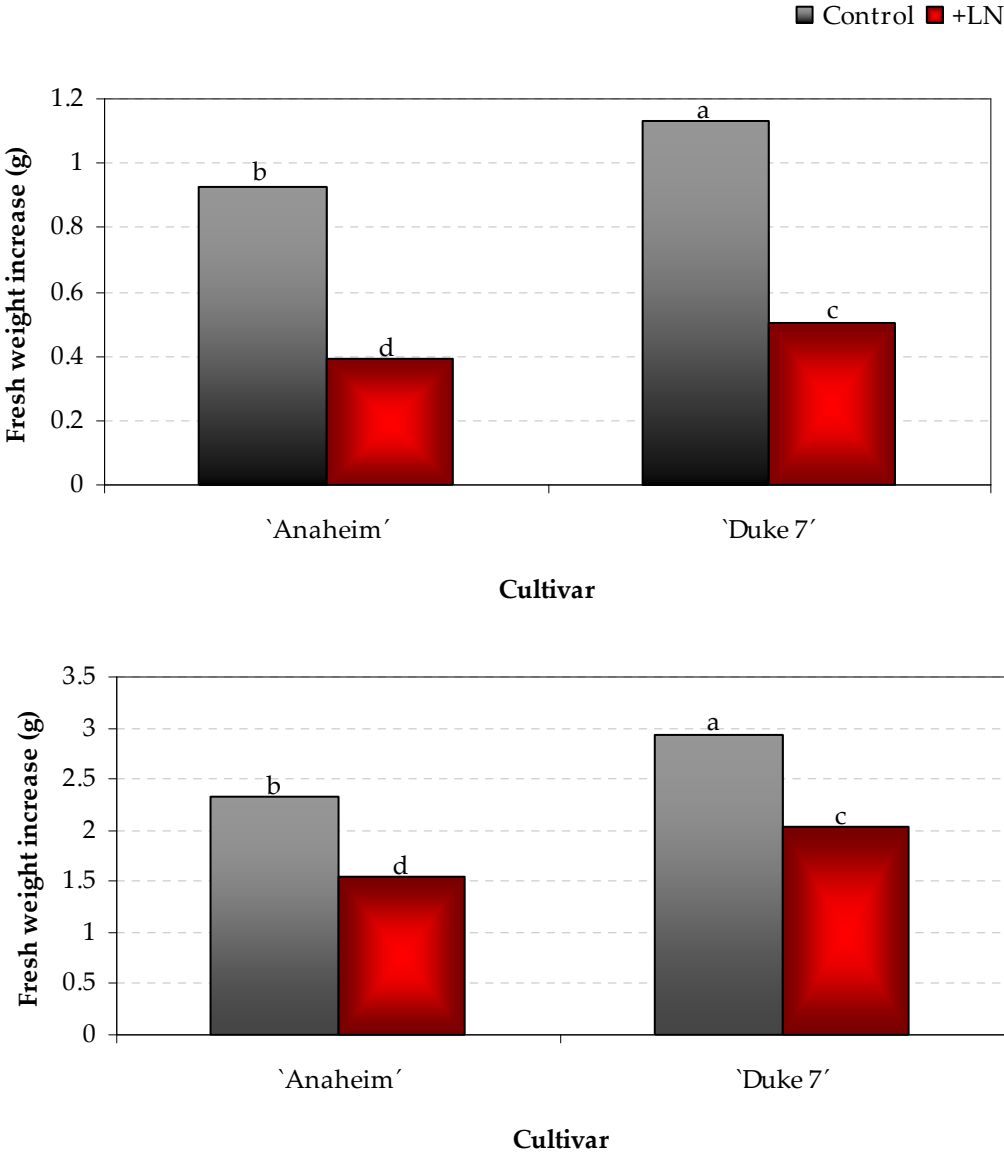


Figure 81. Applicability of the droplet-vitrification protocol to two avocado cultivars. PF increase of control and cryopreserved cultures (A) five and (B) ten weeks after cryopreservation. Different letters indicate significant differences by ANOVA with a significance level of 0.05.

DISCUSSION

CRYOPRESERVATION EXPERIMENTS

In the present investigation, the first application of the droplet-vitrification method to avocado embryogenic cultures is reported, and a controlled comparison of this method with other commonly used cryopreservation techniques is also presented.

Low recovery levels (33.33%) and a null rate of minimum recovery were recorded when samples from line D31 were cryopreserved following the SF procedure. These results demonstrate that this method is not suitable to cryopreserve avocado embryogenic cultures of this line and, consequently, this technique cannot be established as standard cryopreservation protocol for this species. On the contrary, both vitrification-based techniques (vial and droplet) could be proposed as candidate cryopreservation protocols for avocado since high recovery and minimum recovery rates (77.78-100%) were obtained and active regrowth of embryogenic material was observed in the cell lines tested. Although no significant differences in survival, recovery or minimum recovery were found between the two vitrification-based methods, slightly higher regrowth rates were obtained when the droplet-vitrification protocol was applied. Furthermore, results obtained with this method were more homogenous in the cell lines tested, an important issue when the aim is to establish a feasible and widely applicable protocol. As the cell lines used in these experiments were representative of the embryogenic cultures that can be obtained in this species, the results obtained are very promising with respect to other avocado lines.

These findings are consistent with previous research in olive embryogenic cultures (Sánchez-Romero et al. 2009) which showed that vitrification-based protocols gave significantly better results than the slow cooling technique. In contrast, Uchendu and Reed (2008) and Ozudogru et al. (2010) reported that slow cooling techniques provided better results than new vitrification procedures for *Mentha* spp. and *Fraxinus excelsior*, respectively.

The main differences between the cryopreservation procedures investigated stem from the physical mechanisms on which they are based. In classical cryopreservation techniques, freezing takes place in the presence of ice, while in the vitrification-based protocols ice formation is avoided (Gonzalez-Arno et al. 2008). Comparing the two vitrification procedures, the faster cooling and warming rates achieved are the main advantage of the droplet protocol over the classical vial method. The probability of

obtaining a vitrified state during freezing and avoiding devitrification during warming is increased due to the very small volume of cryopreservation medium in which explants are placed (Sakai and Engelmann 2007). Nevertheless, in agreement with results obtained in the present study, Sánchez-Romero et al. (2009) found no significant differences in either survival or recovery when comparing these vitrification-based protocols in olive embryogenic cultures. On the other hand, again in line with the present data, these authors noted higher regrowth rates using the droplet-vitrification method.

Overall, the present results reveal a significant interaction between genotype and cryopreservation protocol, similar to the findings of Uchendu and Reed (2008) testing different cryopreservation protocols in four varieties of *Mentha* spp. The avocado embryogenic lines studied withstood cryoprotective solutions used in the SF method equally well, but differential post-thawing survival and recovery rates were obtained when applying this cryopreservation method. These differences could be explained by different physiological conditions of tissues or genetic differences in cryotolerance (Salaj et al. 2007). Efendi (2003) also reported strong cultivar-related differences in survival of cryopreserved avocado cultures. Avocado embryogenic lines have diverse morphology and proliferation patterns (Guzmán-García et al. 2009; Márquez-Martín et al. in press; Witjaksono and Litz 1999a), and this could contribute to the different responses after cryopreservation. Embryogenic lines with characteristics similar to D1, mainly constituted by non-organized tissues in the form of friable calli and a few ES at early developmental stages, are usually cryopreserved using SF procedures (Engelmann 2004). In embryogenic tissues containing a variety of cell types, as is the case of line D31, composed mainly of ES at different developmental stages, freeze-induced dehydration from slow cooling is usually not sufficient to remove the homogeneous amount of intracellular water required to prevent subsequent intracellular ice-formation, and vitrification-based procedures are preferred (Gonzalez-Arno et al. 2008). What is more, the results obtained in the present study revealed that vitrification based-procedures were also effective for cryopreserving non-organized tissues and, consequently, they could be satisfactorily applied to both types of avocado cell lines.

As previously indicated, determining the optimum exposure time to PVS2 solution is a critical step in all vitrification procedures (Sakai and Engelmann 2007) as it is the key to achieving a balance between appropriate dehydration and chemical toxicity (Panis et al. 2005). A high tolerance to PVS2 in terms of survival and recovery was observed in avocado

embryogenic cultures, incubation periods of up to 120 min having little or no influence on these parameters. Similar results have been obtained in *Quercus* (Martínez et al. 2003) and taro (Sant et al. 2008), with 100% survival achieved after 120 min of incubation in PVS2. Nevertheless, a certain level of toxicity from LS and PVS2 solutions was noted in the current research. In particular, toxicity was seen with line D1 in which LS solution caused a significant decrease in minimum recovery. On the other hand, in this cell line, 120 min of incubation in PVS2 appeared to lead to the selection of embryogenic cells, enhancing minimum recovery up to rates similar to those obtained in the control samples. Several authors including Corredoira et al. (2004), Engelmann (2004) and Lardet et al. (2007) have reported results consistent with this observation and attributed them to a preferential preservation of active embryogenic cells during cryopreservation due to a selective destruction of non-embryogenic cells. These results are also in accordance with findings of Valladares et al. (2004) who proposed the stress caused by the application of PVS2 as the reason for the higher embryo productivity in uncooled treated explants of *Quercus suber*. As previously described by Sakai and Engelmann (2007), the subsequent freezing step in the vitrification protocol did not cause additional loss of embryogenic capacity beyond that produced during dehydration.

On the basis of the results obtained in this research, 60 min can be proposed as the optimum PVS2 incubation time for avocado embryogenic cultures as it is the balanced time point common for the cell lines tested.

The FDA test has been widely used in cryopreservation studies (Ford et al. 2000; Salaj et al. 2007) as an indicator of cell viability. In our study, FDA test results confirmed a differential behaviour of lines D1 and D31 related to initial response after cryopreservation following the droplet-vitrification method. Nevertheless, at the end of the monitoring process, FDA staining was very similar in both embryogenic lines, which is consistent with regrowth rates recorded five weeks after cryopreservation.

Previous studies in embryogenic cultures of *Fraxinus* (Ozudogru et al. 2010), *Citrus* (Pérez 2000) and *Pinus* (Laine et al. 1992) revealed that the developmental stage of embryogenic cultures could play an important role in the response obtained after cryopreservation. Therefore, selecting the developmental stage and size of the starting material is a determining factor in designing a successful cryopreservation protocol (Sakai and Engelmann 2007). The results obtained in the current research corroborated this statement, significantly worse recovery rates being obtained with 3-4 mm ES, the

embryogenic explant showing a higher degree of differentiation and, consequently, greater complexity. In contrast, Fang et al. (2004) and Iida et al. (1992) reported that ES at an advanced developmental stage were less sensitive to water loss and hence selected these embryos as explant material for cryopreservation.

In avocado, PM was the explant that gave the best results after cooling, higher minimum recovery rates being obtained compared with the other starting materials tested. This type of explant, a combination of rapidly growing calli and ES at early developmental stages, has important characteristic features: small size, a rapid response and high proliferation rates. Pérez (2000) reported in *Citrus* that small and rapidly growing cells survived better after cryopreservation than larger cells. A negative correlation between post-thawing regeneration and explant size was also observed in banana meristems and was attributed to inefficiency of heat exchange during cooling and thawing (Panis et al. 2005). The risk of ice formation also increases in larger explants due to the presence of more vacuolated and hydrated cells (Panis et al. 2005). In embryogenic cultures of *Quercus* it was also suggested that PVS2 solution desiccates smaller embryos at a different rate (Valladares et al. 2004) and it was proposed that different incubation times should be used depending on explant size. Provided similar size explants are compared, Valladares et al. (2004) agree with the aforementioned authors that more histodifferentiated explants are more difficult to cryopreserve.

FDA staining confirmed the existence of important differences among the starting material tested for cryopreservation experiments. The proportion of viable cells was significantly higher in calli than in ES at the different developmental stages studied. Nevertheless, FDA staining performed before cryopreservation was not found to be directly correlated with culture recovery after cryopreservation.

The culture method, the growth phase and the interaction between these factors significantly influenced survival of avocado embryogenic cultures after cryopreservation. Hence, when embryogenic cultures were selected at the same growth phase, different survival rates were obtained depending on the culture method used. Differences were also observed in relation to minimum recovery, while in solid medium the best results were achieved with cultures at the late-exponential or stationary phase (day 0), in liquid medium, cultures at the early exponential phase (9 days) gave the higher rates.

The culture method was also found to influence cryopreservation in embryogenic cultures of mango (Wu et al. 2007). These authors showed that higher survival rates were

achieved with explants cultured in liquid medium than with those cultured on solid medium. Dedifferentiated plant cell lines are either cultivated as callus cultures on solid medium or as suspension cultures in liquid medium, and it is possible to shift from one to the other cultivation method (Heine-Dobbernack et al. 2008). The higher degree of homogeneity may be the reason why suspensions in general perform better in cryopreservation experiments than callus (Heine-Dobbernack et al. 2008).

Previous studies carried out in bromegrass (Ishikawa et al. 2006) and mango cultures (Wu et al. 2007) also identified an effect of the growth phase at the time of sampling on survival after cryopreservation. The proportion of different stages of ES in embryogenic cultures of *Pinus nigra* changed during the culture period and the largest numbers of advanced stage embryos were observed in the stationary growth phase (Jasik et al. 1995). Consequently, the developmental stage of the material used as cryopreservation explants could be one of the most important factors determining the effect of the culture phase on cryopreservation.

The results of the present research indicate that the early exponential phase is the optimal growth phase to collect avocado embryogenic cultures for cryopreservation when culture is performed in liquid medium. This finding is in agreement with previous observations made for Sakai and Larcher (1987) and Levitt (1980) who suggested cultures at the late lag or early exponential phase as the best explants for cryopreservation experiments. Since then, most studies have been carried out with cells at the early exponential phase (Luo and Widholm 1997; Moran et al. 1999; Panis et al. 1990). Wu et al. (2007) also demonstrated that in liquid medium the highest survival rates were observed when embryogenic cultures were collected during their exponential phase. Histological observations carried out by these authors revealed that cells at this stage presented specific characteristics such as a dense cytoplasm, large amounts of storage products and synchronization of cell growth and development. Nevertheless, it should also be noted that, in contrast to the general view, there are also studies in which cultures harvested at the stationary phase had the highest cryotolerance and survival (Find et al. 1998b; Ishikawa et al. 2006).

On the other hand, when avocado embryogenic cultures were cultured on solid medium, the best results were obtained with explants sampled at the late exponential or stationary phase and a significant decrease in survival after freezing was observed in samples harvested in the exponential phase. In avocado stock cultures, several days after

subculturing, embryogenic tissues turned brownish, probably due to the oxidation of polyphenols. As previously reported for banana apical meristems, polyphenol oxidation may form an impenetrable shield around the tissue, thus preventing the penetration of the PVS2 cryoprotective solution (Panis et al. 2005).

To our knowledge, there are no previous studies in which the evaluation of the growth phase of cultures before cryopreservation has been conducted using solid media.

On the basis of the results obtained, it is important to remark that the growth phase must be considered for each cell culture and each culture method. In our research, despite obtaining similar results with cultures selected after 35 days on solid medium or after 9 days in liquid medium, embryogenic cultures from liquid medium could be proposed as the best explants for avocado cryopreservation. Specifically, using explants sampled after 9 days in liquid medium, survival, recovery and minimum recovery after cryopreservation were slightly higher than with explants from solid medium. Furthermore, the initial response of embryogenic cultures after freezing was faster. These advantages and the requirement of a shorter culture period, of special importance when the cryopreservation protocol needs to be applied to many samples, suggest that the liquid culture technique should be selected for use before cryopreservation of avocado embryogenic cultures. Interestingly, previous studies carried out by Márquez-Martín et al. (in press) in order to optimize maturation of ES in this species demonstrated that 9 days in liquid medium was the optimum treatment for inducing the subsequent development of mature ES.

Preculture of explants on medium supplemented with high sucrose concentration is often applied to improve post-thaw survival.

In the present study in avocado, sucrose preculture had no influence on culture survival after cryopreservation and rates of 75-100% were achieved in all treatments. The embryogenic cultures showed high tolerance to enriched sucrose media since long sucrose preculture periods, up to 21 days, did not lead to a decrease in survival. 'Troyer' citrange also showed high tolerance to sucrose preculture (Wang et al. 2002a) but other plant species, such as *Poncirus trifoliata*, are highly sensitive to these treatments (Gonzalez-Arno et al. 1998). These findings reflect differences among plant species in terms of their tolerance to high sucrose concentrations.

In avocado, one effect of the sucrose preculture was to bring forward the initial regrowth of the culture after cryopreservation. While signs of growth (survival) were usually observed 21 days after thawing, when sucrose preculture was performed for 7 or 14

days, regrowth was observed five days earlier. Furthermore, after cryopreservation, higher PF increases were obtained for longer durations of sucrose preculture. Thus, after freezing, growth of precultured samples was both faster and greater in magnitude than in non-treated explants.

On the other hand, Fang et al. (2004) noted that sucrose not used appropriately could have deleterious effects on embryo viability. In the present study, no direct negative influence of sucrose on survival was detected, but the embryogenic capacity of control cultures was negatively affected by high sucrose concentration. The best results were obtained when cultures were pretreated with sucrose for 7 or 14 days. With these conditions, the highest minimum recovery and proliferation rates were recorded after freezing. Shorter preculture periods, such as 3 days, appeared to be insufficient to allow metabolic changes associated with cryotolerance (Fang et al. 2004; Touchel et al. 2002) and longer periods may lead to high osmotic stress resulting in oxidation and blackening of the tissues.

Some studies have reported that the cryoprotective effect of sucrose lies in acclimation to PVS2 dehydration rather than to the freezing process itself (Panis et al. 1996; Sánchez-Romero et al. 2009). In the present research, however, this effect of sucrose pretreatment was not observed.

In general, the mode of action of sucrose preculture in enhancing freeze resistance is not completely known (Panis et al. 1996). One of the functions of sucrose is to provoke a slow reduction of moisture content due to osmosis and uptake of sugars, both decreasing the amount of freezable water (Panis et al. 2005). Moreover, disaccharides such as sucrose play an important role in the preservation of membrane integrity (Crowe et al. 1984) and stabilise proteins under freezing conditions (Kendall et al. 1993). Moreover, during sucrose preculture, tissues are subjected to mild osmotic stress, which induces responses that lead to increased dehydration tolerance, such as increased levels of ABA and LEA proteins (Reinhoud et al. 2000). Helliott et al. (2003) demonstrated that sucrose preculture of proliferating meristems in banana, which is required to mitigate the injurious effects of PVS2 dehydration, resulted in several ultrastructural changes such as fragmentation of vacuoles, differentiation of proplastids into amyloplasts and swelling of organelles.

Based on the results obtained, a 7- or 14-day sucrose preculture could be included as a preconditioning step in the cryopreservation of avocado embryogenic cultures via droplet-vitrification on aluminium foil strips. However, taking into account that, as previously reported

Martín et al. (2011), sucrose pretreatment could induce an osmotic stress that may be associated with DNA variation, the shorter preculture period, 7 days, could be considered the most appropriate in order to maintain the genetic stability of cryopreserved material.

INFLUENCE OF CRYOPRESERVATION ON SOMATIC EMBRYOGENESIS AND APPLICABILITY OF THE CRYOPRESERVATION PROTOCOL

In the present research, culture regrowth after thawing maintained embryogenic characteristics and, in some cases, the appearance of cultures was even better than in the corresponding unfrozen controls. However, when proliferation was assessed, a negative influence of cryopreservation was observed. Similarly, the subsequent development of ESBO ≥ 4 mm was negatively affected by the cryopreservation process.

Most studies have found that cryopreservation does not affect the embryogenic potential of calli or suspension cultures (Lardet et al. 2007; Marum et al. 2004). What is more, an increase in embryogenic capacity after cryopreservation has been reported in *Citrus deliciosa* (Aguilar et al. 1993), *Vitis vinifera* (Wang et al. 2002b), *Cyclamen persicum* (Winkelmann et al. 2004) and *Gentiana cruciata* (Mikula et al. 2011). In these studies, cryopreserved cultures regenerated more ES than unfrozen cultures. The reason why cryopreservation may result in higher regeneration rates is probably related to the preferential selection of embryogenic cells during freezing while non-embryogenic tissues are destroyed (Mathur et al. 2003; Winkelmann et al. 2004). Nevertheless, Mikula et al. (2011) noted that in all the studies where increase in embryogenic capacity was reported prefreezing treatments with high concentrations of sucrose had been used. These authors suggested that prefreezing and slow dehydration treatments are responsible for changes in embryogenic capacity (Mikula et al. 2011).

On the other hand, negative effects of cryopreservation on somatic embryogenesis have also been reported. In *Quercus robur*, the number of new ES developed was observed to be lower in frozen explants (Martínez et al. 2003) and, in *Pinus pinaster*, Marum et al. (2004) described a slightly lower production of mature embryos in one of the cell lines. Fang et al. (2004) also found a decrease in the germination capacity of cryopreserved ES of cocoa. Further, Lardet et al. (2007) suggested a possible transient loss of post-thaw regeneration competence after cryopreservation in two embryogenic lines of *Hevea brasiliensis*. These authors suggested that several post-thaw subcultures on maintenance medium might be a prerequisite for lines to recover regeneration competence (Lardet et al.

2007). In *Pinus nigra*, some cell lines also needed a longer period to achieve similar growth rates to control tissues (Salaj et al. 2011b). Accordingly, in avocado, recovering cultures for longer periods in maintenance medium after cryopreservation could be a possible way to achieve growth and regeneration rates similar to those obtained in unfrozen cultures in this species.

Although culture growth during maintenance and development of ESBO were negatively affected by the cryopreservation, both germination and regeneration potential were slightly higher in cryopreserved cultures. As the final aim of the somatic embryogenesis process is to obtain plants, it can be considered that this droplet-vitrification protocol could be effectively applied to avocado embryogenic cultures.

In addition, when this technique was applied to a broader range of embryogenic lines, all were successfully cryopreserved. Moreover, the rates of survival and recovery were high, ranging from 80 to 100%. The applicability of the cryopreservation protocol developed for the twelve embryogenic lines tested suggests that it is a feasible protocol for this species. These embryogenic lines, despite being derived from two cultivars, are the result of open-pollination, which may imply a greater genetic diversity in the lines successfully cryopreserved.

Wide applicability of a given cryopreservation method in different genotypes of the same species has been previously reported. For instance, in *Hevea brasiliensis*, Lardet et al. (2007) conducted a cryopreservation study with a large number of lines, in which 36 out of 39 independent cryopreserved callus lines showed post-thaw recovery. Similarly, in *Pinus pinaster* a single cryopreservation protocol allowed the successful recovery of 97% of the 33 lines stored in LN (Marum et al. 2004), while in *Pinus nigra*, following a slow-cooling procedure, 15 lines out of 20 were cryopreserved, although regrowth frequencies ranged from 10 to 100% (Salaj et al. 2011b).

In conclusion, the droplet-vitrification method on aluminium foil strips is a promising technique to be applied in avocado embryogenic cultures. Nevertheless, it has to be tested in a larger number of genotypes and further improvements are required in order to obtain cryopreserved cultures in which there are no significant differences with non-frozen tissues.

Conclusiones

A partir de este trabajo se han obtenido las siguientes conclusiones:

1. La utilización de una combinación de 2,4-D y TDZ mejoró significativamente la inducción de cultivos embriogénicos a partir de embriones zigóticos inmaduros.
2. El inóculo utilizado influyó de forma significativa tanto en el desarrollo de ESBO como en la posterior germinación de los mismos. Los valores de producción más elevados se obtuvieron cuando la fase de maduración se inició con 0,100 g de la fracción más pequeña (≤ 2 mm), aunque densidades de cultivo más bajas (0,025-0,050 g) favorecieron ligeramente el desarrollo de embriones somáticos de alta calidad (BO y ≥ 4 mm). Tasas de germinación significativamente más altas se obtuvieron en ES formados a partir de la fracción ≤ 2 mm. La germinación también se vio ligeramente favorecida cuando la fase maduración se inició con 0,050 g de inóculo. El uso de frascos como recipiente de cultivo supuso un aumento significativo en la producción de ESBO, aunque no afectó a la posterior capacidad de germinación de los mismos.
3. La luz mostró un papel fundamental en todas las etapas de la embriogénesis somática, obteniéndose los mejores resultados de inducción, proliferación y desarrollo de ESBO en condiciones de oscuridad. Las condiciones lumínicas durante la fase de mantenimiento afectaron a la posterior capacidad de los cultivos para dar lugar a ESBO en medio de desarrollo, obteniéndose valores de producción significativamente más elevados en cultivos que habían sido mantenidos en oscuridad.
4. Las líneas SE secretaron al medio de cultivo sustancias que adicionadas a las suspensiones embriogénicas aumentaron de forma significativa el posterior desarrollo de ESBO en este tipo de cultivos.
5. Los cultivos embriogénicos SE y PEM presentaron un patrón proteico diferencial. Proteínas relacionadas con la defensa al estrés oxidativo, como las HSP, GST y SOD, fueron significativamente más abundantes en las líneas SE, indicando una mayor sensibilidad al estrés producido por el cultivo *in vitro*. Los niveles de malato deshidrogenasa y glioxalasa I encontrados en mayor abundancia en las líneas tipo

PEM podrían revelar que el callo embriogénico de este tipo de cultivos se mantiene en proliferación en un estado de desarrollo menos avanzado que el de las SE.

6. Las líneas embriogénicas SE presentaron niveles más elevados de IAA. Sin embargo, el contenido de esta hormona no puede ser utilizado como marcador de la diferente capacidad morfogénica que presentan ambos tipos de cultivo.
7. La técnica de vitrificación en gota sobre papel de aluminio se mostró como la más adecuada para la crioconservación de cultivos embriogénicos de aguacate, estableciéndose en 60 min el periodo óptimo de incubación en PVS2. Este protocolo no afectó negativamente al rendimiento final de la embriogénesis somática en esta especie. Su aplicabilidad se demostró en 12 líneas embriogénicas pertenecientes a dos cultivares distintos y a cultivos tipo SE y PEM.
8. El grado de diferenciación del explanto utilizado influyó de forma significativa en la proliferación de los cultivos tras la congelación, siendo recomendable la utilización de explantos en estadios tempranos de desarrollo. Del mismo modo, el método de cultivo (en medio líquido o sólido) determinó la fase de crecimiento en la que debían ser seleccionados los explantos.
9. El precultivo durante 7 ó 14 días en medio con alta concentración de sacarosa adelantó la respuesta de los cultivos y aumentó su proliferación tras la congelación.

References

- Abeles FB, Morgan PW, Saltveit ME (Jr) (1992) Ethylene in plant biology. Academic Press, New York
- Adams CA, Rinne RW (1980) Moisture content as a controlling factor in seed development and germination. *Int Rev Cit* 68:1-8
- Aguilar ME, Engelmann F, Michaux-Ferriere N (1993) Cryopreservation of cell suspensions of *Citrus deliciosa* Tan. An histological study. *CryoLett* 14:217-228
- Ahmed EM, Barmore CR (1980) Avocado. In: Nagy S, Shaw PE (eds) Tropical and subtropical fruits: composition, properties and uses. AVI, Connecticut, pp 121-156
- Ahmed MF, Kantharajah AS, Holford P (1998) *In vitro* regeneration of avocado (*Persea americana* Mill.) and transient gene expression. *Acta Hort* 461:339-347
- Ammirato PV (1987) Organizational events during somatic embryogenesis. In: Green CE et al. (eds) Plant biology, plant tissue and cell culture, vol 3. Alan R Liss Inc, New York, pp 57-81
- Ammirato PV, Styer DJ (1985) Strategies for large-scale manipulation of somatic embryos in suspension culture. In: Zaitlin M, Day P, Hollaender A (eds) Biotechnology in plant science. Academic Press, London, pp 161-178
- Andrade GM, Merkle SA (2005) Enhancement of American chestnut somatic seedling production. *Plant Cell Rep* 24:326-334
- Andrade-Hoyos P, De León C, Alvarado-Rosales D, García-Espinosa R, López-Jiménez A, Molina-Gayosso E (2011) Rootstock selection of avocado (*Persea americana*) tolerant-resistant to *Phytophthora cinnamomi*. Proceedings of the VII Avocado World Congress, Australia, 5-9 September, 2011
- Aoshima Y (2005) Efficient embryogenesis in the callus of tea (*Camellia sinensis*) enhanced by the osmotic stress or antibiotics treatment. *Plant Biotechnol* 22:277-280
- Aronen TS, Krajiňáková J, Häggman HM, Ryyänen LA (1999) Genetic fidelity of cryopreserved embryogenic cultures of open-pollinated *Abies cephalonica*. *Plant Sci* 142:163-172
- Attree SM, Pomeroy MK, Fowke LC (1995) Development of white spruce (*Picea glauca* (Moench) Voss) somatic embryos during culture with abscisic acid and osmoticum, and their tolerance to drying and frozen storage. *J Exp Bot* 46:433-439
- Babiychuk E, Kushnir S, Belles-Boix M, Van Montagu M, Inze D (1995) *Arabidopsis thaliana* NADPH oxidoreductase homologs confer tolerance of yeasts toward the thiol-oxidizing drug diamide. *J Biol Chem* 270:26224-26231
- Baek HJ, Kim HH, Cho EG, Chae YA, Engelmann F (2003) Important of explant size and origin and of preconditioning treatments for cryopreservation of garlic shoot apices by vitrification. *CryoLett* 24:381-388
- Bajaj YPS (1995) Somatic embryogenesis and its applications for crop improvement. In: Bajaj YPS (ed) Biotechnology in agriculture and forestry. Somatic embryogenesis and synthetic seed I, vol 30. Springer-Verlag, Berlin, pp 105-125
- Barceló-Muñoz A, Pliego-Alfaro F, Barea JM (1990) Micropropagación de aguacate (*Persea americana* Mill.) en fase juvenil. *Acta Hort* 1:503-506
- Barringer S, Mohamed-Yasseen Y, Splittstoesser WE (1996) *In vitro* multiplication and plantlet establishment of avocado. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 32:119-121
- Bateson JM, Grout BWW, Lane S (1987) The influence of container dimensions on the multiplication rate of regenerating plant cell cultures. In: Ducate et al. (eds) Belgian plant tissue culture group. Symposium Florizel, Arlaon, pp 275-277
- Becwar MR, Noland TL, Wann SR (1987) A method for quantification of the level of somatic embryogenic among Norway spruce callus lines. *Plant Cell Rep* 6:35-38
- Becwar MR, Noland TL, Wyckoff JL (1989) Maturation, germination and conversion of Norway spruce (*Picea abies* L.) somatic embryos to plants. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 25: 575-580

- Bellincampi D, Morpurgo G (1989) Evidence for the presence of a second conditioning factor in plant cell cultures. *Plant Sci* 65:125-130
- Belmonte MF, Tahir M, Schroeder D, Stasolla C (2007) Overexpression of *HBK3*, a class I KNOX homeobox gene, improves the development of Norway spruce (*Picea abies*) somatic embryos. *J Exp Bot* 58:2851-2861
- Benson EE (2000) Do free radicals have a role in plant tissue culture recalcitrance? *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 36:163-170
- Benson EE (2008a) Cryopreservation Theory. In: Reed BM (ed) *Plant cryopreservation: a practical guide*. Springer-Science, Business Media LLC.513, New York, pp 15-32
- Benson EE (2008b) Cryopreservation of Phytodiversity: A critical appraisal of theory and practice. *CR Rev Plant Sci* 27:141-219
- Benson EE, Lynch PT, Jones J (1992) Variation in free radical damage in rice cell suspensions with different embryogenic potentials. *Planta* 188:296-305
- Benson EE, Lynch PT, Jones J (1995) The use of the iron chelating agent desferrioxamine in rice cell cryopreservation: a novel approach for improving recovery. *Plant Sci* 110:249-258
- Ben-Amar A, Cobanov O, Boonrod K, Krczal G, Bouzid S, Ghorbel A, Reustle GM (2007) Efficient procedure for grapevine embryogenic suspension establishment and plant regeneration: role of conditioned medium for cell proliferation. *Plant Cell Rep* 26:1439-1447
- Ben-Ya'acov A, Michelson E (1995) Avocado rootstocks. *Hortic Rev* 17:381-429
- Bergh BO (1976) Endogenous growth regulators in leaves and tissue cultures of *Pennisetum purpureum* Schum. In: Simmonds NW (ed) *Evolution of crop plants*. Longman, London, pp 148-151
- Bergh BO (1986) *Persea americana*. In: Haveley AB (ed) *Handbook of flowering*. Vol 5. CRC Press, Boca Raton, Florida, pp 253-268
- Bergh BO, Ellstrand NC (1986) Taxonomy of the avocado. *Cal Avo Soc Yrb* 70: 135-145
- Bergh BO, Lahav E (1996) Avocados. In: Janick J, Moore JN (eds) *Fruit breeding. Tree and tropical fruits*, vol 1. John Wiley & Sons, Indiana, pp 113-166
- Beruto M, Beruto D, Debergh P (1999) Influence of agar on *in vitro* cultures: I. Physicochemical properties of agar and agar gelled media. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 35:86-93
- Bhaskaran S, Smith RH (1990) Regeneration in cereal tissue culture: a review. *Crop Sci* 30:1328-1337
- Bhatti MH, Percival T, Davey CDM, Henshaw GG, Blakesley D (1997) Cryopreservation of embryogenic tissue of a range of genotypes of sweet potato using an encapsulation protocol. *Plant Cell Rep* 16:802-806
- Bhojwani SS, Razdan MK (1996) Somatic embryogenesis. In: Elsevier Science BV (ed) *Plant tissue culture; theory and practice, a revised edition*. Amsterdam, pp 125-166
- Biddington NL (1992) The influence of ethylene in plant tissue culture. *Plant Growth Regul* 11:173-187
- Biswas MK, Islam R, Hossain M (2007) Somatic embryogenesis in strawberry (*Fragaria* spp.) through callus culture. *Plant Cell Tiss Org Cult* 90:49-54
- Bögre L, Calderini O, Binarova P, Mattauch M, Till S, Kiegerl S, Jonak C, Pollaschek C, Barker P, Huskisson NS, Hirt H, Heberle-Bors E (1999) A MAP kinase is activated late in plant mitosis and becomes localized to the plane of cell division. *Plant Cell* 11:101-113
- Bomal C, Tremblay FM (1999) Effect of desiccation to low moisture content on germination, synchronization of root emergence, and plantlet regeneration of black spruce somatic embryos. *Plant Cell Tiss Org Cult* 56(3):193-200
- Boutilier K, Offringa R, Sharma VK (2002) Ectopic expression of BABY BOOM triggers a conversion from vegetative to embryonic growth. *Plant Cell* 14:1737-1749

- Bowler C, Montagu MV, Inze D (1992) Superoxide dismutase and stress tolerance. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 43:83-116
- Bozhkov PV, von Arnold S (1998) Polyethylene glycol promotes maturation but inhibits further development of *Picea abies* somatic embryos. *Physiol Plant* 104:211-224
- Bozhkov PV, Filonova LH, von Arnold S (2002) A key developmental switch during Norway spruce somatic embryogenesis is induced by withdrawal of growth regulators and is associated with cell death and extracellular acidification. *Biotechnol Bioeng* 77:658-667
- Bradford JK (1994) Water stress and the water relations of seed development: a critical review. *Crop Sci* 34:1-11
- Brittain-Loucas H, Bowley SR, McKersie BD (1998) Callus concentration regulates somatic embryo production in orchadgrass suspension cultures. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 34:281-284
- Buchheim JA, Colburn SM, Ranch JP (1989) Maturation of soybean somatic embryos and the transition to plantlet growth. *Plant Physiol* 89:768-775
- Burns JA, Wetzstein HY (1997) Development and characterization of embryogenic suspension cultures of pecan. *Plant Cell Tiss Org Cult* 48:93-102
- Cailloux F, Julien-Guerrier J, Linossier L, Coudret A (1996) Long-term somatic embryogenesis and maturation of somatic embryos in *Hevea brasiliensis*. *Plant Sci* 120:185-196
- CAP database (2010) Consejería Agricultura y Pesca (Junta de Andalucía)
- Carman JG (1988) Improved somatic embryogenesis in wheat and partial stimulation of the in-ovulo oxygen growth regulator and desiccation environments. *Planta* 175:417-424
- Carpentier S, Witters E, Laukens K, Deckers P, Swennen R, Panis B (2005) Preparation of protein extracts from recalcitrant plant tissues: An evaluation of different methods for two-dimensional gel electrophoresis analysis. *Proteomics* 5:2497-2507
- Carpentier S, Witters E, Laukens K, Van Onckelen H, Swennen R, Panis B. (2007) Banana (*Musa* spp.) as a model to study the meristem proteome: acclimation to osmotic stress. *Proteomics* 7:92-105
- Carpentier S, Swennen R, Panis B (2009) Plant protein sample preparation for 2DE. In: Walker JM (ed) *The protein protocols handbook*, 3rd ed. Humana Press, a Part of Springer Science, New York, pp 107-117
- Cassells AC, Curry RF (2001) Oxidative stress and physiological, epigenetic and genetic variability in plant tissue culture: implications for micropropagators and genetic engineers. *Plant Cell Tiss Org Cult* 64:145-157
- Casson SA, Lindsey K (2006) The turnip mutant of *Arabidopsis* reveals that LEAFY COTYLEDON 1 expression mediates the effects of auxin and sugars to promote embryonic cell identity. *Plant Physiol* 142:526-541
- Channuntapipat C, Sedgley M, Collins G (2003) Changes in methylation and structure DNA from almond tissues during *in vitro* culture and cryopreservation. *J Am Soc Hort Sci* 128:890-897
- Chapman A, Blervacq AS, Vasseur J, Hilbert JL (2000) Arabino-galactan proteins in *Cichorium* somatic embryogenesis: effect of beta-glucosyl Yariv reagent and epitope localization during embryo development. *Planta* 211:305-314
- Charoensub S, Phansiri A, Sakai A, Yongmanitchai W (1999) Cryopreservation of cassava *in vitro*-grown shoot tips cooled to -196°C. *CryoLett* 19:27-36
- Chen S, Harmon AC (2006) Advances in plant proteomics. *Proteomics* 6:5504-5516
- Cheong EJ, Pooler MR (2004) Factors affecting somatic embryogenesis in *Prunus incisa* cv. February Pink. *Plant Cell Rep* 22:810-815

- Choi YE, Yang DC, Park JC, Soh WY, Choi KT (1998) Regenerative ability of somatic single and multiple embryos from cotyledons of Korean ginseng on hormone-free medium. *Plant Cell Rep* 17:544-551
- Chung HH, Chen JT, Chang WC (2007) Plant regeneration through direct somatic embryogenesis from leaf explants of *Dendrobium*. *Biol Plant* 51:346-350
- Chung W, Pedersen H, Chin CK (1992) Enhanced somatic embryo production by conditioned media in cell suspension cultures of *Daucus carota*. *Biotechnol Lett* 14:837-840
- Colón-Carmona A, Chen DL, Yeh KC, Abel S (2000) Aux/IAA proteins are phosphorylated by phytochrome *in vitro*. *Plant Physiol* 124:1728-1738
- Condello E, Palombi MA, Tonelli MG, Damiano C, Caboni E (2009) Genetic stability of wild pear (*Pyrus pyraeaster*, Burgsd) after cryopreservation by encapsulation dehydration. *Agr Food Sci* 18:136-143
- Cooke TJ, Racusen RH, Cohen JD (1993) The role of auxin in plant embryogenesis. *Plant Cell* 5:1494-1495
- Corredoira E, San-José MC, Ballester A, Vieitez AM (2004) Cryopreservation of zygotic embryo axes and somatic embryos of European chestnut. *CryoLett* 24:33-42
- Corredoira E, San-José MC, Vieitez AM, Ballester A (2007) Improving genetic transformation of European chestnut and cryopreservation of transgenic lines. *Plant Cell Tiss Org Cult* 91:281-288
- Coutos-Thevenot P, Mäes O, Jouenne T, Mauro MC, Boulay M, Deloire A, Guern J (1992) Extracellular protein pattern of grapevine cell suspensions in embryogenic and non-embryogenic situations. *Plant Sci* 86:137-145
- Crowe HH, Crowe LM, Carpenter JF, Aurell-Winstrom C (1984) Stabilisation of dry phospholipid bilayers and proteins by sugars. *Plant Cell Rep* 12:89-94
- Cruz-Hernández A, Witjaksono, Litz RE, Gomez-Lim M (1998) *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of embryogenic avocado cultures and regeneration of somatic embryos. *Plant Cell Rep* 17:497-503
- Curaba J, Moritz T, Blervaque R, Parcy F, Raz V, Herzog M, Vachon G (2004) AtGA3ox2, a key gene responsible for bioactive gibberellin biosynthesis, is regulated during embryogenesis by LEAFY COTYLEDONS2 and FUS3 in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 136:3660-3669
- Cyr DR (2000) Cryopreservation: roles in clonal propagation and germplasm conservation of conifers. In: Engelmann F, Takagi H (eds) *Cryopreservation of tropical plant germplasm-current research progress and applications*. Tsukuba, JIRCAS, Rome, IPGRI, pp 250-254
- Cyr DR, Klimaszewska K (2002) Conifer somatic embryogenesis: II Applications. *Dendrobiol* 48:41-49
- Davies ME (1972) Polyphenol synthesis in cell suspension cultures of Paul's Scarlet Rose. *Planta* 104:50-65
- De Jong AJ, Hendriks T, Meijer EA, Penning M, Lo Schiavo F, Terzi M, Van Kammen A, De Vries SC (1995) Transient reduction in secreted 32 kD chitinase prevents somatic embryogenesis in the carrot (*Daucus carota* L.) variant ts11. *Devel Genet* 16:332-343
- De March G, Grenier E, Miannay N, Sulmont G, David H, David A (1993) Potential of somatic embryogenesis in *Prunus avium* immature zygotic embryos. *Plant Cell Tiss Org Cult* 34:209-215
- De Verno LL, Park YS, Bonga JM, Barret JD (1999) Somaclonal variation in cryopreserved embryogenic clones of white spruce (*Picea glauca* Moench Voss.) *Plant Cell Rep* 18:948-953
- De Vries SC, Booij H, Janssens R, Vogels R, Saris L, LoSchiavo F, Terzi M, van Kammen A (1988a) Carrot somatic embryogenesis depends on the phytohormone-controlled expression of correctly glycosylated extracellular proteins. *Genes Dev* 2:462-476

- De Vries SC, Booij H, Meyerink P, Huisman G, Wilde HD, Thomas TL, van Kammen A (1988b) Acquisition of embryogenic potential in carrot cell suspension cultures. *Planta* 176:205-211
- Denchev PD, Kuklin AI, Seragg AH (1992) Somatic embryo production in bioreactors. *J Biotechnol* 26:99-109
- Deng MD, Cornu D (1992) Maturation and germination of walnut somatic embryos. *Plant Cell Tiss Org Cult* 28:195-202
- Dereuddre J, Fabre J, Bassaglia C (1988) Resistance to freezing in liquid nitrogen of carnation (*Dianthus caryophyllus* L. var. Eolo) apical and axillary shoot tips excised from different aged *in vitro* plantlets. *Plant Cell Rep* 7:170-173
- Devlin PF, Yanovsky MJ, Kay SA (2003) A genomic analysis of the shade avoidance response in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 133:1617-1629
- Dodeman VL, Ducreux G, Kreis M (1997) Zygotic embryogenesis versus somatic embryogenesis. *J Exp Bot* 48:1493-1509
- Dong JZ, Dunstan DI (1996) Characterization of three heat-shock-protein genes and their developmental regulation during somatic embryogenesis in white spruce. *Planta* 200:85-91
- Dong JZ, Dunstan DI (1997) Endochitinase and β -1,3 glucanase genes are developmentally regulated during somatic embryogenesis in *Picea glauca*. *Planta* 201:189-194
- Dong JZ, Dunstan DI (2000) Molecular biology of somatic embryogenesis in conifers. In: Jain SM, Minocha SC (eds) *Molecular biology of woody plants*, vol 1. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp 52-87
- Donnoli R, Sunseri F, Martelli G, Greco I (2001) Somatic embryogenesis, plant regeneration and genetic transformation in *Fragaria* spp. *Acta Hort* 560:235-240
- D'Onofrio C, Morini S, Bellocchi (1998) Effect of light quality on somatic embryogenesis of quince leaves. *Plant Cell Tiss Org Cult* 53:91-98
- Dubois T, Guedira M, Dubois J, Vasseur J (1990) Direct somatic embryogenesis in roots of *Cichorium*: is callose an early marker? *Ann Bot* 65:539-545
- Dudits D, Bögre L, Györgyey J (1991) Molecular and cellular approaches to the analysis of plant embryo development from somatic cells *in vitro*. *J Cell Sci* 99:475-484
- Dumet D, Engelmann F, Chabrillange N, Duval Y, Dereuddre J (1993) Importance of sucrose for the acquisition of tolerance to desiccation and cryopreservation of oil palm somatic embryos. *CryoLett* 14:243-250
- Duran-Vila N (1995) Cryopreservation of germplasm of Citrus. In: Bajaj YPS (ed) *Biotechnology in agriculture and forestry, cryopreservation of plant germplasm 1*, vol 32. Springer-Verlag, Heidelberg, pp 70-86
- Ebert A, Taylor HF (1990) Assessment of the changes of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid concentrations in plant tissue culture media in the presence of activated charcoal. *Plant Cell Tiss Org Cult* 20:165-172
- Efendi D (2003) Transformation and cryopreservation of embryogenic avocado (*Persea americana* Mill.) cultures. Dissertation, University of Florida
- Efendi D, Litz RE (2003) Cryoconservation of avocado. Proceedings of the VII Avocado World Congress, Spain, 19-24 October, 2003
- Egertsdotter U, von Arnold S (1993) Classification of embryogenic cell-lines of *Picea abies* as regards protoplast isolation and culture. *J Plant Physiol* 141:222-229
- Elmeer KMS, Hennerty MJ (2008) Observations on the combined effects of light, NAA and 2,4-D on somatic embryogenesis of cucumber (*Cucumis sativus*) hybrids. *Plant Cell Tiss Org Cult* 95:381-384
- Engelmann F (1991) *In vitro* conservation of tropical plant germplasm- a review. *Euphytica* 57:227-243

- Engelmann F (1992) Cryopreservation of embryos. In: Dattée Y, Dumas C, Gallais A (eds) Reproductive biology and plant breeding. Springer-Verlag, Berlin, pp 281-290
- Engelmann F (2000) Importance of cryopreservation for the conservation of plant genetic resources. In: Engelmann F, Takagi H (eds) Cryopreservation of tropical plant germplasm-current research progress and applications. Tsukuba, JIRCAS, Rome, IPGRI, pp 8-20
- Engelmann F (2004) Plant cryopreservation: progress and prospects. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 40:427-433
- Engelmann F, Lartaud M, Chabrillange N, Carron MP, Etienne H (1997) Cryopreservation of embryogenic calluses of two commercial clones of *Hevea brasiliensis*. *CryoLett* 18:107-116
- Engelmann F, Gonzalez-Arnao MT, Wu Y, Escobar R (2008) Development of Encapsulation Dehydration. In: Reed BM (ed) Plant cryopreservation: a practical guide. Springer-Science, Business Media LLC.513, New York, pp 77-88
- Egertsdotter U, von Arnold S (1995) Importance of arabinogalactan proteins for the development of somatic embryos of Norway spruce (*Picea abies*). *Physiol Plant* 93:334-345
- Evans DA, Sharp WR, Flick CE (1981) Growth and behaviour of cell cultures. Embryogenesis and Organogenesis. In: Thorpe TA (ed) Plant tissue culture. Methods and applications in agriculture. Academic Press, New York, pp 45-113
- Evans PT, Malmberg RL (1989) Do polyamines have roles in plant development? *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 40:235-269
- Fabre J, Dereuddre J (1990) Encapsulation-dehydration: a new approach to cryopreservation of *Solanum* shoot tips. *CryoLett* 11:413-426
- Fahy GM, MacFarlane DR, Angell CA, Meryman HT (1984) Vitrification as an approach to cryopreservation. *Cryobiol* 21:407-426
- Fahy GM, Takahashi T, Meryman HT (1986) Practical aspects of ice-free cryopreservation. In: Smit-Sibinga TH, Das PC (eds) Aspects of ice-free cryopreservation. Martinus-Nijhoff, Boston, pp 111-122
- Fang JY, Wetten A, Hadley P (2004) Cryopreservation of cocoa (*Theobroma cacao* L.) somatic embryos for long-term germplasm storage. *Plant Sci* 166:669-675
- FAOSTAT Database (2009) Food and Agricultural Organization, United Nations, Rome. Available on line. <http://faostat.fao.org>.
- Farrant J (1980) General observations of cell preservation. In: Ashwood-Smith MJ, Farrant J (eds) Low temperature preservation in medicine and biology. Pitman Medical, Tunbridge Weels, pp 1-18
- Feher A, Pasternak T, Ötvös K, Miskolczi P, Dudits D (2002) Induction of embryogenic competence in somatic plant cells: a review. *Biol* 57:5-12
- Feher A, Pasternak TP, Dudits D (2003) Transition of somatic plant cells to an embryogenic state. *Plant Cell Tiss Org Cult* 74:201-228
- Fernandes P, Rodríguez E, Pinto G, Roldán-Ruíz I, De Losse M, Santos C (2008) Cryopreservation of *Quercus suber* somatic embryos by encapsulation-dehydration and evaluation of genetic stability. *Tree Physiol* 28:1841-1850
- Fernández de Enciso M (1519) Suma geográfica que trata de los partidos y provincias del mundo, en especial de las Indias. Jacobo Cromberger, Sevilla, Spain
- Fernández de Oviedo G (1526) Sumario de la natural historia de las Indias. Miranda J (ed) México
- Filonova L, Bozhkov P, von Arnold S (2000a) Developmental pathways of somatic embryogenesis in *Picea abies* as revealed by time-lapse-tracking. *J Exp Bot* 51:249-264
- Filonova L, Bozhkov P, Brukhin V, Daniel G, Zhivovsky B, Von Arnold S (2000b) Two waves of programmed cell death occur during formation and development of somatic embryos in the gymnosperm, Norway spruce. *J Cell Sci* 113:4399-4411

- Find JI (1997) Changes in endogenous ABA levels in developing somatic embryos of Norway spruce (*Picea abies* (L.) Karst.) in relation to maturation medium, desiccation and germination. *Plant Sci* 128:75-83
- Find JI, Nørgaard JV, Krogstrup P (1998a) Growth parameters, nutrient uptake and maturation capacity of two cell-lines of Norway spruce (*Picea abies*) in suspension culture. *J Plant Physiol* 152:510-517
- Find JI, Kristensen MMH, Nørgaard JV, Krogstrup P (1998b) Effect of culture period and cell density on regrowth following cryopreservation of embryogenic suspension cultures of Norway spruce and Sitka spruce. *Plant Cell Tiss Org Cult* 53:27-33
- Fink AI (1999) Chaperone-mediated protein folding. *Physiol Rev* 79:425-449
- Finkelstein R, Somerville C (1989) Abscisic acid or high osmoticum promote accumulation of long-chain fatty acids in developing embryos of *Brassica napus*. *Plant Sci* 61:213-217
- Fischer C, Neuhaus G (1996) Influence of auxin on the establishment of bilateral symmetry in monocots. *Plant J* 9:659-669
- Fischerova L, Fischer L, Vondrakova Z, Vagner M (2008) Expression of the gene encoding transcription factor PaVP1 differs in *Picea abies* embryogenic lines depending on their ability to develop somatic embryos. *Plant Cell Rep* 27:435-441
- Fischella M, Morini S (2003) Somatic embryo and root regeneration from quince leaves cultured in ventilated vessels or under different oxygen and carbon dioxide levels. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 39:402-408
- Flores HE, Protacio CM, Signs MW (1989) Primary and secondary metabolism of polyamines in plants. In: Poulton JE, Romeo JT, Conn EE (eds) *Plant nitrogen metabolism. Recent advances phytochemistry*, vol 23. Plenum Press, New York, pp 329-393
- Florin B, Brulard E, Lepage B (1999) Establishment of a cryopreserved coffee germplasm bank. In: *Abstracts Cryo'99, World Congress of Cryobiology, Marseilles, France, July 12-15*, pp 167
- Ford CS, Jones NB, Van Staden J (2000) Cryopreservation and plant regeneration from somatic embryos of *Pinus patula*. *Plant Cell Rep* 19:610-615
- Fridborg G, Pedersén M, Landtström L, Eriksson T (1978) The effect of activated charcoal on tissue cultures: adsorption of metabolites inhibiting morphogenesis. *Physiol Plant* 43:104-106
- Frolich EF (1951) Rooting Guatemalan avocado cuttings. *Cal Avo Soc Yrb* 36:136-138
- Fujii JAA, Slade D, Olsen R, Ruzin SE, Redenbaugh K (1990) Alfalfa somatic embryo maturation and conversion to plants. *Plant Sci* 72:93-100
- Gairi A, Rashid A (2004a) Direct differentiation of somatic embryos on different regions of intact seedlings of *Azadirachta* in response to thidiazuron. *J Plant Physiol* 161:1073-1077
- Gairi A, Rashid A (2004b) TDZ-induced somatic embryogenesis in non-responsive caryopses of rice using a short treatment with 2,4-D. *Plant Cell Tiss Org Cult* 76:29-33
- Gaj MD (2004) Factors influencing somatic embryogenesis induction and plant regeneration with particular reference to *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Plant Growth Regul* 43:27-47
- Gaj MD, Zhang S, Harada JJ, Lemux PG (2005) Leafy cotyledon genes are essential for induction of somatic embryogenesis of *Arabidopsis*. *Planta* 222:977-988
- Gale S, John A, Harding K, Benson EE (2008) Cryopreservation of *Picea sitchensis* (Sitka spruce) somatic embryos using vitrification. *CryoLett* 29:135-144
- Galland R, Randoux B, Vasseur J, Hilbert J (2001) A glutathione S-transferase cDNA identified by mRNA differential display is upregulated during somatic embryogenesis in *Cichorium*. *Biochim Biophys Acta* 1522:212-216

- Gallardo K, Job C, Groot SPC, Puype M, Demol H, Vanderkerckhove J, Job D (2002) Importance of methionine biosynthesis for *Arabidopsis* seed germination and seedling growth. *Physiol Plant* 116:238-247
- Galston AW, Sawhney R (1990) Polyamines in plant physiology. *Plant Physiol* 94:406-410
- Gamborg OL, Muller RA, Ojima K (1968) Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp Cell Res* 50: 51-58
- Gamez-Pastrana R, Martinez-Ocampo Y, Beristain CI, Gonzalez-Arnao MT (2004) An improved cryopreservation protocol for pineapple apices using encapsulation-vitrification. *CryoLett* 25:405-414
- Ganj DR, Kasahara H, Xia ZQ, Vander-Mijnsbrugge K (1999) Evolution of plant defense mechanisms. Relationships of phenylcoumaran benzylic ether reductases to pinoresinol-lariciresinol and isoflavone reductases. *J Biol Chem* 274:7516-7527
- García-Martín G, Manzanera JA, González-Benito ME (2005) Effects of exogenous ABA on embryo maturation and quantification of endogenous levels of ABA and IAA in *Quercus suber* somatic embryos. *Plant Cell Tiss Org Cult* 80:171-177
- Gatica-Arias AM, Arrieta-Espinoza G, Espinoza-Esquivel AM (2008) Plant regeneration via indirect somatic embryogenesis and optimization of genetic transformation in *Coffea arabica* L. cvs. Caturra and Catuai. *Electron J Biotechnol* 11(1):101-112
- Gavish H, Vardi A, Fluhr R (1992) Suppression of somatic embryogenesis in *Citrus* cell cultures by extracellular proteins. *Planta* 186:511-517
- George EF (1993) *Plant propagation by tissue culture: the technology*. Exegetics Limited, Edington
- George EF (2008) Plant tissue culture procedure-background. In: George EF, Hall MA, De Klerk GJ (eds) *Plant propagation by tissue culture. The background*, 3rd ed, vol 1. Springer, Dordrecht, pp 1-29
- George EF, Davies W (2008) Effects of the physical environment. In: George EF, Hall MA, De Klerk GJ (eds) *Plant propagation by tissue culture. The background*, 3rd ed, vol 1. Springer, Dordrecht, pp 423-465
- Ghosh S, Sen J, Kalia S, Guha-Mukherjee S (1999) Establishment of synchronization in carrot cell suspensions culture and studies on stage specific activation of glyoxalase I. *Meth Cell Sci* 21:141-148
- Giuliano G, Rosellini D, Terzi M (1983) A new method for the purification of the different stages of carrot embryoids. *Plant Cell Rep* 2:216-218
- Gleddie S, Keller W, Setterfield G (1983) Somatic embryogenesis and plant regeneration from leaf explants and cell suspension of *Solanum melongena* (eggplant). *Can J Bot* 61:656-666
- Golds TJ, Babcizinsky J, Rauscher G, Koop HU (1992) Computer-controlled tracking of single cell development in *Nicotiana tabacum* L. and *Hordeum vulgare* L. protoplasts embedded in agarose/alginate films. *J Plant Physiol* 140:582-587
- Gómez A, López JA, Pintos B, Camafeita E, Bueno MA (2009) Proteomic analysis from haploid and diploid embryos of *Quercus suber* L. identifies qualitative and quantitative differential expression patterns. *Proteomics* 9:4355-4367
- Gomez-Lim MA, Litz RE (2004) Genetic transformation of perennial tropical fruits. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 40:42-449
- Gonzalez-Arnao MT, Engelmann F, Urra C, Morenza M, Rios A (1998) Cryopreservation of citrus apices using the encapsulation-dehydration technique. *CryoLett* 19:117-182
- Gonzalez-Arnao MT, Engelmann F (2006) Cryopreservation of plant germplasm using the encapsulation-dehydration technique: review and case study on sugarcane. *CryoLett* 27:155-168

- Gonzalez-Arno MT, Panta A, Roca WM, Roosevelt H, Engelmann F (2008) Development and large scale application of cryopreservation techniques for shoot and somatic embryo cultures of tropical crops. *Plant Cell Tiss Org Cult* 92:1-13
- Good X, Kellog JA, Wagoner W, Langhoff D, Matsumura W, Bestwick RK (1994) Reduced ethylene synthesis by transgenic tomatoes expressing S-adenosylmethionine hydrolase. *Plant Mol Biol* 26:781-790
- Gow WP, Chen JT, Chang WC (2009) Effects of genotype, light regime, explant position and orientation on direct somatic embryogenesis from leaf explants of *Phalenopsis* orchids. *Acta Physiol Plant* 31:363-369
- Guan Y, Nothnagel EA (2004) Binding of Arabinogalactan proteins by Yariv phenylglycoside triggers wound-like responses in *Arabidopsis* cell cultures. *Plant Physiol* 135:1346-1366
- Guilfoyle TJ (1999) Auxin-regulated genes and promoters. In: Hooykaas PJJ, Hall MA, Libbenga KR (eds) *Biochemistry and molecular biology of plant hormones*. Elsevier, Amsterdam, pp 423-459
- Gupta PK, Pullman G, Timmins R, Kreitinger M, Carlson WC, Grob J, Welty E (1993) Forestry in the 21st century: the biotechnology of somatic embryogenesis. *Biotechnol* 11:454-459
- Gutmann M, von Aderkas P, Label P, Lelu MA (1996) Effects of abscisic acid on somatic embryo maturation of hybrid larch. *J Exp Bot* 47:1905-1917
- Guzmán-García E, Sánchez-Romero C, Panis B, Carpentier S (2009) Cultivos embriogénicos de aguacate tipo SE y PEM. Patrones de proliferación y proteínas asociadas. VIII Reunión de la Sociedad Española de Cultivo *in vitro* de Tejidos Vegetales (SECIVTV), Murcia, Spain, pp 49
- Györgyey J, Gartner A, Németh K, Magyar Z, Hirt H, Heberle-Bors E, Dudits D (1991) Alfalfa heat shock genes are differentially expressed during somatic embryogenesis. *Plant Mol Biol* 16:999-1007
- Halliday KJ, Martinez-Garcia J, Josse EV (2009) Integration of light and auxin signaling. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 1:a001586
- Halperin W (1966) Alternative morphogenic events in cell suspensions. *Amer J Bot* 53:443-453
- Halperin W (1967) Population density effects on embryogenesis in carrot cell cultures. *Exp Cell Re* 48:170-173
- Hao YJ, Liu QL, Deng XX (2001) Effect of cryopreservation on apple genetic resources at morphological, chromosomal and molecular levels. *Cryobiol* 43:46-51
- Hao YJ, You CX, Deng XX (2002a) Analysis of ploidy and the patterns of amplified fragment length polymorphism and methylation sensitive amplified polymorphism in strawberry plants recovered from cryopreservation. *CryoLett* 23:37-46
- Hao YJ, You CX, Deng XX (2002b) Effects of cryopreservation on developmental competency, cytological and molecular stability of citrus callus. *CryoLett* 23:27-35
- Harding K (2004) Genetic integrity of cryopreserved plant cells: A review. *CryoLett* 25:3-22
- Harding K, Marzalina M, Krishnapillay B, Nashatul Zaimah NA, Normah MN, Benson EE (2000) Molecular stability assessments of trees regenerated from cryopreserved mahogany (*Swietenia macrophylla*) seed germplasm using non-radioactive techniques to examine the chromatin structure and DNA methylation status of the ribosomal RNA genes. *J Trop For Sci* 12:149-163
- Hari V (1980) Effect of cell density changes and conditioned media on carrot cell embryogenesis. *Z Pflanzenphysiol* 96:227-231
- Hartweck LM, Lazzeri PA, Cui D, Collins GB, Williams EG (1988) Auxin-orientation effects on somatic embryogenesis from immature soybean cotyledons. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 24:821-828

- Heine-Dobbernack E, Kiesecker H, Schumacher HM (2008) Cryopreservation of dedifferentiated Cell Cultures. In: Reed BM (ed) Plant cryopreservation: a practical guide. Springer-Science, Business Media LLC.513, New York, pp 141-176
- Helleboed S, Hendriks T, Bauw G, Inze D, Vasseur J, Hilbert JL (2000) Three major somatic embryogenesis related proteins in *Cichorium* identified as PR proteins. J Exp Bot 51:1711-1723
- Helliot B, Swennen R, Poumay Y, Frison E, Lepoivre P, Panis B (2003) Ultrastructural changes associated with cryopreservation of banana (*Musa* spp.) highly proliferating meristems. Plant Cell Rep 21:690-698
- Helmersson A, von Arnold S (2009) Embryogenic cell lines of *Juniperus communis*; easy establishment and embryo maturation, limited germination. Plant Cell Tiss Org Cult 96:211-217
- Higashi K, Daita M, Kobayashi T, Sasaki K, Harada H, Kamada H (1998) Inhibitory conditioning for carrot somatic embryogenesis in high-cell-density cultures. Plant Cell Rep 18:2-6
- Hirai D (2001) Studies on cryopreservation of vegetatively propagated crops by encapsulation-vitrification method. Rep Hokkaido Prefect Agric Exp Stn 99:1-58
- Hirai D, Sakai A (2003) Simplified cryopreservation of sweet potato (*Ipomea batatas* (L.) Lam.) by optimizing conditions for osmoprotection. Plant Cell Rep 21:961-966
- Hjortswang HI, Filonova LH, Vahala T, von Arnold S (2002) Modified expression of the *Pa18* gene interferes with somatic embryo development in Norway spruce. Plant Growth Regul 38:75-82
- Ho WJ, Vasil IK (1983) Somatic embryogenesis in sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) I. The morphology and physiology of callus formation and the ontogeny of somatic embryos. Protoplasma 18:169-180
- Hohe A, Winkelmann T, Schwenkel HG (1999) CO₂ accumulation in bioreactor suspension cultures of *Cyclamen persicum* Mill. and its effect on cell growth and regeneration of somatic embryos. Plant Cell Rep 18:863-867
- Hong SR, Yin MH (2009) High-efficiency vitrification protocols for cryopreservation of *in vitro* grown shoot tips of rare and endangered plant *Emmenopterys henry* Oliv. Plant Cell Tiss Org Cult 99:217-226
- Horn ME, Martin BA, Widholm JM (1992) Photoautotrophic growth of soybean cells in suspension culture 2. Optimization of culture medium and conditions. Plant Cell Tiss Org Cult 30:85-91
- Huang B, Bird S, Kemble R, Simmonds D, Keller W, Miki B (1990) Effects of culture density, conditioned medium and feeder cultures on microspore embryogenesis in *Brassica napus* L. cv. Topas. Plant Cell Rep 8:594-597
- Huang B, Chu CH, Chen SH, Juan HF, Chen YM (2006) A proteomics study of the mung bean epicotyl regulated by brassinosteroids under conditions of chilling stress. Cell Mol Biol Lett 11:264-278
- Hughes W (1672) The American Physician. William Crock (ed), London
- Husaini AM, Abidin MZ (2007) Interactive effect of light, temperature and TDZ on the regeneration potential of leaf discs of *Fragaria x ananassa* Duch. In Vitro Cell Dev Biol Plant 43:576-584
- Ibaraki Y, Kurata K (2001) Automation of somatic embryo production. Plant Cell Tiss Org Cult 65:179-199
- Iida Y, Watabe KI, Kamada H, Harada H (1992) Effects of abscisic acid on the induction of desiccation tolerance in carrot somatic embryos. J Plant Physiol 140:356-360
- Ikeda-Iwai M, Satoh S, Kamada H (2002) Establishment of a reproducible tissue culture system for the induction of *Arabidopsis* somatic embryos. J Exp Bot 53:1575-1580

- Imamura J, Harada H (1981) Stimulation of tobacco pollen embryogenesis by anaerobic treatments. *J Plant Physiol* 103:259-263
- Imin N, De Jong F, Mathesius U, van Noorden G, Saeed NA, Wang XD, Rose RJ, Rolfe BG (2004). Proteome reference maps of *Medicago truncatula* embryogenic cell cultures generated from single protoplasts. *Proteomics* 4:1883-1896
- Imin N, Nizamidin M, Daniher D, Nolan KE, Rose RJ, Rolfe BG (2005) Proteomic analysis of somatic embryogenesis in *Medicago truncatula*. Explant cultures grown under 6-Benzylaminopurine and 1-Naphthaleneacetic acid treatments. *Plant Physiol* 137:1250-1260
- Immerzeel P, Eppink MM, De Vries S, Schols HA, Voragen AGJ (2006) Carrot arabinogalactan proteins are interlinked with pectins. *Physiol Plant* 128:18-27
- Irish VF, Sussex IM (1992) A fate map of the *Arabidopsis* embryonic shoot apical meristems. *Dev* 115:745-753
- Ishikawa M, Suzuki M, Nakamura T, Kishimoto T, Robertson AJ, Gusta LV (2006) Effect of growth phase on survival of bromegrass suspensions cells following cryopreservation and abiotic stresses. *Ann Bot* 97:453-459
- Ishizaki T, Megumi C, Komai F, Masuda K, Oosawa K (2002) Accumulation of a 31-kDa glycoprotein in association with the expression of embryogenic potential by spinach callus in culture. *Physiol Plant* 114:109-115
- Jackson JF, Linskens HF (2003) Genetic transformation of plants. *Molecular methods of plant analysis*, vol 23. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, pp 202
- Jackson MB, Abbot AJ, Belcher AR, Hall KC (1987) Gas exchange in plant tissue cultures. In: Jackson MB, Mantell SH, Blake J (eds) *Advances in the chemical manipulation of tissue culture*. Monograph 16. British Plant Growth Regulator Group, Bristol, pp 57-71
- Jacobsen HJ (1991) Somatic embryogenesis in seed legumes-the possible role of soluble auxin receptors. *Israel J Bot* 40:139-143
- Jain M, Choudhary D, Kale RK, Bhalla-Sarin N (2002) Salt- and glyphosate-induced increase in glyoxalase I activity in cell lines of groundnut (*Arachis hypogaea*). *Physiol Plant* 114:499-505
- Jalonen P, von Arnold S (1991) Characterization of embryogenic cell lines of *Picea abies* in relation to their competence for maturation. *Plant Cell Rep* 10:384-387
- Janick J (1993) Agricultural uses of somatic embryos. *Acta Hort* 336:207-215
- Jasik J, Salajova T, Salaj J (1995) Developmental anatomy and ultrastructure of early somatic embryos in European black pine (*Pinus nigra* Arn). *Protoplasma* 185:205-211
- Jayasankar S, Gray DJ, Litz RE (1999) High-efficiency somatic embryogenesis and plant regeneration from suspension cultures of grapevine. *Plant Cell Rep* 18:533-537
- Jensen CJ (1977) Monoploid production by chromosome elimination. In: Reinert J, Bajaj YPS (eds) *Applied and fundamental aspects of plant cell, tissue and organ culture*. Springer-Verlag, Berlin, pp 299-340
- Jensen PJ, Hangarter RP, Estelle M (1998) Auxin transport is required for hypocotyl elongation in light-grown but not dark-grown *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 116:455-462
- Jiménez VM (2005) Involvement of plant hormones and plant growth regulators on *in vitro* somatic embryogenesis. *Plant Growth Regul* 47:91-110
- Jiménez VM, Bangerth F (2001a) Endogenous hormone levels in explants and in embryogenic and non-embryogenic cultures of carrot. *Physiol Plant* 111:389-395
- Jiménez VM, Bangerth F (2001b) Endogenous hormone levels in initial explants and in embryogenic and non-embryogenic callus cultures of competent and non-competent wheat genotypes. *Plant Cell Tiss Org Cult* 67:37-46
- Jiménez VM, Bangerth F (2001c) Hormonal status of maize initial explants and of the embryogenic and non-embryogenic callus cultures derived from them as related to morphogenesis *in vitro*. *Plant Sci* 160:247-257

- Jiménez VM, Bangerth F (2001d) *In vitro* culture and endogenous hormone levels in immature zygotic embryos, endosperm and callus cultures of normal and high-lysine barley genotypes. *J Appl Bot* 75:1-7
- Jiménez VM, Guevara E, Herrera J, Bangerth F (2001) Endogenous hormone levels in habituated nucellar *Citrus* callus during the initial stages of regeneration. *Plant Cell Rep* 20:92-100
- Jiménez VM, Guevara E, Herrera J, Bangerth F (2005) Evolution of endogenous hormone concentration in embryogenic cultures of carrot during early expression of somatic embryogenesis. *Plant Cell Rep* 23:567-572
- John A, Gale S, Benson E (2007) Tissue culture and cryopreservation of Sitka spruce. *British Forestry & Timber* July:53-58
- Johnston JW, Benson EE, Harding K (2009) Cryopreservation induces temporal DNA methylation epigenetic changes and differential transcriptional activity in *Ribes* germplasm. *Plant Physiol Bioch* 47:123-131
- Jones KH, Senft JA (1985) An improved method to determine cell viability by simultaneous staining with fluorescein diacetate-propidium iodide. *J Histochem Cytochem* 33:77-79
- Joosen R, Cordewener J, Supena ED, Vorst O, Lammers M, Maliepaard C, Zeilmaker T, Miki B, America T, Custers J, Boutelier K (2007) Combined transcriptome and proteome analysis pathways and markers associated with the establishment of rapeseed microspore-derived embryo development. *Plant Physiol* 144:155-172
- Jouannic S, Collin M, Vidal B, Verdeil JL, Tregear W (2007) A class I KNOX gene from the palm species *Elaeis guineensis* (Aracaceae) is associated with meristem function and a distinct mode of leaf dissection. *New Phytol* 174:551-568
- Jourdain I, Lelu-Walter MA, Label P (1997) Hormonal changes during growth of somatic embryogenic masses in hybrid larch. *Plant Physiol Biochem* 35:741-749
- Kaity A, Ashmore SE, Drew RA, Dullo ME (2008) Assessment of genetic and epigenetic changes following cryopreservation in papaya. *Plant Cell Rep* 27:1529-1539
- Kaity A, Ashmore SE, Drew RA (2009) Field performance evaluation and genetic integrity assessment of cryopreserved papaya clones. *Plant Cell Rep* 28:1421-1430
- Kalapos MP (1999) On the promine/retine theory of cell division: now and then. *Biochim Biophys Acta* 1426:1-16
- Kamada H, Tachikawa Y, Saitou T, Harada H (1994) Heat stress induction of carrot somatic embryogenesis. *Plant Tissue Cult Lett* 11:222-232
- Kamo K, Jones B, Castillon J, Bolar J, Smith F (2004) Dispersal and size fractionation of embryogenic callus increases the frequency of embryo maturation and conversion in hybrid tea roses. *Plant Cell Rep* 22:787-792
- Kartha KK, Leung NL, Mroginski LA (1982) *In vitro* growth responses and plant regeneration from cryopreserved meristems of cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *Zpflanzenphysiol* 107:133-140
- Kartha KK, Engelmann F (1994) Cryopreservation and germplasm storage. In: Vasil IK, Thorpe TA (eds) *Plant cell and tissue culture*. Kluwer, Dordrecht, pp 195-230
- Kathleen AM (1996) The functions and regulation of glutathione S-transferases in plants. *Annu Rev Plant Physiol Mol Biol* 47:127-158
- Kawahara R, Komamine A (1995) Molecular basis of somatic embryogenesis. In: Bajaj YPS (ed) *Biotechnology in agriculture and forestry. Somatic embryogenesis and synthetic seed I*, vol 30. Springer-Verlag, Berlin, pp 30-40
- Kays SJ (1997) *Postharvest physiology of perishable plant products*. Exon Press, Athens
- Keller ERJ, Senula A, Dreiling M (2005) Genebanking on vegetatively propagated medicinal plants-two cases: *Allium* and *Mentha*. *Acta Hort* 676:103-109

- Kendall EJ, Kartha KK, Qureshi JA, Chermak P (1993) Cryopreservation of immature spring wheat zygotic embryos using abscisic acid pretreatment. *Plant Cell Rep* 12:89-94
- Kermode AR, Pramanik SK, Bewley JD (1989) The role of maturation drying in the transition from seed development to germination. VI. Desiccation induced changes in messenger RNAs populations within the endosperm of *Ricinus communis* L. seeds. *J Exp Bot* 40:33-41
- Kermode AR (1995) Regulatory mechanisms in the transition from seed development to germination: interaction between the embryo and the seed environment. In: Kigel J, Galili G (eds) *Seed development and germination*. Marcel Dekker Inc, New York, pp 273-332
- Kessell RHL, Carr AH (1972) The effect of dissolved oxygen concentrations on growth and differentiation of carrot (*Daucus carota*) tissue. *J Exp Bot* 23:996-1007
- Kevei E, Nagy F (2003) Phytochrome controlled signalling cascades in higher plants. *Physiol Planta* 117:305-313
- Khlifi S, Tremblay FM (1995) Maturation of black spruce somatic embryos. Part I. Effect of L-glutamine on the number and germinability of somatic embryos. *Plant Cell Tiss Org Cult* 41:23-32
- Kim HH, Yoon JW, Park YE, Cho EG, Sohn JK, Kim TS, Engelmann F (2006) Cryopreservation of potato cultivated and wild species: critical factors in droplet vitrification. *CryoLett* 27:223-234
- Kintzios SE, Tavira N (1997) Effect of genotype and light intensity on somatic embryogenesis and plant regeneration in melon (*Cucumis melo* L.). *Plant Breed* 116:359-362
- Kitayama E, Suzuki S, Sano T, Nagata N (2000) Isolation of two genes that were induced upon the initiation of somatic embryogenesis on carrot hypocotyls by high concentration of 2,4-D. *Plant Cell Rep* 19:551-557
- Klimaszewska K, Smith DR (1997) Maturation of somatic embryos of *Pinus strobus* is promoted by a high concentration of gellan gum. *Physiol Plant* 100:949-957
- Klimaszewska K, Bernier-Cardou M, Cyr DR, Sutton BCS (2000) Influence of gelling agents on culture medium gel strength, water availability, tissue water potential, and maturation response in embryogenic cultures of *Pinus strobus* L. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 36:279-286
- Klimaszewska K, Noceda C, Pelletier G, Label P, Rodriguez R, Lelu-Walter MA (2008) Biological characterization of young and aged embryogenic cultures of *Pinus pinaster* (Ait.) *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 45:20-33
- Knight RJ (Jr) (2002) History, distribution and uses. In: Whaley AW, Schaffer B, Wolstenholme BN (eds) *The avocado botany, production and uses*. CAB International, Wallingford, pp 1-14
- Kobayashi T, Higashi K, Saitou T, Kamada H (1999) Physiological properties of inhibitory conditioning factor (s), inhibitory to somatic embryogenesis, in high-density cell cultures of carrot. *Plant Sci* 144:69-75
- Kobayashi T, Higashi K, Sasaki K, Asami T, Yoshida S, Kamada H (2000) Purification from conditioned medium and chemical identification of a factor that inhibits somatic embryogenesis in carrot. *Plant Cell Physiol* 41:268-273
- Komamine A (1988) High frequency and synchronous somatic embryogenesis: a useful system for crop improvement. In: Bay-Petersen J (ed) *Cell and tissue culture in field crop improvement*. Tapei Food and Fer, pp 1-15
- Komamine A, Matsumoto M, Tsukahara M, Fujiwara A, Kawahara R, Ito M, Smith J, Nomura K, Fujimura T (1990) Mechanism of somatic embryogenesis in cell cultures-physiology, biochemistry and molecular biology. In: Nijkamp HJJ, Van der Plas LHW, Van Aartrijk J (eds) *Progress in plant cellular and molecular biology*. Kluwer Academic Publishers, Amsterdam, pp 307-313

- Komamine A, Murata N, Nomura K (2005) Mechanisms of somatic embryogenesis in carrot suspension cultures-morphology, physiology, biochemistry, and molecular biology. In *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 41:6-10
- Kong FJ, Oyanagi A, Komatsu S (2010) Cell wall proteome of wheat roots under flooding stress using gel-based and LC MS/MS-based proteomic approaches. *Biochimica et Biophysica Acta* 1804:124-136
- Kopertekh LG, Butenko RG (1995) Naturally occurring phytohormones in wheat explants as related to wheat morphogenesis *in vitro*. *Russ J Plant Physiol* 42:488-491
- Kopp LE (1966) A taxonomic revision of the genus *Persea* in the western hemisphere (*Persea-Lauraceae*). *Mem NY Bot Gard*, 14(1):1-120
- Kremer-Köhne S (2011) Avocado rootstock evaluation techniques over the last 30 years. Proceedings of the VII Avocado World Congress, Australia, 5-9 September, 2011
- Kremer-Köhne S, Mukhumo ML (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, Málaga, Spain, pp 555-560
- Kreuger M, Van Holst GJ (1993) Arabinogalactan proteins are essential in somatic embryogenesis of *Daucus carota* L. *Planta* 189:243-248
- Kumar PP, Richard WJI, Thorpe TA (1989) Ethylene and carbon dioxide accumulation, and growth of cell suspension cultures of *Picea glauca* (white spruce). *J Plant Physiol* 135:592-596
- Kurata K, Fuyata Y (1992) Automation of selecting embryogenic callus by sieving. *Acta Hort* 319:591-594
- Kvaalen H, von Arnold S (1991) Effects of various partial pressures of oxygen and carbon dioxide on different stages of somatic embryogenesis in *Picea abies*. *Plant Cell Tiss Org Cult* 27:49-57
- Kvaalen H, Ernsten A (1993) Oxygen influences benzyladenine and 2,4 dichlorophenoxyacetic acid levels in cultured embryogenic tissue of Norway spruce. *Physiol Plant* 88:571-576
- Kysely W, Jacobsen HJ (1990) Somatic embryogenesis from pea embryos and shoot apices. *Plant Cell Tiss Org Cult* 20:7-14
- Lahav E, Lavi U (2002) Genetics and breeding. In: Whaley AW, Schaffer B, Wolstenholme BN (eds) *The avocado botany, production and uses*. CAB International, Wallingford, pp 39-69
- Laine E, David A (1990) Somatic embryogenesis in immature embryos and protoplast of *Pinus caribaea*. *Plant Sci* 69:215-224
- Laine E, Bade P, David A (1992) Recovery of plants from cryopreserved embryogenic cell suspensions of *Pinus caribaea*. *Plant Cell Rep* 11:295-298
- Lambardi M, Benelli C, Ozudogru EA, Ozden-Tokatli Y (2006) Synthetic seed technology in ornamental plants. In: Teixeira da Silva JA (ed) *Floriculture, ornamental and plant biotechnology: advances and topical issues*. Global Science Books, London, pp 347-354
- Lambardi M, Ozudogru A, Benelli C (2008) Cryopreservation of embryogenic cultures. In: Reed BM (ed) *Plant cryopreservation: a practical guide*. Springer-Science, Business Media LLC.513, New York, pp 177-210
- Lambe P, Mutambel HSN, Fouche JG, Deltour R, Foidart JM, Gaspar T (1997) DNA methylation as a key process in regulation of organogenic totipotency and plant neoplastic progression? *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 33:155-162
- Lardet L, Martin F, Dessailly F, Carron MP, Montoro P (2007) Effect of exogenous calcium on post-thaw growth recovery and subsequent plant regeneration of cryopreserved embryogenic calli of *Hevea brasiliensis* (Müll. Arg.). *Plant Cell Rep* 26:559-569
- Lelu-Walter MA, Bernier-Cardou M, Klimaszewska K (2006) Simplified and improved somatic embryogenesis for clonal propagation of *Pinus pinaster* (Ait.) *Plant Cell Rep* 25:767-776

- Letarte J, Simion E, Miner M, Kasha K (2006) Arabinogalactans and arabinogalactans-proteins induce embryogenesis in wheat *Triticum aestivum* L. microspore culture. *Plant Cell Rep* 24:691-698
- Leunufna S, Keller ERJ (2003) Investigating a new cryopreservation protocol for yams (*Dioscorea* spp.). *Plant Cell Rep* 21:1159-1166
- Levitt J (1980) Responses of plants to environmental stress. Vol 1. Academic Press, Orlando.
- Liao YK, Amerson HV (1995) Slash pine (*Pinus elliottii* Engelm.) somatic embryogenesis II. Maturation of somatic embryos and plant regeneration. *New Forest* 10:165-182
- Lichtenthaler HK (1998) The stress concept in plants: an introduction. *Ann NY Acad Sci* 851:187-198
- Limanton-Grevet A, Sotta B, Brown S, Jullien M (2000) Analysis of habituated embryogenic lines in *Asparagus officinalis* L.: growth characteristics, hormone content and ploidy level of calli and regenerated plants. *Plant Sci* 160:15-26
- Lin HC, Morcillo F, Dussert S, Tranchant-Dubreuil C, Tregear JW, Tranbarger TJ (2009) Transcriptome analysis during somatic embryogenesis of the tropical monocot *Elaeis guineensis*: evidence for conserved gene functions in early development. *Plant Mol Biol* 70:173-192
- Lynch PT (2000) Applications of cryopreservation to the long-term storage of dedifferentiated plant cultures. In: Razdan MK, Cocking EC (eds) Conservation of plant genetic resources *in vitro*. Applications and limitations, vol 2. Science Publishers Inc, Enfield, pp 66-86
- Lippert D, Zhuang J, Ralph S, Ellis DE, Gilbert M, Olafson R, Ritland K, Ellis B, Douglas CJ, Bohlmann J (2005) Proteome analysis of early somatic embryogenesis in *Picea glauca*. *Proteomics* 5:461-473
- Liscum E, Reed JW (2002) Genetics of Aux/IAA and ARF action in plant growth and development. *Plant Mol Biol* 49:387-400
- Litz RE, Raharjo S (2005) *Dimocarpus longan* Longan and *Litchi sinensis* Litchi. In: Litz RE (ed) Biotechnology in agriculture series, n° 29. Biotechnology of fruit and nut crops. CABI Publishing, Cambridge, pp 628-636
- Litz RE, Witjaksono, Raharjo S, Efendi D, Pliego-Alfaro F, Barceló-Muñoz A (2005) *Persea americana* Avocado. In: Litz RE (ed) Biotechnology of fruit and nut crops. CAB International, Wallingford Oxon, pp 326-349
- Liu CM, Xu ZH, Chua NH (1993) Auxin polar transport is essential for the establishment of bilateral symmetry during early plant embryogenesis. *Plant Cell* 5:621-630
- Lotan T, Ohto M, Yee KM (1998) *Arabidopsis* LEAFY COTYLEDON 1 is sufficient to induce embryo development in vegetative cells. *Cell* 93:1195-1205
- Low ET, Alias H, Boon SH, Shariff EM, Tan CY, Ooi LC, Cheah SC, Raha AR, Wan KL, Singh R (2008) Oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) tissue culture ESTs: identifying genes associated with callogenesis and embryogenesis. *BMC Plant Biol* 8:62
- Lui Y, Wang X, Liu L (2004) Analysis of genetic variation in surviving apple shoots following cryopreservation by vitrification. *Plant Sci* 166:677-685
- Luo X, Widholm JM (1997) Cryopreservation of photosynthetic plant cell suspension cultures. *Plant Cell Tiss Org Cult* 47:183-187
- Ma XY, Yi GJ, Huang XL, Zeng JW (2009) Leaf callus induction and suspension culture establishment in lychee (*Litchi chinensis* Sonn.) cv Huaizhi. *Acta Physiol Plant* 31:401-405
- MacFarlane DR (1987) Physical aspects of vitrification in aqueous solutions. *Cryobiology* 24:181-195
- Machado AC, Puschmann M, Puhlinger H, Kremen R, Katinger H, Machado MCL (1995) Somatic embryogenesis of *Prunus subhirtella* 'autumno rosa' and regeneration of transgenic plants after Agrobacterium-mediated transformation. *Plant Cell Rep* 14: 335-340

- Maës O, Coutus-Thévenot P, Jouenne T, Boulay M, Guern J (1997) Influence of extracellular proteins, proteases and protease inhibitors on grapevine somatic embryogenesis. *Plant Cell Tiss Org Cult* 50:97-105
- Malabadi RB, Nataraja K (2006) Cryopreservation and plant regeneration via somatic embryogenesis using shoot apical domes of mature *Pinus roxburghii* Sarg. trees. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 42:152-159
- Malik MR, Wang F, Dirpaul JM, Zhou N, Polowick PL, Ferrie AM, Krochko JE (2007) Transcript profiling and identification of molecular markers for early microspore embryogenesis in *Brassica napus*. *Plant Physiol* 144:134-154
- Malpique R, Katsen-Globa A, Carrondo MJT, Zimmermann H, Alves PM (2007) Cryopreservation in micro-volumes: impact upon caco-2 colon adenocarcinoma cell proliferation and differentiation. *Biotechnol Bioeng* 98:156-166
- Maraschin SF, de Priester W, Spaink HP, Wang M (2005) Androgenic switch: an example of plant embryogenesis from the male gametophyte perspective. *J Exp Bot* 56:1711-1726
- Marks TR, Simpson EE (1999) Effect of the irradiance on shoot development *in vitro*. *Plant Growth Regul* 28:133-142
- Márquez-Martín B (2007) Embriogénesis somática de aguacate (*Persea americana* Mill.) Dissertation, University of Málaga
- Márquez-Martín B, Sánchez-Romero C, Perán-Quesada R, Barceló-Muñoz A, Pliego-Alfaro F (2003) Efecto del tipo de callo, tiempo de precultivo en suspensión y densidad de inóculo en el desarrollo de embriones somáticos de aguacate (*Persea americana* Mill.). V Reunión de la Sociedad Española de Cultivo *in vitro* de Tejidos Vegetales (SECIVTV), Spain, 29 June-2 July, 2003
- Márquez-Martín B, Guzmán-García E, Barceló-Muñoz A, Pliego-Alfaro F, Sánchez-Romero C (2009) Effects of an *in vitro* maturation treatment on plant recovery from avocado zygotic embryos. *Sci Hortic* 122:532-539
- Márquez-Martín B, Sesmero R, Quesada MA, Pliego-Alfaro F, Sánchez-Romero C (2011) Water relations in culture media influence maturation of avocado somatic embryos. *J Plant Physiol* doi:10.1016/j.jplph.2011.06.008
- Marsoni M, Bracale M, Espen L, Prinsi B, Negri S, Vannini C (2008) Proteomic analysis of somatic embryogenesis in *Vitis vinifera*. *Plant Cell Rep* 27:347-356
- Martín C, González-Benito ME (2005) Survival and genetic stability of *Dendranthema grandiflora*, Tzvelev shoot apices after cryopreservation by vitrification and encapsulation-dehydration. *Cryobiol* 51:281-289
- Martín C, González-Benito ME (2009) Cryopreservation and genetic stability of *Dendranthema grandiflora* Tzvelev *in vitro* cultures. *Agr Food Sci* 18:129-135
- Martín C, Cervera MT, González-Benito ME (2011) Genetic stability analysis of chrysanthemum (*Chrysanthemum x morifolium* Ramat) after different stages of an encapsulation-dehydration cryopreservation protocol. *J Plant Physiol* 168:158-166
- Martínez MT, Ballester A, Vieitez AM (2003) Cryopreservation of embryogenic cultures of *Quercus robur* using desiccation and vitrification procedures. *Cryobiology* 46:182-189
- Martínez T, Corredoira E, Valladares S, Jorquera L, Vieitez AM (2008) Germination and conversion of somatic embryos derived from mature *Quercus robur* trees: the effects of cold storage and thidiazuron. *Plant Cell Tiss Org Cult* 95:341-351
- Martínez-García JF, Huq E, Quail PH (2000) Direct targeting of light signals to a promoter element-bound transcription factor. *Science* 288:859-863
- Marum L, Estêvão C, Oliviera MM, Amâncio S, Rodriguez L, Miguel C (2004) Recovery of cryopreserved embryogenic cultures of maritime pine-effect of cryoprotectant and suspension density. *CryoLett* 25:363-374

- Marvituna F, Buyukalaca S (1996) Somatic embryogenesis of pepper in bioreactors: a study of bioreactor type and oxygen-uptake rates. *Appl Microbiol Biotechnol* 46:327-333
- Massonneau A, Coronado MJ, Audran A, Bagniewska A, Mol R, Testillano PS, Goralski G, Dumas C, Rieueno MC, Matthys-Rochon E (2005) Multicellular structures developing during maize microspore culture express endosperm and embryo-specific genes and show different embryogenic potentialities. *Eur J Cell Biol* 84:663-675
- Mathur G, Alkutkar VA, Nadgauda RS (2003) Cryopreservation of embryogenic cultures of *Pinus roxburghii*. *Biol Plant* 46:205-210
- Matsumoto T, Sakai A, Nako Y (1998) A novel preculturing for enhancing the survival of *in vitro* grown meristems of wasabi (*Wasabia japonica*) cooled to -196°C by vitrification. *CryoLett* 19: 27-36
- Matsumoto T, Mochida K, Itamura H, Sakai A (2001) Cryopreservation of persimmon (*Diospyros kaki* Thunb.) by vitrification of dormant shoot tips. *Plant Cell Rep* 398-402
- Matthys-Rochon E (2005) Secreted molecules and their role in embryo formation in plants: a mini-review. *Acta Biol Cracov Bot* 47:23-29
- Mazur P (1984) Freezing of living cells: mechanisms and applications. *Am J Physiol Cell Physiol* 247:125-142
- Mazur P (2004) Principles of cryobiology. In: Fuller B, Lane N, Benson EE (eds) *Life in the frozen state*. CRC Press, London, pp 3-66
- McCabe PF, Levine A, Meijer PJ, Tapon NA, Pennel RI (1997) A programmed cell death pathway activated in carrot cells cultured at low cell density. *Plant J* 12:267-280
- McKersie BD, Senaratna T, Bowley SR, Brown DCW, Krochko JE, Bewley JD (1989) Application of artificial seed technology in the production of hybrid alfalfa (*Medicago sativa* L.). *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 25:1183-1188
- Menge JA, Guillemet FB, Campbell S, Johnson E, Pond E (1992) The performance of rootstocks tolerant to root rot caused by *Phytophthora cinamomi* under field conditions in Southern California. In: Lovatt C, Holthe PA, Arpaia ML (eds) *Proceedings of the II World Avocado Congress The Shape Things to come, Vol I, Riverside, California*, pp 53-59.
- Menges M, Murray JAH (2004) Cryopreservation of transformed and wild-type *Arabidopsis* and tobacco cell suspensions cultures. *Plant J* 37:635-644
- Merkle SA, Wiecko AT, Sotak RJ, Sommer HE (1990) Maturation and conversion of *Liriodendron tulipifera* somatic embryos. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 26:1086-1093
- Merkle SA, Parrott WA, Flinn BS (1995) Morphogenic Aspects of Somatic Embryogenesis. In: Thorpe TA (ed) *In vitro embryogenesis in plants*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp 155-204
- Meryman HT, Williams RJ (1985) Basic principles of freezing injury to plant cells: natural tolerance and approaches to cryopreservation. In: Kartha KK (ed) *Cryopreservation of plant cells and organs*. CRC Press Inc, Boca Raton, pp 14-47
- Meskaoui AE, Tremblay FM (1999) Effects of sealed and vented gaseous microenvironments on the maturation of somatic embryos of black spruce with a special emphasis on ethylene. *Plant Cell Tiss Org Cult* 56:201-209
- Michalczyk L, Cooke TJ, Cohen JD (1992) Auxin levels at different stages of carrot somatic embryogenesis. *Phytochem* 31:1097-1103
- Michler CH, Bauer EO (1991) High frequency somatic embryogenesis from leaf tissue of *Populus* spp. *Plant Sci* 77:111-118
- Mikula A, Skierski J, Rybczynski (2002) Somatic embryogenesis of *Gentiana* genus III. Characterization of three-year-old embryogenic suspensions of *G. pannonica* originated from various seedling explants. *Acta Physiol Plant* 24:311-322

- Mikula A, Tomiczak K, Rybczynski JJ (2011) Cryopreservation enhances embryogenic capacity of *Gentiana cruciata* (L.) suspension culture and maintains (epi)genetic uniformity of regenerants. *Plant Cell Rep* 30:565-574
- Misra S, Attree SM, Leal I, Fowke LC (1993) Effect of the abscisic acid, osmoticum, and desiccation on synthesis of storage proteins during the development of white spruce somatic embryos. *Ann Bot* 71:11-22
- Mittler R (2002) Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci* 7:405-410
- Mix-Wagner G, Conner AJ, Cross RJ (2000) Survival and recovery of asparagus shoot tips after cryopreservation using the 'droplet' method. *NZJ Crop Hort Sci* 28:283-287
- Mo LH, Egertsdotter U, Von Arnold S (1996) Secretion of specific extracellular proteins by somatic embryos of *Picea abies* is dependent on embryo morphology. *Ann Bot* 77:143-152
- Molle F, Depuis JM, Ducos JP, Anselm A, Crolus-Savidan I, Petiard Y, Freyssinet G (1993) Carrot somatic embryogenesis and its application to synthetic seeds. In: Redenbaugh K (ed) *Synseeds*. CRC Press, Boca Raton, pp 257-287
- Montalbán IA, De Diego N, Moncalán P (2010) Bottlenecks in *Pinus radiata* somatic embryogenesis: improving maturation and germination. *Trees* 24:1061-1071
- Montero-Cortés M, Sáenz L, Córdova I, Quiroz A, Verdeil JL, Oropeza C (2010) GA₃ stimulates the formation and germination of somatic embryos and the expression of a *KNOTTED*-like homeobox gene of *Cocos nucifera* (L.). *Plant Cell Rep* 29:1049-1059
- Moon H, Hildebrand DF (2003) Effects of proliferation, maturation and desiccation methods on conversion of soybean somatic embryos. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 39:623-628
- Mooney PA, Van Staden J (1987) Induction of embryogenesis in callus from immature embryos of *Persea americana*. *Can J Bot* 65:622-626
- Moran M, Cacho M, Fernandez-Tarrago J, Corchete P (1999) A protocol for the cryopreservation of *Digitalis thapsi* L. cell cultures. *CryoLett* 20:193-198
- Moreira-Dias JM, Molina RV, Guardiola JL, García-Luis A (2001) Daylength and photon flux density influence the growth regulator effects on morphogenesis in epicotyl segments of Troyer citrange. *Scientia Hort* 87(4):275-290
- Motoike SY, Saraiva ES, Ventrella MC, Silva CV, Salomao LCC (2007) Somatic embryogenesis of *Myrciaria aureana* (Brazilian grape tree). *Plant Cell Tiss Org Cult* 89:75-81
- Moukadiri O, Lopes CR, Cornejo MJ (1999) Physiological and genomic variations in rice cells recovered from direct immersion and storage in liquid nitrogen. *Physiol Plant* 105:442-449
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15:473-497
- Murthy BNS, Murch SJ, Saxena PK (1998) Thidiazuron: a potent regulator of *in vitro* plant morphogenesis. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 34:267-275
- Nagata I, Ishida S, Hasezawa S, Takahashi Y (1994) Genes involved in the dedifferentiation of plant cells. *Int J Dev Biol* 38:321-327
- Nam MH, Heo EJ, Kim JY, Kim SI, Kwon KH, Seo JB, Kwon O, Yoo JS, Park YM (2003) Proteome analysis of the responses of *Panax ginseng* C.A. Meyer leaves to high light: use of electrospray ionization quadrupole-time of flight mass spectrometry and expressed sequence tag data. *Proteomics* 3:2351-2367
- Namasivayam P (2007) Acquisition of embryogenic competence during somatic embryogenesis. *Plant Cell Tiss Org Cult* 90:1-8
- Neff MM, Fankhauser C, Chory J (2000) Light: an indicator of time and place. *Genes Dev* 14:257-271
- Niino T, Sakai A (1992) Cryopreservation of alginate-coated *in vitro*-grown shoot tips of apple, pear and multiberry. *Plant Sci* 87:199-206

- Nishizawa S, Sakai A, Amano Y, Matsuzawa T (1993) Cryopreservation of asparagus (*Asparagus officinalis* L.) embryogenic suspensions cells and subsequent plant regeneration by the vitrification method. *Plant Sci* 88:67-73
- Nogueira FCS, Goncalves EF, Jereissati ES, Santos M, Costa JH, Oliveira-Neto OB, Soares AA, Domont GB, Campos FAP (2007) Proteome analysis of embryogenic cell suspensions of cowpea (*Vigna unguiculata*). *Plant Cell Rep* 26:1333-1343
- Nomura K, Komamine A (1985) Identification and isolation of single cells that produce somatic embryos at a high frequency in a carrot suspension culture. *Plant Physiol* 79:988-991
- Nomura K, Komamine A (1995) Physiological and biochemical aspects of somatic embryogenesis. In: Thorpe TA (ed) *In vitro embryogenesis in plants*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp 249-265
- Nuutila AM, Kurten U, Kauppinen V (1991) Optimization of sucrose and inorganic nitrogen concentrations for somatic embryogenesis of birch (*Betula pendula* Roch.) callus cultures: a statistical approach. *Plant Cell Tiss Org Cult* 24:73-77
- Obendorf RL, Wettlaufer SH (1984) Precocious germination during *in vitro* growth of soybean seeds. *Plant Physiol* 76:1023-1028
- Odanaka S, Bennett AB, Kanayama Y (2002) Distinct physiological roles of fructokinase isozymes revealed by gene-specific suppression of Frk1 and Frk2 expression in tomato. *Plant Physiol* 129:1119-1126
- Oropeza M, Marcano AK, De García E (2001) Proteins related with embryogenic potential in callus and cell suspensions of sugarcane (*Saccharum* sp.). *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 37:211-216
- Osuga K, Kamada H, Komamine A (1993) Cell density is an important factor for synchronization of late stages of somatic embryogenesis at high frequency. *Plant Tissue Cult Lett* 10:180-183
- Osuga K, Komamine A (1994) Synchronization of somatic embryogenesis from carrot cells at high frequency as a basis for the mass production of embryos. *Plant Cell Tiss Org Cult* 39:125-135
- Osuga K, Masuda H, Komamine A (1999) Synchronization of somatic embryogenesis at high frequency using carrot suspension cultures: model systems and application in plant development. *Plant Mol Biol* 21:129-140
- Othmani A, Bayoudh C, Drira N, Marrakchi M, Trifi M (2009) Somatic embryogenesis and plant regeneration in date palm *Phoenix dactylifera* L., cv. Boufeggous is significantly improved by fine chopping and partial desiccation of embryogenic callus. *Plant Cell Tiss Org Cult* 97:71-79
- Owens LD, Wozniak CA (1991) Measurement and effects of gel matrix potential and expressibility on production of morphogenic callus by cultured sugarbeet leaf disks. *Plant Cell Tiss Org Cult* 26:127-133
- Ozudogru EA, Capuana M, Kaya E, Panis B, Lambardi M (2010) Cryopreservation of *Fraxinus excelsior* L. embryogenic callus by one-step freezing and slow cooling techniques. *CryoLett* 31:63-75
- Palomo-Ríos E, Sánchez-Romero C, Mercado JA, Pliego-Alfaro F (2007) *Agrobacterium*-mediated transformation of avocado embryogenic cultures. International Conference Plant Transformation Technologies. Viena, Austria
- Pan X, Guan R, Zhu S, Deng X (2009) Proteomic analysis of somatic embryogenesis in Valencia sweet orange (*Citrus sinensis* Osbeck). *Plant Cell Rep* 28:281-289
- Panaia M, Senaratna T, Dixon KW, Sivasithamparam K (2004) The role of cytokinins and thidiazuron in the stimulation of somatic embryogenesis in key members of the *Restionaceae*. *Aust J Bot* 52:257-267

- Panis B (1995) Cryopreservation of banana (*Musa* spp.) germplasm. Dissertation, Katholieke Universiteit, Leuven
- Panis B, Withers LA, De Langhe E (1990) Cryopreservation of *Musa* suspension cultures and subsequent regeneration of plants. *CryoLett* 11:337-350
- Panis B, Totté N, Van Nimmen K, Withers LA, Swennen R (1996) Cryopreservation of banana (*Musa* spp.) meristem cultures after preculture on sucrose. *Plant Sci* 121:95-106
- Panis B, Strosse H, Van Den Hende S, Swennen R (2002) Sucrose preculture to simplify cryopreservation of banana meristems cultures. *CryoLett* 23:375-383
- Panis B, Lambardi M (2005) Status of cryopreservation technologies in plants (crops and forest trees). International workshop on "The role of biotechnology for the characterization and conservation of crop, forestry, animal and fishery genetic resources". Turin, Italy, pp 43-54
- Panis B, Piette B, Swennen R (2005) Droplet vitrification of apical meristems: a cryopreservation protocol applicable to all *Musaceae*. *Plant Sci* 168:45-55
- Panta A, Tay D, Gomez R, Zea B, Rojas E, Simon R, Roca W (2009) Status and impact of *in vitro* conservation of root and tubers at the International Potato Center (CIP). In: International Society for Tropical Crops (ISTRIC). Tropical roots and tubers in a changing climate: A critical opportunity for the world. 15th Symposium of ISTRIC. Lima, Peru, 1-6 Nov 2009, pp 15-24
- Park YS (2002) Implementation of conifer somatic embryogenesis in clonal forestry: technical requirements and deployment considerations. *Ann Forest Sci* 59: 651-656
- Parrott WA, Merckle SA, Williams EG (1991) Somatic embryogenesis: potential for use in propagation and gene transfer systems. In: Murray DR (ed) *Advances methods in plant breeding and biotechnology*. CAB International, Wallingford, pp 158-200
- Pasternak TP, Prinsen E, Ayaydin F, Miskolczi P, Potters G, Asard H, Van Onckelen HA, Dudits D, Feher A (2002) The role of auxin, pH, and stress in the activation of embryogenic cell division in leaf protoplast-derived cells of alfalfa. *Plant Physiol* 129:1807-1819
- Paulus C, Kollner B, Jacobsen HJ (1993) Physiological and biochemical characterization of glyoxalase I: a general marker for cell proliferation from a soybean cell suspension. *Planta* 189:561-566
- Pegg KG, Coates LM, Korsten L, Harding RM (2002). Foliar, fruit and soilborne diseases. In: Whiley AW, Schaffer B, Wolstenholme BN (eds) *The avocado botany, production and uses*. CAB International, Wallingford, pp 299-338
- Perán-Quesada R (2001) Embriogénesis *in vitro* de aguacate (*Persea americana* Mill.). Dissertation, University of Málaga
- Perán-Quesada R, Sánchez-Romero C, Pliego-Alfaro F, Barceló-Muñoz A, (2005) Histological aspects of avocado embryo development and effect of developmental stages on germination. *Seed Sci Res* 15:125-132
- Perán-Quesada R, Sánchez-Romero C, Barceló-Muñoz A, Pliego-Alfaro F (2004). Factors affecting maturation of avocado somatic embryos. *Sci Hortic* 102:61-73
- Peredo EL, Arroyo-Garcia R, Reed BM, Revilla MA (2009) Genetic stability of *in vitro* conserved germplasm of *Humulus lupulus* L. *Agr Food Sci* 18:144-151
- Pérez RM, Mas O, Navarro L, Duran-Vila N (1999) Production and cryo-conservation of embryogenic cultures of mandarin and mandarin hybrids. *Plant Cell Tiss Org Cult* 55:71-74
- Pérez RM (2000) Cryostorage of Citrus embryogenic cultures. In: Jain SM, Gupta PK, Newton RJ (eds) *Somatic embryogenesis in woody plants*, vol 6. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp 687-705
- Pérez-Jiménez RM, Zea Bonilla T, Imbroda Solano I, Pliego-Alfaro F, López-Herrera CJ, Barceló Muñoz A (2003) Selección de portainjertos de aguacate tolerantes a la podredumbre blanca

- causada por *Rosellinia necatrix*. Proceedings of the VII Avocado World Congress, Spain, 19-24 October, 2003
- Pinto G, Park YS, Silva S, Neves L, Araújo C, Santos C (2008) Factors affecting maintenance, proliferation, and germination of secondary somatic embryos of *Eucalyptus globulus* Labill. *Plant Cell Tiss Org Cult* 95:69-78
- Pliego-Alfaro F (1981) A morphogenetic study of the avocado (*Persea americana* Mill.) *in vitro*: I. Development of a rooting bioassay and its application to studying restoration by grafting of rooting competence in adult shoots. II. Somatic embryogenesis in callus. Dissertation, University of California
- Pliego-Alfaro F, Murashige T (1988) Somatic embryogenesis in avocado (*Persea americana* Mill.) *Plant Cell Tiss Org Cult* 12:61-66
- Pliego-Alfaro F, Bergh BO (1992) Avocado. In: Hammerschlag FA, Litz RE (eds) *Biotechnology of perennial tropical fruits*. CAB International, Wallingford, pp 323-334
- Pliego-Alfaro F, Barceló-Muñoz A (2001) Morfogénesis *in vitro*. In: Caballero JL, Valpuesta V, Muñoz-Blanco J (eds) *Introducción a la biotecnología vegetal: métodos y aplicaciones*. Publicaciones obra social y cultural Cajasar, Córdoba, pp 231-243
- Pliego-Alfaro F, Witjaksono, Barceló-Muñoz A, Litz RE, Lavi U (2002) *Biotechnology*. In: Whaley AW, Schaffer B, Wolstenholme BN (eds) *The avocado botany, production and uses*. CAB International, Wallingford, pp 213-230
- Pliego-Alfaro F, Mercado JA, Palomo-Ríos E, Sánchez-Romero C, Barceló-Muñoz A, Vidoy I, Guzmán E, Pliego C, Imbroda I (2010) Aguacate. In: Perea-Dallos M, Matallana LP, Tirado-Perea A (eds) *Biotecnología aplicada al mejoramiento de los cultivos de frutas tropicales*. Editorial Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia, pp 233-259
- Pond SE, von Aderkas P, Bonga JM (2002) Improving tolerance of somatic embryos of *Picea glauca* to flash desiccation with a cold treatment (desiccation after cold acclimation). *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 38:334-341
- Popenoe W (1920) *Manual of tropical and subtropical fruits*. Mc Millan, New York (Reprinted by Hajner Press, New York).
- Popenoe W (1941) The avocado-a horticultural problem. *Trop Agric Trin* 18:3-7
- Potters G, Pasternak T, Guisez Y, Palme KJ, Jansen M (2007) Strees-induced morphogenic responses: growing out of trouble? *Trends in Plant Science* 12:98-105
- Purseglove JW (1968) *Persea americana* Mill. In: *Tropical Crops: Dicotyledons*. Longmans, Green & Co, London, pp 192-198
- Quiroz-Figueroa FR, Rojas-Herrera R, Sánchez-Teyer F, Loyola-Vargas VM (2000) Compuestos excretados por los CTV y su papel en la embriogénesis somática. In: Bernal-Lugo I, Loza H (eds) *Simposia académico en honor de la Dra. Estela Sánchez Quintanar, Facultad de Química*. UNAM, México, pp 9-19
- Quiroz-Figueroa FR, Fuentes-Cerda CFJ, Rojas-Herrera R, Loyola-Vargas VM (2002) Histological studies on the developmental stages and differentiation of two different somatic embryogenesis systems of *Coffea arabica*. *Plant Cell Rep* 20:1141-1149
- Quiroz-Figueroa FR, Rojas-Herrera R, Galaz-Avalos RM, Loyola-Vargas VM (2006) Embryo production through somatic embryogenesis can be used to study cell differentiation in plants. *Plant Cell Tiss Org Cult* 86:285-301
- Raemakers K, Jacobsen E, Visser R (1999) Proliferative somatic embryogenesis in woody species. In: Jain SM, Gupta PK, Newton RJ (eds) *Somatic embryogenesis in woody plants*, vol 4. Kluwer Academic Press, Dordrecht, pp 29-59
- Raghavan V (1997) *Molecular embryology of flowering plants*. Cambridge University Press, Cambridge

- Raharjo SHT, Witjaksono, Efendi D, Gomez-Lim MA, Suarez I, Litz RE (2003) Genetic transformation of avocado. Proceedings of the VII Avocado World Congress, Spain, 19-24 October, 2003
- Raharjo SHT, Litz RE (2005) Micrografting and *ex vitro* grafting for somatic embryo rescue and plant recovery in avocado (*Persea americana*). Plant Cell Tiss Org Cult 82:1-9
- Raharjo SHT, Litz RE (2007) Somatic embryogenesis and plant regeneration of litchi (*Litchi chinensis* Sonn.) from leaves of mature phase trees. Plant Cell Tiss Org Cult 89:113-119
- Raharjo SHT, Witjaksono, Gomez-Lim MA, Padilla G, Litz RE (2008) Recovery of avocado (*Persea americana* Mill.) plants transformed with the antifungal plant defensin gene PDF1.2. In Vitro Cell Dev Biol Plant 44:254-262
- Rall WF, Polge C (1984) Effect of warming rate on mouse embryos frozen and thawed in glycerol. J Reprod Fertil 70:285-292
- Rao AM, Sree KP, Kishor PBK (1995) Enhanced plant regeneration in grain and sweet sorghum by asparagine, proline and cefotaxime. Plant Cell Rep 15:72-75
- Ray PK (2002) Breeding tropical and subtropical fruits. Springer Verlag, Berlin
- Razdan MK, Cocking EC (1997) Biotechnology in conservation of genetic resources. In: Razdan MK, Cocking EC (eds) Conservation of plant genetic resources *in vitro*. General aspects, vol 1. Science Publishers, Inc, New Hampshire, pp 3-27
- Reed BM (1996) Pretreatment strategies for cryopreservation of plant tissues. In: Normah MN, Narimah MK and Clyde MM (eds) *In vitro* conservation of plant genetic resources. Plant Biotechnology Laboratory, Faculty of Life Sciences, University Kebangsaan Malaysia, Bangi, Selangor, Malaysia pp 73-87
- Reed BM (2008) Cryopreservation-practical considerations. In: Reed BM (ed) Plant cryopreservation: a practical guide. Springer-Science, Business Media, New York, pp 3-13
- Reed BM, Chang Y (1997) Medium- and long-term storage of *in vitro* cultures of temperate fruit and nut crops. In: Razdan MK, Cocking EC (eds). Conservation of Plant Genetic Resources In vitro. Vol 1: General Aspects, Science Publishers, Inc, New Hampshire, pp 67-105
- Reed BM, Kovalchuk I, Kushnarenko S, Meier-Dinkel A, Schoenweiss K, Pluta S, Straczynska K, Benson EE (2004) Evaluation of critical points in technology transfer of cryopreservation protocols to international plant conservation laboratories. CryoLett 25 341-352
- Reed BM, Uchendu EE (2008) Controlled Rate Cooling. In: Reed BM (ed) Plant cryopreservation: a practical guide. Springer-Science, Business Media LLC.513, New York, pp 77-88
- Reid DS (1994) Basic physical phenomena in the freezing and thawing of plant and animal tissue. In: Mallet CP (ed) Frozen food technology. Blackie Academic and Professional, Glasgow, pp 1-19
- Reinoud PJ, Van Iren F, Kijne JW (2000) Cryopreservation of differentiated plant cells. In: Engelmann F, Takagi H (eds) Cryopreservation of tropical plant germplasm-current research progress and applications. Tsukuba, JIRCAS, Rome, IPGRI, pp 91-102
- Renz A, Stitt M (1993) Substrate specificity and product inhibition of different forms of fructokinases and hexokinases in developing potato tubers. Planta 190:166-175
- Ribeiro RCS, Jekkel Z, Mulligan BJ, Cocking EC, Power JB, Davey MR, Lynch PT (1996) Regeneration of fertile plants from cryopreserved cell suspensions of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. Plant Sci 115:115-121
- Richard JP (1993) Mechanism for the formation of methylglyoxal from triosephosphates. Bioche Soc Trans 21:549-553
- Rose RJ, Nolan KE (2006) Genetic regulation of somatic embryogenesis with particular reference to *Arabidopsis thaliana* and *Medicago truncatula*. In Vitro Cell Dev Biol Plant 42:473-481

- Roy K, De S, Ray M, Ray S (2004) Methylglyoxal can completely replace the requirements of kinetin to induce differentiation of plantlets from some plant cultures. *Plant Growth Regul* 44:33-45
- Rugini E, Baldoni L (2005) *Olea europaea* Olive. In: Litz RE (ed) Biotechnology in agriculture series, n° 29. Biotechnology of fruit and nut crops. CABI Publishing, Cambridge, pp 404-428
- Saare-Surminski K, Preilb W, Knox JP, Liebereia R (2000) Arabinogalactan proteins in embryogenic and non-embryogenic callus cultures of *Euphorbia pulcherrima*. *Physiol Plant* 108:180-187
- Sagare AP, Lee YL, Lin TC, Chen CC, Tsay HS (2000) Cytokinin-induced somatic embryogenesis and plant regeneration in *Corydalis yanhusuo* (*Fumariaceae*) a medicinal plant. *Plant Sci* 160:139-147
- Sakai A (1966) Survival of a plant tissue at super-low temperature IV cell survival with rapid cooling and rewarming. *Plant Physiol* 41 1050-1054
- Sakai A, Larcher W (1987) Frost survival of plants. Springer-Verlag, Berlin
- Sakai A, Nishiyama Y (1978) Cryopreservation of winter vegetative buds of hardy fruit trees in liquid nitrogen. *HortScience* 13:225-227
- Sakai A, Kobayashi S, Oiyama I (1990) Cryopreservation of nucellar cells of navel orange (*Citrus Sinensis* Osb var *Brasiliensis* Tanaka) by vitrification. *Plant Cell Rep* 9:30-33
- Sakai A, Engelmann F (2007) Vitrification, encapsulation-vitrification and droplet-vitrification: a review. *CryoLett* 28:151-172
- Sakai A, Hirai D, Niino T (2008) Development of PVS-Based Vitrification and Encapsulation-Vitrification Protocols. In: Reed BM (ed) Plant cryopreservation: a practical guide. Springer-Science, Business Media LLC.513, New York, pp 33-59
- Salaj T, Panis B, Swennen R, Salaj J (2007) Cryopreservation of embryogenic tissues of *Pinus nigra* Arn. by a slow freezing method. *CryoLett* 28:69-76
- Salaj T, Matušiková I, Fráterová L, Piršelová B, Salaj J (2011a) Regrowth of embryogenic tissues of *Pinus nigra* following cryopreservation. *Plant Cell Tiss Org Cult* 106:55-61
- Salaj T, Matušiková I, Swennen R, Panis B, Salaj J (2011b) Long-term maintenance of *Pinus nigra* embryogenic cultures through cryopreservation. *Acta Physiol Plant*, doi:10.10007/s11738-011-0821-x
- Sales E, Nebauer SG, Arrillaga I, Segura J (2001) Cryopreservation of *Digitalis obscura* selected genotypes by encapsulation-dehydration. *Planta Medica* 67:833-838
- Samaj J, Salaj T, Matušová R, Salaj J, Takáč T, Šamajová O, Volkman D (2008) Arabinogalactan-protein epitope Gal4 is differentially regulated and localized in cell lines of hybrid fir (*Abies alba* x *Abies cephalonica*) with different embryogenic and regeneration potential. *Plant Cell Rep* 27:221-229
- Sanayaima RK, Kaur A, Agrawal A, Babbar SB (2006) Cryopreservation of *in vitro*-grown shoot tips of *Crateva nurvala* Buch. Ham, an important medicinal tree. *CryoLett* 27:375-386
- Sánchez C, Martínez MT, Valladares S, Ferro E, Vietez AM (2003) Maturation and germination of oak somatic embryos originated from leaf and stem explants: RAPD markers for genetic analysis of regenerants. *J Plant Physiol* 160:699-707
- Sánchez C, Martínez MT, Vidal N, San-José MC, Valladares S, Vietez AM (2008) Preservation of *Quercus robur* germplasm by cryostorage of embryogenic cultures derived from matures trees and RAPD analysis of genetic stability. *CryoLett* 29:493-504
- Sánchez-Colín S, Barrientos-Priego A (1987) Avocado production and breeding in Mexico. *S Afr Avocado Growers' Assoc Yearb* 10:24-26
- Sánchez-Romero C, Márquez-Martín B, Pliego-Alfaro F (2006) Somatic and zygotic embryogenesis in avocado. In: Mujib A, Samaj J (eds) Somatic embryogenesis. Plant cell monographs, vol 2. Springer-Verlag, Berlin, pp 271-284

- Sánchez-Romero C, Sweenen R, Panis B (2009) Cryopreservation of olive embryogenic cultures. *CryoLett* 30:359-372
- Sano T, Nagayama A, Ogawa T, Ishida I, Okada Y (1997) Transgenic potato expressing a double stranded RNA-specific ribonuclease is resistant to potato spindle tuber viroid. *Biotechnol* 15:1290-1294
- Sant R, Panis B, Taylor M, Tyagi A (2008) Cryopreservation of shoot-tips by droplet vitrification applicable to all taro (*Colocasia esculenta* var *esculenta*) accessions. *Plant Cell Tiss Org Cult* 92:107-111
- Sasaki K, Shimomura K, Kamada H, Harada H (1994) IAA metabolism in embryogenic and non-embryogenic carrot cells. *Plant Cell Physiol* 35:1159-1164
- Satoh S, Kamada H, Harada H, Fujii T (1986) Auxin controlled glycoprotein release into the medium of embryogenic carrot cells. *Plant Physiol* 81:931-933
- Schäfer-Menuhr A, Müller E, Mix-Wagner G (1996) Cryopreservation: an alternative for the long-term storage of old potato varieties. *Potato Res* 39:507-513
- Schiavone FM, Cooke TJ (1987) Unusual patterns of somatic embryogenesis in the domesticated carrot: developmental effects of exogenous auxins and auxin transport inhibitors. *Cell Differ* 21:53-62
- Schmidt EDL, Guzzo F, Toonen MAJ, De Vries SC (1997) A leucine-rich repeat containing receptor-like kinase marks somatic plant cells competent to form embryos. *Dev* 124:2049-2062
- Scora RW, Wolstenholme BN, Lavi U (2002) Taxonomy and botany. In: Whiley AW, Schaffer B, Wolstenholme BN (eds) *The avocado botany, production and uses*. CAB International, Wallingford, pp 15-38.
- Semancik JS, Szychowsky JA (1994) Avocado sunblotch: a persistent viroid infection in which variants are associated with differential symptoms. *J Gen Virol* 75:1543-1549
- Senula A, Keller ERJ, Sanduivav T, Yohannes T (2007) Cryopreservation of cold-acclimated mint shoot tips using a simple vitrification protocol. *CryoLett* 28:1-12
- Sepúlveda G, Sánchez de Jiménez E (1988) Polyamine distribution among maize embryogenic tissues and its relation to seed germination. *Biochem Biophys Res Commun* 16:881-887
- Serpe MD, Nothnagel EA (1994) Effects of Yariv phenylglycosides on *Rosa* cell suspensions: evidence for the involvement of arabinogalactan-proteins in cell proliferation. *Planta* 193:542-550
- Sharma N, Sharma B (2003) Cryopreservation of shoot tips of *Picrorhiza kurroa* Royal ex Benth., and indigenous endangered medicinal plant, through vitrification. *CryoLett* 24:181-190
- Sharma S, Millam S, Hein I, Bryan JG (2008) Cloning and molecular characterisation of a potato SERK gene transcriptionally induced during initiation of somatic embryogenesis. *Planta* 228:319-330
- Shi X, Dai X, Liu G, Bao M (2009) Enhancement of somatic embryogenesis in camphor tree (*Cinnamomum camphora* L.) osmotic stress and other factors affecting somatic embryo formation on hormone-free medium. *Trees* 23:1033-1042
- Shigeta J, Sato K, Mii M (1996) Effects of initial density, pH and dissolved oxygen on bioreactor production of carrot somatic embryos. *Plant Sci* 115:109-114
- Showalter AM (2001) Arabinogalactan-proteins: structure, expression and function. *Cell Mol Life Sci* 58:1399-1417
- Shualey V, Oliver DJ (2006) Metabolic and proteomic markers for oxidative stress. New tools for reactive oxygen species research. *Plant Physiol* 141:367-372
- Singh H (1978) Embryology of gymnosperms. In: Zimmerman W, Carlquist Z, Ozenda P, Wulff (eds.) *Handbuch der Pflanzenanatomie*. Gebrüder Borntraege, Berlin, pp 187-241

- Singla B, Tyagi AK, Khurana JP, Khurana P (2007) Analysis of expression profile of selected genes expressed during auxin induced somatic embryogenesis in leaf base system of wheat (*Triticum aestivum*) and their possible interactions. *Plant Mol Biol* 65:677-692
- Skene KGM, Barlass M (1983) *In vitro* culture of abscised immature avocado embryos. *Ann Bot* 52:667-672
- Slooten L, Capiou K, Van Camp W, Van Montagu M. et al. (1995) Factors affecting the enhancement of oxidative stress tolerance in transgenic tobacco overexpressing manganese superoxide dismutase in the chloroplasts. *Plant Physiol* 107:373-380
- Smith CE Jr (1969) Additional notes on pre-conquest avocados in Mexico. *Econ Bot* 23:135-140.
- Smith LA, Dann EK, Pegg KG, Whiley AW, Giblin FR, Doogan V, Kopittke RA (2011) Field assessment of avocado rootstock selections for resistance to *Phytophthora* root rot. *Aus Plant Pathol* 40:39-47
- Somleva MN, Schmidt EDL, De Vries S (2000) Embryogenic cells in *Dactylis glomerata* L. (*Poaceae*) explants identified by cell tracking and by SERK expression. *Plant Cell Rep* 19:718-726
- Staats E, Towill L, Laufmann J, Reed B, Ellis D (2006) Genebanking of vegetatively propagated crops-cryopreservation of forty-four *Mentha* accessions. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 42:45A
- Stacey GN (2004) Fundamental issues for cell-lines banks in biotechnology and regulatory affairs. In: Fuller B, Lane N, Benson EE (eds) *Life in the frozen state*. CRC Press, London, pp 437-452
- Stasolla C, Kong L, Yeung EC, Thorpe TA (2002) Maturation of somatic embryos in conifers: morphogenesis, physiology, biochemistry, and molecular biology. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 38:93-105
- Stasolla C, Yeung EC (2003) Recent advances in conifer somatic embryogenesis: improving somatic embryo quality. *Plant Cell Tiss Org Cult* 74:15-35
- Stasolla C, van Zyl L, Egertsdotter U, Craig D, Liu W, Sederoff R (2003) The effects of polyethylene glycol (PEG) on gene expression of developing white spruce somatic embryos. *Plant Physiol* 131:49-60
- Stasolla C, Belmonte MF, van Zyl L, Craig DL, Liu W, Yeung EC, Sederoff RR (2004) The effect of reduced glutathione on morphology and gene expression of white spruce (*Picea glauca*) somatic embryos. *J Exp Bot* 55:695-709
- Steinmacher DA, Cangahuala-Inocente GC, Clementi CR, Guerra MP (2007) Somatic embryogenesis from peach palm zygotic embryos. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 43:124-132
- Stenpokus PL, Lanphear FO (1962) Refinement of the triphenyl tetrazolium chloride method of determining cold injury. *Plant Physiol* 42:1423-1426.
- Stone SL, Kwong LW, Yee KM, Pelletier J, Lepiniec L, Fischer RL, Goldberg RB, Harada JJ (2001) *LEAFY COTYLEDON2* encodes a B3 domain transcription factor that induces embryo development. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:11806-11811
- Storey WB, Bergh BO, Zentmyer GA (1986) The origin, indigenous race and dissemination of the avocado. *Cal Avocado Soc Yearb* 70:127-133
- Strehlow R, Gilbert A (1993) A fate map for the first cleavages of the zebrafish. *Nature* 361:451-453
- Suárez IE, Schnell RA, Jun DN, Litz RE (2006) Recovery and indexing of avocado plants (*Persea americana*) from embryogenic nucellar cultures of an avocado sunblotch viroid-infected tree. *Plant Cell Tiss Org Cult* 84:27-37
- Sung ZR, Okimoto R (1981) Embryogenic proteins in somatic embryos of carrot. *Proc Natl Acad Sci USA* 78:3683-3687
- Suprasanna P, Bapat VA (2006) Differential gene expression during somatic embryogenesis. In: Mujib A, Samaj J (eds) *Plant cell monographs*, vol 2. Springer-Verlag, Berlin, pp 305-320

- Takeda H, Kotake T, Nakagawa N, Sakurai N, Nevins DJ (2003) Expression and function of cell wall-bound cationic peroxidase in asparagus somatic embryogenesis. *Plant Physiol* 131:1765-1774
- Tang XC, He YQ, Wang Y, Sun MX (2006) The role of arabinogalactan proteins binding to Yariv reagents in the initiation, cell developmental fate, and maintenance of microspore embryogenesis in *Brassica napus* L. cv. Topas. *J Exp Bot* 57:2639-2650
- Tautorus TE, Fowke LC, Dunstan DI (1991) Somatic embryogenesis in conifers. *Can J Bot* 69:1873-1899
- Taylor MJ (1987) Physico-chemical principles in low temperature biology. In: Grout BWW, Morris GJ (eds) *The effects of low temperatures on biological systems*. Edward Arnold Publisher, London, pp 3-71
- Taylor MJ, Song YC, Brockbank KGM (2004) Vitrification in tissue preservation: new developments. In: Fuller B, Lane N, Benson EE (eds) *Life in the frozen state*. CRC Press, London, pp 603-644
- Tepperman JM, Zhu T, Chang HS, Wang X, Quail PH (2001) Multiple transcription-factor genes are early targets of phytochrome A signaling. *Proc Natl Acad Sci* 98:9437-9442
- Teutonico RA, Dudley MW, Orr JD, Lynn DG, Binns AN (1991) Activity and accumulation of cell division-promoting phenolics in tobacco tissue culture. *Plant Physiol* 97:288-297
- Thibaud-Nissen F, Shealy RT, Khanna A, Vodkin LO (2003) Clustering of microarray data reveals transcript patterns associated with somatic embryogenesis in soybean. *Plant Physiol* 132:118-136
- Thinh NT, Takagi H, Sakai A (2000) Cryopreservation of *in vitro* grown apical meristems of some vegetatively propagated tropical monocots by vitrification. In: Engelmann F, Takagi H (eds) *Cryopreservation of tropical plant germplasm-current research progress and applications*. Tsukuba, JIRCAS, Rome, IPGRI, 2000, pp 227-232
- Thomas C, Jiménez VM (2005) Mode of action of plant hormones and plant growth regulators during induction of somatic embryogenesis: molecular aspects. In: Mujib A, Samaj J (eds) *Somatic embryogenesis*. Plant cell monographs, vol 2. Springer-Verlag, Berlin, pp 157-175
- Thomas TL (1993) Gene expression during plant embryogenesis and germination: an overview. *Plant Cell* 5:1401-1410
- Thompson HJM, Knox JP (1998) Stage-specific responses of embryogenic carrot cell suspension cultures to arabinogalactan protein-binding beta-glucosyl Yariv reagent. *Planta* 205:32-38
- Titov S, Bhowmik SK, Mandal A, Alam MS, Nasiruddin S (2006) Control of phenolic compound secretion and effect of growth regulators for organ formation from *Musa* spp. cv. Kanthali floral bud explants. *Am J Biochem Biotechnol* 2:97-104
- Tomer E, Gottreich M (1978) Abnormalities in avocado (*Persea americana* Mill.) ovule development. *Bot Gaz* 139:81-86
- Tonon G, Capuana M, Rossi C (2001) Somatic embryogenesis and embryo encapsulation in *Fraxinus angustifolia* Vhal. *J Hort Sci Biotech* 76:753-757
- Toonen MAJ, Hendriks T, Schmidt EDL, Verhoeven HA, Van Kammen A, De Vries SC (1994) Description of somatic embryo forming single-cells in carrot suspension cultures employing video cell tracking. *Planta* 194:565-572
- Toonen MAJ, Schmidt EDL, van Kammen A, De Vries SC (1997) Promotive and inhibitory effects of diverse arabinogalactan proteins on *Daucus carota* L. somatic embryogenesis. *Planta* 203:188-195
- Touchel DH, Chiang VL, Tsai CJ (2002) Cryopreservation of embryogenic cultures of *Picea mariana* (black spruce) using vitrification. *Plant Cell Rep* 21 118-124
- Towil LE, Bonnart R, Volk GM (2006) Cryopreservation of *Arabidopsis thaliana* shoot tips. *CryoLett* 27:353-360

- Tran Thi L, Pleschka E (2005) Somatic embryogenesis of some *Daucus* species influenced by ABA. *J Appl Bot Food Qual* 79:1-4
- Travert S, Valerio L, Fourasté I, Boudet AM, Teulière C (1997) Enrichment in specific soluble sugars of two eucalyptus cell-suspensions cultures by various treatments enhances their frost tolerance via a non-colligative mechanism. *Plant Physiol* 114:1433-1442
- Tremblay L, Tremblay FM (1991) Effects of gelling agents, ammonium nitrate, and light on the development of *Picea mariana* (Mill) B.S.P. (black spruce) and *Picea rubens* Sarg. (red spruce) somatic embryos. *Plant Sci* 77:233-342
- Trigiano RN, Gray DJ, Conger BV, McDaniel JK (1989) Origin of direct somatic embryos from cultured leaf segments of *Dactylis glomerata*. *Bot Gaz* 150:72-77
- Tsai CJ, Hubscher SL (2004) Cryopreservation in *Populus* functional genomics. *New Phytol* 164:73-81
- Tsai SF, Yeh SD, Chan CF, Liaw SI (2009) High-efficiency vitrification protocols for cryopreservation of *in vitro* grown shoot tips of transgenic papaya lines. *Plant Cell Tiss Org Cult* 98:157-164
- Tsukahara M, Komamine A (1997) Separation and analysis of cell types involved in early stages of carrot somatic embryogenesis. *Plant Cell Tiss Org Cult* 47:145-151
- Tyler N, Stushnoff C (1988) Dehydration of dormant apple buds at different stages of cold acclimation to induce cryopreservability in different cultivars. *Can J Plant Sci* 68:1169-1176
- Uchendu EE, Reed BM (2008) A comparative study of three cryopreservation protocols for effective storage of *in vitro*-grown mint (*Mentha* spp.). *CryoLett* 29:181-188
- Umehara M, Ogita S, Sasamoto H, Koshino H, Asami T, Fujioka S, Yoshida S, Kamada H (2005) Identification of a novel factor, vanillyl benzyl ether, which inhibits somatic embryogenesis of Japanese larch (*Larix leptotelis* Gordon). *Plant Cell Physiol* 46:445-453
- Valladares S, Toribio M, Celestino C, Vieitez AM (2004) Cryopreservation of embryogenic cultures from mature *Quercus suber* trees using vitrification. *CryoLett* 25:177-186
- Vander-Mijnsbrugge K, Beeckman H, Rycke RD, Van Montagu M, Engler G, Boerjan W (2000) Phenylcoumaran benzylic ether reductases, a prominent poplar xylem protein, is strongly associated with phenylpropanoid biosynthesis in lignifying cells. *Planta* 211:502-509
- Van Engelen FA, De Vries (1992) Extracellular proteins in plant embryogenesis. *Trends Genet* 8:66-70
- Van Hengel AJ, Tadesse Z, Immerzeel P, Schols H, Van Kammen A, De Vries SC (2001) N-acetylglucosamine and glucosamine-containing arabinogalactan proteins control somatic embryogenesis. *Plant Physiol* 125:1880-1890
- Van den Houwe I, Andre E, Swennen R, Panis B (2011) *In vitro* conservation and cryopreservation of banana: a model for Stevia? In: "Stevia:Break-Through in Europe" Proceedings of the 5th Stevia Symposium 2011 organized by EUSTAS 28-29 June 2011, Leuven, Belgium.
- Van Zyl L, von Arnold S, Bozhkov P, Chen Y, Egertsdotter U, MacKay J, Sederoff R, Weir B, Shen J, Whetten R, Zelena L, Clapham D (2002) Heterologous array analysis in *Pinaceae*: hybridization of high density arrays of *Pinus taeda* cDNA with cDNA from needles and embryogenic cultures of *P.taeda*, *P.sylvestris* and *Picea abies*. *Comp Funct Genom* 3:306-318
- Vendrame WA, Holliday CP, Montello PM, Smith DR, Merkle S (2001) Cryopreservation of yellow-poplar and sweetgum embryogenic cultures. *New Forest* 21:283-292
- Vengadesan G, Ganapathi A, Ramesh Anbazhagan V, Prem Ananad R (2002) Somatic embryogenesis in cell suspension cultures of *Acacia sinuata* (Lour.) Merr. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 38:52-57
- Vengadesan G, Pijut PM (2009) Somatic embryogenesis and plant regeneration of northern red oak (*Quercus rubra* L.) *Plant Cell Tiss Org Cult* 97:141-149

- Vila SK, Rey HY, Mroginski LA (2007) Factors affecting Somatic Embryogenesis Induction and Conversion in "Paradise Tree" (*Melia azedarach* L.). *J Plant Growth Regul* 26:268-277
- Volk GM, Caspersen AM (2007) Plasmolysis and recovery of different cell types in cryoprotected shoot tips of *Mentha x piperita*. *Protoplasma* 231:215-226
- Von Arnold S (2008) Somatic embryogenesis. In: George EF, Hall MA, De Klerk GJ (eds) *Plant propagation by tissue culture. The background*, 3rd ed, vol 1. Springer, Dordrecht, pp 335-355
- Von Arnold S, Sabala I, Bozhkov P, Dyachok J, Filonova LH (2002) Developmental pathways of somatic embryogenesis. *Plant Cell Tiss Org Cult* 69:233-249
- Von Arnold S, Bozhkov P, Clapham D, Dyachok J, Filonova L, Högeberg KA, Ingouff M, Wiweger M (2005) Propagation of Norway spruce via somatic embryogenesis. *Plant Cell Tiss Org Cult* 81:323-329
- Vrinten PL, Nakamura T, Kasha KJ (1999) Characterization of cDNAs expressed in early stages of microspore embryogenesis in barley (*Hordeum vulgare*) L. *Plant Mol Biol* 41:455-463
- Walsh DA, Sallach HJ (1966) Comparative studies on the pathways for serine biosynthesis in animal tissues. *J Biol Chem* 241:4068-4076
- Wang Q, Batuman O, Li P, Bar-Joseph M, Gafny R (2002a) A simple and efficient cryopreservation of *in vitro* grown shoot tips of 'Troyer' citrange (*Poncirus trifoliata* (L.) Raf. x *Citrus sinensis* (L.) Osbeck) by encapsulation-vitrification. *Euphytica* 128:135-142
- Wang Q, Gafny R, Sahar N, Sela I, Mawassi M, Tanne E, Perl A (2002b) Cryopreservation of grapevine (*Vitis vinifera* L.) embryogenic cell suspensions by encapsulation-dehydration and subsequent plant regeneration. *Plant Sci* 162:551-558
- Wang ZY, Legris G, Nagel J, Potrykus I, Spangenberg G (1994) Cryopreservation of embryogenic cell suspensions in *Festuca* and *Lolium* species. *Plant Sci* 103:93-106
- Warren GS, Fowler MW (1981) Physiological interactions during the initial stages of embryogenesis in cultures of *Daucus carota* L. *New Phytol* 87:481-486
- Webster FB, Roberts DR, McInnis SM, Sutton BCS (1990) Propagation of interior spruce by somatic embryogenesis. *Can J For Res* 20:1759-1765
- Weigel U, Horn W, Hock B (1984) Endogenous auxin levels in terminal stem cuttings of *Chrysanthemum morifolium* during adventitious rooting. *Physiol Planta* 61:422-428
- Whiley AW (1992) *Persea americana* Miller. In: Verheij EWM, Coronel RE (eds) *Plant resources of south-east Asia n° 2, edible fruits and nuts*. Pudoc-DLO, Wageningen, pp 249-254
- Whiley AW, Schaffer B (1994) Avocado. In: Shaffer B, Andersen PC (eds) *Handbook of environmental physiology of fruit crops, vol 2. Sub-tropical and tropical crops*. CRC Press, Boca Raton, Florida, pp 3-35
- Whiley A, Giblin F, Pegg K, Whiley D (2007). Preliminary results from avocado rootstock research in Australia. *Proceedings of the VI World Avocado Congress, Chile, 12-16 November, 2007*
- Widholm JM (1972) The use of fluorescein diacetate and phenosafranine for determining viability of cultured plant cells. *Stain Technol* 47:189-194
- Williams EG, Maheswaran G (1986) Somatic embryogenesis: factors influencing coordinated behaviour of cells as an embryogenic group. *Ann Bot* 57:433-462
- Winkelmann T, Mußmann V, Serek M (2004) Cryopreservation of embryogenic suspension cultures of *Cyclamen persicum* Mill. *Plant Cell Rep* 23:1-8
- Winkelmann T, Heintz D, Van Dorsseleer A, Serek M, Braun HP (2006) Proteomic analyses of somatic and zygotic embryos of *Cyclamen persicum* Mill. Reveal new insights into seed and germination physiology. *Planta* 224:508-519

- Withers LA (1975) Freeze preservation of cultured cells and tissues. In: Thorpe TA (ed) *Frontiers of plant tissue culture*. International Association of Plant Tissue Culture, University of Calgary, Calgary, Alberta, Canada, pp 297-309
- Withers LA (1979) Freeze preservation of somatic embryos and clonal plantlets of carrot (*Daucus carota*). *Plant Physiol* 63:460-467
- Withers LA, King PJ (1980) A simple freezing unit and routine cryopreservation methods for plant cell cultures. *CryoLett* 1:213-220
- Withers LA, Engelmann F (1998) *In vitro* conservation of plant genetic resources. In: Altman A (ed) *Biotechnology in agriculture*. Marcel Dekker Inc, New York, pp 57-88
- Witjaksono (1997) Development of protocols for avocado tissue culture: somatic embryogenesis, protoplast culture, shoot proliferation and protoplast fusion. Dissertation, University of Florida
- Witjaksono, Litz RE (1999a) Induction and growth characteristics of embryogenic avocado cultures. *Plant Cell Tiss Org Cult* 58:19-29
- Witjaksono, Litz RE (1999b) Maturation of avocado somatic embryos and plant recovery. *Plant Cell Tiss Org Cult* 58:141-148
- Witjaksono, Litz RE, Pliego-Alfaro F (1999) Somatic embryogenesis of avocado (*Persea americana* Mill.) In: Jain SM, Gupta PK, Newton RJ (eds) *Somatic embryogenesis in woody plants*, vol 5. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp 197-214
- Witjaksono, Litz RE (2004) Effect of gamma irradiation on embryogenic avocado cultures and somatic embryo development. *Plant Cell Tiss Org Cult* 77:139-147
- Wu YJ, Huang XL, Xiao JN, Li XJ, Zhou MD, Engelmann F (2003) Cryopreservation of mango (*Mangifera indica* L.) embryogenic cultures. *CryoLett* 24:303-314
- Wu YJ, Huang XL, Chen QZ, Li XJ, Engelmann F (2007) Induction and cryopreservation of embryogenic cultures from nucelli and immature cotyledon cuts of mango (*Mangifera indica* L. Var Zihua). *Plant Cell Rep* 26:161-168
- Xu C, Sibicky T, Huang B (2010) Protein profile analysis of salt-responsive proteins in leaves and roots in two cultivars of creeping bentgrass differing in salinity tolerance. *Plant Cell Rep* 29:595-615
- Xu N, Coulter KM, Bewley JD (1990) Abscisic acid and osmoticum prevent germination of developing alfalfa embryos, but only osmoticum maintains the synthesis of developmental proteins. *Planta* 182:382-390
- Yang X, Zhang X (2010) Regulation of somatic embryogenesis in higher plants. *Cr Rev in Plant Sci* 29:36-57
- Yeung EC (1995) Structural and development patterns in somatic embryogenesis. In: Thorpe TA (ed) *In vitro* embryogenesis in plants. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp 205-247
- Yu TA, Yeh SD, Yang JS (2001) Effects of carbenicillin and cefotaxime on callus growth and somatic embryogenesis from adventitious roots of papaya. *Bot Bul Acad Sinica* 42:281-286
- Zarsky V, Garrido D, Eller N, Tupy J, Vicente O, Schöffl F, Heberle-Bors E (1995) The expression of a small heat shock gene is activated during induction of tobacco pollen embryogenesis by starvation. *Plant Cell Environ* 18:139-147
- Zavattieri MA, Frederico AM, Lima M, Sabino R, Arnholdt-Schmitt B (2010) Induction of somatic embryogenesis as an example of stress-related plant reactions. *Electron J Biotechnol* 13:1-9
- Zelena E (2000) The effect of light on metabolism of IAA in maize seedlings. *Plant Growth Regul* 30:23-29
- Zeng F, Zhang X, Cheng L, Hu L, Zhu L, Cao J, Guo X (2007) A draft gene regulatory network for cellular totipotency reprogramming during plant somatic embryogenesis. *Genomics* 90:620-628

- Zhaj Z, Wu Y, Engelmann F, Chen R, Zhao Y (2003) Genetic stability assessments of plantlets regenerated from cryopreserved *in vitro* cultured grape and kiwi shoot-tips using RAPD. *CryoLett* 24:315-322
- Zhang CX, Li Q, Kong L (2007) Induction, development and maturation of somatic embryos in Bunge's pine (*Pinus bungeana* Zucc. Ex Endl.) *Plant Cell Tiss Org Cult* 91:273-280
- Zhang J, Ma H, Chen S, Ji M, Perl A, Kovacs L, Chen S (2009) Stress response proteins differential expression in embryogenic and non-embryogenic callus of *Vitis vinifera* L. cv. Cabernet Sauvignon-A proteomic approach. *Plant Sci* 11:103-113
- Zhang S, Wong L, Meng L, Lemaux PG (2002) Similarity of expression patterns of *knotted1* and *ZmLEC1* during somatic and zygotic embryogenesis in maize (*Zea mays* L.). *Planta* 215:191-194
- Zhang S, Nichols SE, Donh JG (2003) Cloning and characterization of two fructokinases from maize. *Plant Sci* 165:1051-1058
- Zhang S, Zhou J, Han S, Yang W, Li W, Wei H, Li X, Qi L (2010) Four abiotic stress-induced miRNA families differentially regulated in the embryogenic and non-embryogenic callus tissues of *Larix leptoleis*. *Biochem Bioph Res Co* 398:355-360
- Zhu D, Scandalios JG (1993) Maize mitochondrial manganese superoxide dismutases are encoded by a differentially expressed multigene family. *Proc Natl Acad Sci* 90:9310-9314
- Zimmerman JL (1993) Somatic embryogenesis: a model for early development in higher plants. *Plant Cell* 5:1411-1423

