



INSTITUTO NACIONAL AUTÓNOMO DE INVESTIGACIONES
AGROPECUARIAS
ESTACIÓN EXPERIMENTAL SANTA CATALINA

FECHA DE PRESENTACIÓN: Agosto 2012

ESTACIÓN EXPERIMENTAL: Santa Catalina

PROGRAMA/DEPARTAMENTO: Biotecnología

PROYECTO: BIOTECNOLOGÍA-Fortalecimiento

ACTIVIDAD: Evaluación de las etapas de formación de la embriogénesis somática en las variedades Duke7 y Puebla de aguacate (*Persea americana* Mill.) a partir de tejido nucelar, foliar y embriones cigóticos inmaduros

UBICACIÓN: Provincia: Pichincha
Cantón: Mejía
Parroquia: Cutuglagua

AUTORA: Egda. Vinueza Espinosa Diana Carolina

COAUTORES: Ing. Jacqueline Benítez
Dr. Eduardo Morillo

COLABORADORES: Programa de Fruticultura (Granja Tumbaco)
Escuela de Biología (PUCE)

DURACIÓN: 12 meses

FECHA DE INICIO: Julio2012

FECHA DE TERMINACIÓN: Julio2013

PRESUPUESTO: 4448.74 USD

FINANCIAMIENTO: INIAP 100%

1. ANTECEDENTES

El aguacate (*Persea americana* Mill.) es una especie frutal perteneciente a la familia Lauracea, originaria de México y Centro América, principalmente de Guatemala, donde ha sido cultivada desde la antigüedad (Popenoe, 1920; Purseglove, 1968, citado por Suárez *et al.*, 2004). Debido a su alto valor nutricional (Colquhoun, 1990, citado por Suárez *et al.*, 2004), su uso como materia prima llega desde la producción mundial hasta la elaboración de productos de uso cosmético (Fajardo, 2005). Según datos de la FAO al 2010 el área sembrada de aguacate en todo el mundo es de 423824 hectáreas con una producción mundial total de 3.6 millones ton/año. El país productor pionero de aguacate con el 32% de la producción mundial es México; seguido de Estados Unidos e Indonesia que reportaron para el mismo año una producción de 0.25 millones de toneladas cada uno, lo que representó el 7.4% de la producción mundial. En tercer lugar se encuentra Colombia con una producción de 0.20 millones de toneladas lo cual aportó el 6.0% de la producción mundial (FAOSTAT, 2010 citado por Iles, 2011). En el Ecuador la producción reportada en el 2010 fue de 27400 toneladas en el 2010, lo que representa el 0.8% de la producción mundial llegando a ser una de las frutas más consumidas con una alta aceptación en el mercado nacional (CICO, 2010).

En la actualidad el programa de Fruticultura del INIAP, produce portainjertos de aguacate (Duke 7, Puebla, Mexícola entre otros) resistentes a la pudrición de raíz y a salinidad utilizando métodos de propagación convencional que consisten en la adquisición de frutos y en la extracción de la semilla para luego ser trasplantadas a fundas hasta que la planta alcance el grosor del tallo similar al diámetro de un lápiz, y seguido a esto sea utilizada como patrón de las variedades comerciales¹.

El problema de utilizar semillas de portainjertos en plantaciones comerciales es la polinización cruzada que dan origen a estas, por lo que las plantas que se obtienen por este método son diferentes a la planta madre, y la entrada en producción es más tardía. Asimismo, la alta demanda en el sector productivo de patrones resistentes a *Phytophthora cinnamomy* a la salinidad de suelos y aguas, hace necesario el uso de técnicas modernas que permitan la clonación masiva y rápida de patrones de aguacate (Castro *et al.*, 2003).

El uso de alternativas biotecnológicas como la organogénesis y embriogénesis somática han sido empleadas en los últimos años para obtener una propagación masiva y mejoramiento genético en más de 200 especies de importancia agronómica entre ellas incluyendo a especies forestales (Parrot, 2002). Según Reinert, (1958) ; Steward *et al.*, (1958) citado por Freire, (2003) la embriogénesis somática *in vitro* es posible debido a que cualquier tejido vegetal tiene la capacidad de desarrollarse en un embrión (totipotencia) gracias a la naturaleza bipolar del embrión y la facilidad con que puede ser automatizado todo el proceso productivo, generando altos coeficientes de multiplicación en cortos periodos de tiempo a través de la manipulación de las condiciones de cultivo y la aplicación de reguladores de crecimiento. En base a esta información Pliego-Alfaro (1981) por primera vez indujo la formación de cultivos embriogénicos a partir de embriones cigóticos inmaduros en aguacate (*Persea americana* Mill.) siguiendo cuatro etapas para la formación de embriogénesis somática como son: inducción, mantenimiento, desarrollo-maduración y germinación (Witjaksono & Litz, 1999 a).

Con este antecedente, el INIAP ejecutó un proyecto que buscó generar alternativas biotecnológicas para la producción en gran escala de patrones de aguacate (*Persea americana* Mill.) de alta calidad genética y fitosanitaria dando como resultado que la fase de multiplicación vía organogénesis demostró problemas de contaminación, alta mortandad, falta de crecimiento del material, oxidación y necrosis apical (corroborando a Harty, 1985; Cooper, 1987; Schall, 1987). En la fase de multiplicación vía embriogénesis somática empleando como explantes tejido nucelar y tejido foliar se obtuvo como resultado la formación de callos embriogénicos en dos variedades de aguacate (Mexícola, Duke 7) convirtiéndose estas dos variedades en promisorias para el empleo de la tecnología mencionada además de tener buenas expectativas en relación a la obtención de embriones somáticos como paso fundamental para la generación de plantas somáticas de aguacate. Se indicó sin embargo que para alcanzar dicho objetivo, se requería continuar con la investigación, siendo necesario evaluar las posteriores etapas de formación de la embriogénesis somática desde el punto de vista histológico. En efecto la histología es

una técnica usada frecuentemente para mejorar los protocolos de embriogénesis somática ya que facilitan la comprensión del proceso que conduce a un tejido a adquirir sus potencialidades embriogénicas y a entender de mejor manera los cambios estructurales que dan lugar a la embriogénesis somática (González *et al.*, 2005).

2. JUSTIFICACIÓN

Las podredumbres de la raíz causadas por *Phytophthora cinnamomi* y la sensibilidad a salinidad son un serio problema en las plantaciones de los cultivares comerciales de aguacate. Debido a la alta demanda de patrones resistentes, y a las limitaciones de las técnicas en vivero, se hace necesario el desarrollo de técnicas alternativas como las biotecnológicas que permitan la clonación masiva y rápida de patrones seleccionados.

En la actualidad el INIAP ha desarrollado investigación con este propósito evaluando la multiplicación o regeneración vía embriogénesis somática, de patrones resistentes como: Mexícola, Puebla y Duke 7 a partir de tejido nucelar y tejido foliar. Para este fin, en una primera etapa se indujo la formación de callos en medios de cultivo diferentes. En vista de los resultados alcanzados a la fecha, se hace necesario continuar con la investigación evaluando histológicamente y morfológicamente las etapas de formación de la embriogénesis somática en aguacate (Inducción, Mantenimiento, Desarrollo-Maduración y Germinación), debido a que el desconocimiento que existe sobre los parámetros que regulan este proceso, la alta capacidad recalcitrante y la baja homogeneidad genética del material vegetal producido, a partir de embriones cigóticos inmaduros como explante, hace necesario la evaluación de esta técnica para la micropropagación masiva en los patrones de aguacate seleccionados.

Los resultados ayudarán a comprender los procesos que conducen a un tejido a adquirir sus potencialidades embriogénicas, así como a entender de mejor manera los cambios estructurales que dan lugar a la embriogénesis somática teniendo así embriones que puedan ser destinados a programas de mejoramiento para reducir su alta capacidad recalcitrante; además que sin el seguimiento histológico detallado, la posible formación del embrión somático solo puede ser confirmada por la germinación.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL.

Evaluar las etapas de formación de la embriogénesis somática en las variedades Duke 7 y Puebla de aguacate (*Persea americana Mill*) a partir de tejido nucelar, foliar y embriones cigóticos inmaduros.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Evaluar la capacidad de Inducción, Mantenimiento, Desarrollo-Maduración y Germinación de los diferentes medios de cultivo a ser utilizados en la posible formación de embriones somáticos en las variedades Duke 7 y Puebla.
2. Evaluar la capacidad de formación de embriones somáticos de los tipos de explantes (tejido nucelar, foliar y embriones cigóticos inmaduros) a ser utilizados.
3. Comparar histológicamente las posibles estructuras embriogénicas formadas en cada estadio de desarrollo de embriones somáticos formados a partir de tejido nucelar, foliar y embriones cigóticos inmaduros.

4. HIPÓTESIS

Ho: No existe capacidad de deformación de embriones somáticos, sometidos a diferentes medios de cultivo, a partir de tejido nucelar, tejido foliar y embriones cigóticos inmaduros, en las dos variedades de aguacate (Duke 7 y Puebla)

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 MATERIALES

5.1.1 Materiales de laboratorio

- Tubos de ensayo
- Cajas Petri
- Probetas
- Pipetas
- Erlenmeyer
- Bisturís
- Pinzas
- Mechero
- Agitador
- Agua destilada y esterilizada
- Alcohol
- Fósforos
- Guantes
- Mascarilla
- Cinta rollopac
- Parafilm
- Beaker
- Portaobjetos
- Cubreobjetos
- Malla de 1.8 mm
- Moldes de aluminio 2x2 cm

5.1.2 Reactivos

- Medio Murashige y Skoog (MS)
- Ácido ascórbico (C₆H₈O₆)
- Tiamina (HCl)
- Myo-Inositol
- Ácido Indol Butírico (IBA)
- Agar
- Agua de coco
- Picloram
- Alcohol potable
- Carbón activado
- Sacarosa
- Bencilaminopurina (BAP)
- Formol
- Ácido Acético
- Alcohol Etílico
- Alcohol Anhidro
- Xilol
- Parafina
- Albumina
- Azul de Toluidina
- Bálsamo de Canadá Sintético

5.1.3 Equipos de laboratorio

- Cámara de flujo laminar
- Cuarto de crecimiento
- Destilador de agua
- Autoclave
- pHmetro
- Micrótopo
- Estufa
- Plancha de calentamiento
- Balanza de precisión
- Lámpara
- Refrigerador
- Calefactor
- Humidificador
- Estufa

5.1.4 Materiales y equipos de oficina

- Resmas de papel bond
- Computador
- Impresora
- Marcadores y lapiceros
- Cámara de fotos

5.2 METODOLOGÍA

5.2.1 Características de los sitios experimentales

5.2.1.1 Ubicación

La investigación se llevará a cabo en el invernadero y en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos del Departamento de Biotecnología de la Estación Experimental Santa Catalina del INIAP.

5.2.1.2 Características del lugar

Estación Experimental Santa Catalina¹

Provincia:	Pichincha
Cantón:	Mejía
Parroquia:	Cutuglagua
Latitud:	00°22'00" S
Longitud:	79° 32'00" W
Altitud:	3058m
Temperatura promedio Anual:	12.04°C
Precipitación promedio Anual:	1487 mm
Humedad relativa:	79%
Precipitación promedio Anual:	< 2000 mm

5.2.1.3 Condiciones experimentales de laboratorio

Temperatura promedio:	25±2°C
Horas Luz:	16
Intensidad de Luz:	9.4 $\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$

5.2.1.4 Condiciones de invernadero

Temperatura promedio:	25±2°C
Humedad relativa:	80 %

5.2.1.5 Fases del experimento

Las fases de experimento se dividirán en cuatro las cuales son:

¹Datos proporcionados por la Estación Meteorológica Zumbamba, perteneciente al Instituto Nacional de Meteorología e Hidrología (INAMHI), 2012

Fase I: Se introducirá el material vegetal (tejido nucelar, tejido foliar y embriones cigóticos inmaduros) en los diferentes medios de cultivo a utilizarse y se inducirá la formación de callos embriogénicos.

Fase II: Los callos embriogénicos obtenidos en la fase I a partir de tejido nucelar, foliar y embriones cigóticos inmaduros pasarán a la fase II en la cual se mantendrán y proliferarán los callos embriogénicos hasta la posible formación de embriones somáticos en medios de cultivo sólidos y líquidos.

Fase III: Los posible embriones somáticos formados en la fase II se desarrollarán y maduran en la fase III en diferentes medios de cultivo semisólidos.

Fase IV: Los embriones somáticos maduros formados posiblemente en la fase III pasarán a la fase IV para su posterior germinación.

5.2.2 Factores de Estudio

FASE I: Inducción de callos embriogénicos

a) Tipos de explantes (E).

Se utilizarán tres tipos de explantes:

- e_1 = Tejido nucelar
- e_2 = Tejido foliar
- e_3 = Embriones cigóticos inmaduros

b) Variedades de aguacate (V).

Se utilizará dos variedades de aguacate:

- v_1 = Duke 7.
- v_2 = Puebla

c) Medios de cultivo para Inducción de callos (M_{IC}) (Ver anexo 1).

Se utilizarán dos medios de cultivo para inducir callos embriogénicos en aguacate.

- m_{IC1} (Mejía, 1994)
- m_{IC2} (Modificado de Dalsasoy Guevara, 1989)

5.2.3 Tratamientos

Cuadro 1. Tratamientos para la Etapa de Inducción de Callos Embriogénicos en dos variedades de Aguacate (*Persea Americana* Mill.), INIAP, Cutuglagua – Pichincha, 2012.

ORDEN	SÍMBOLO	CÓDIGO	TRATAMIENTO
1	t_1	$e_1 v_1 m_{IC1}$	Tejido nucelar de Duke 7 en medio MS suplementado con: 100 mg l^{-1} Myo-Inositol, 0.4 mg l^{-1} Tiamina-HCL, 0.1 mg l^{-1} Picloram, 30 g l^{-1} Sucrosa, 0.1 % Carbón activado, 30 g l^{-1} Sucrosa y 8 g l^{-1} Agar.
2	t_2	$e_1 v_1 m_{IC2}$	Tejido nucelar de Duke 7 en medio MS 75% suplementado con: 2 mg l^{-1} BAP, 0.5 mg l^{-1} AIB, 30 g l^{-1} Sucrosa y 8 g l^{-1} Agar.
3	t_3	$e_1 v_2 m_{IC1}$	Tejido nucelar de Puebla en medio MS suplementado con: 100 mg l^{-1} Myo-Inositol, 0.4 mg l^{-1} Tiamina-HCL, 0.1 mg l^{-1} Picloram, 30 g l^{-1} Sucrosa, 0.1 % Carbón activado, 30 g l^{-1} Sucrosa y 8 g l^{-1} Agar.

4	t ₄	e ₁ v ₂ m _{1C2}	Tejido nucelar Puebla en medio MS 75% suplementado con: 2 mg l ⁻¹ BAP, 0.5 mg l ⁻¹ AIB, 30 g l ⁻¹ Sucrosa y Agar 8 g l ⁻¹
5	t ₅	e ₂ v ₁ m _{1C1}	Tejido foliar de Duke 7 en medio MS suplementado con: 0.1 mg l ⁻¹ Picloram, 0.4 mg l ⁻¹ Tiamina-HCL, 100 mg l ⁻¹ Myo-Inositol, 0.1 % Carbón activado, 30 g l ⁻¹ Sucrosa y 8 g l ⁻¹ Agar.
6	t ₆	e ₂ v ₁ m _{1C2}	Tejido foliar de Duke 7 en medio MS 75% suplementado con: 2 mg l ⁻¹ BAP, 0.5 mg l ⁻¹ AIB, 30 g l ⁻¹ Sucrosa y 8 g l ⁻¹ Agar.
7	t ₇	e ₂ v ₂ m _{1C1}	Tejido foliar de Puebla en medio MS suplementado con: 100 mg l ⁻¹ Myo-Inositol, 0.4 mg l ⁻¹ Tiamina-HCL, 0.1 mg l ⁻¹ Picloram, 30 g l ⁻¹ Sucrosa, 0.1 % Carbón activado, 30 g l ⁻¹ Sucrosa y 8 g l ⁻¹ Agar
8	t ₈	e ₂ v ₂ m _{1C2}	Tejido foliar de Puebla en medio MS 75% suplementado con: 2 mg l ⁻¹ BAP, 0.5 mg l ⁻¹ AIB, 30 g l ⁻¹ Sucrosa y 8 g l ⁻¹ Agar.
9	t ₉	e ₃ v ₁ m _{1C1}	Embriones cigotos inmaduros de Duke 7 en medio MS suplementado con: 100 mg l ⁻¹ Myo-Inositol, 0.4 mg l ⁻¹ Tiamina-HCL, 0.1 mg l ⁻¹ Picloram, 30 g l ⁻¹ Sucrosa, 0.1 % Carbón activado, 30 g l ⁻¹ Sucrosa y 8 g l ⁻¹ Agar.
10	t ₁₀	e ₃ v ₁ m _{1C2}	Embriones cigotos inmaduros de Duke 7 en medio MS 75% suplementado con: 2 mg l ⁻¹ BAP, 0.5 mg l ⁻¹ AIB, 30 g l ⁻¹ Sucrosa y 8 g l ⁻¹ Agar.
11	t ₁₁	e ₃ v ₂ m _{1C1}	Embriones cigotos inmaduros de Puebla en medio MS suplementado con: 0.1 mg l ⁻¹ Picloram, 0.4 mg l ⁻¹ Tiamina-HCL, 100 mg l ⁻¹ Myo-Inositol, 0.1 % Carbón activado, 30 g l ⁻¹ Sucrosa y 8 g l ⁻¹ Agar.
12	t ₁₂	e ₃ v ₂ m _{1C2}	Embriones cigotos inmaduros de Puebla en medio MS 75% suplementado con: 2 mg l ⁻¹ BAP, 0.5 mg l ⁻¹ AIB, 30 g l ⁻¹ Sucrosa y 8 g l ⁻¹ Agar.

5.2.4 Unidad experimental

La unidad experimental estará conformada por: una caja Petri de 60 mm de diámetro por 15 mm de alto, conteniendo cinco nucelas o cinco embriones cigotos inmaduros o cinco segmentos de hojas de plantas de invernadero en 10 ml de medio semisólido.

5.2.5 Diseño experimental

Se utilizará un Diseño Completamente al Azar (DCA) dispuesto en arreglo factorial 3 x 2 x 2 (tres tipos de explantes por dos variedades de aguacate por dos medios de cultivo) con 5 observaciones o repeticiones por cada tratamiento.

5.2.6 Análisis Estadístico

El esquema del Análisis de Varianza (ADEVA) se presenta a continuación:

Cuadro 2. ADEVA para la Etapa de Inducción de callos embriogénicos de dos variedades de aguacate (*Persea americana* Mill.) a partir de tejido nucelar, foliar y embriones cigóticos inmaduros en dos medios de cultivos, INIAP, Cutuglagua – Pichincha 2012.

Fuente de Variación (F de V)	Grados de Libertad (GL)
Total	59
Tratamientos	11
Tipo de explante (E)	2
Variedades (V)	1
E x V	2
Medios de cultivo (M)	1
E x M	2
V x M	1
E x V x M	2

Error Experimental	48
PROMEDIO	
CV (%)	

5.2.7 Análisis funcional

5.2.7.1 Pruebas de significación

Al encontrar diferencias estadísticas significativas en los factores en estudio y su interacción, se realizará pruebas de Tukey al 5% para tratamientos y explantes y Diferencia Mínima Significativa (DMS) al 5% para variedades y medios de cultivo.

5.2.8 Variables y métodos de evaluación

- Consistencia del callo: Número de Callos Tipo I y Número de Callos tipo II.

La consistencia de los callos se caracterizará como: Callo tipo I (Frágil) o Callo tipo II (Compacto o embriogénicos) mediante el tacto con la ayuda de una pinza, observación bajo el estereomicroscopio e histología (Anexo 6-10) a la cuarta, quinta y sexta semana, luego de haber sembrado los explantes en medio de inducción (M_{ic}).

- Peso fresco de callos o cultivos embriogénicos.

Se determinará el peso fresco en gramos (g) de una muestra significativa de callos; esto se lo realizará con la ayuda de una balanza analítica a la segunda, tercera, cuarta y quinta semana luego haber introducido los explantes en medio de inducción (M_{ic}).

- Porcentaje de callos con células proembriogénicas (%).

Se determinará el porcentaje de callos con células proembriogénicas mediante la aplicación de un protocolo de histología (Anexo 6-10) a la primera, segunda, tercera, cuarta y quinta semana.

5.2.9 Manejo específico del experimento

Para la inducción de callos embriogénicos se realizara lo siguiente:

a) Colecta de frutos inmaduros

La recolección de frutos inmaduros; para el caso de las variedades Duke 7 y Puebla se realizará en la Granja Experimental de Tumbaco.

El número de frutos será de 300 para cada variedad y el tamaño para todos los casos estará comprendido entre 0.46 cm de diámetro por 1.27cm de largo.

b) Desinfección de frutos inmaduros y obtención de tejido nucelar, embriones cigóticos inmaduros y tejido foliar para la inducción de callos embriogénicos

Desinfección de frutos inmaduros e introducción de tejido nucelar y embriones cigóticos inmaduros.

Una vez obtenidos los frutos inmaduros se procederá a realizar una desinfección de estos de la siguiente manera (Suárez *et al.*, 2004 citados por Iles, 2011):

Los frutos sin pétalos y sépalos serán lavados con agua corriente y detergente. Después del enjuague, los frutos se desinfectarán superficialmente por 20 min en una solución de agua de la llave esterilizada con el 1% de cloro comercial (5%). A continuación estos serán llevados a la cámara de flujo laminar para realizar una segunda desinfección en una solución al 1.25% (v/v) de hipoclorito de sodio con 5 gotas de Tween 20 y se enjuagarán tres veces con agua destilada y esterilizada. Seguidamente, los frutos se cortarán longitudinalmente y se extraerá los embriones cigóticos inmaduros y las nucelas adheridos a los integumentos posteriormente estos serán sumergidos en una solución de Ác. Ascórbico a una concentración de 400 ppm durante 5 segundos para luego ser introducidos en los medios de cultivo para inducción de callos embriogénicos (Anexo 1) a 25° C y oscuridad.

Desinfección de hojas de invernadero e introducción de segmentos de tejido foliar.

Se procederá a la extracción de tejido foliar de las plantas de invernadero para luego someterlos a un método de desinfección que consiste en colocar las hojas en agua esterilizada con povidin durante 2 horas y agitación constante, pasada las 2 horas se desecharán la solución de povidin y se colocarán las hojas en agua esterilizada con cloro al 1% por 1 hora. A continuación los explantes de hojas serán llevados a la cámara de flujo laminar en donde se realizará cuatro enjuagues con agua esterilizada y un enjuague con agua destilada. Seguidamente, las hojas se cortarán en tamaños de 1x1 cm para luego ser introducidos en cajas Petri con 10 ml de medio de cultivo para la inducción de callos embriogénicos (Anexo 1) a 25°C y oscuridad.

c) Histología

Se realizará un protocolo histológico (Modificado González, 2006) (Anexo 2) a la primera, segunda, tercera y cuarta semana después de introducido el material vegetal en los diferentes medios de cultivo para inducción a ser utilizados.

d) Toma de datos

La recolección de los datos se realizará a partir de la primera semana luego de haber colocado los explantes en los medios de inducción y dependiendo de cada variable.

5.2.10 Factores de Estudio

FASE II: Mantenimiento de callos embriogénicos

a) Callos embriogénicos obtenidos a partir de tipo de explante (CE)

Se utilizará callos con características embriogénicas obtenidas en la fase de inducción.

ce_1 = Callos embriogénicos obtenidos a partir de tejidonucelar

ce_2 = Callos embriogénicos obtenidos a partir de tejido foliar

ce_3 = Callos embriogénicos obtenidos a partir de embriones cigóticos inmaduros

b) Variedades de aguacate (V)

Se utilizará dos variedades de aguacate:

v_1 =Duke 7.

v_2 = Puebla.

c) Medios de cultivo para Mantenimiento de callos embriogénicos (M_{MCE}) (Ver anexo 2).

Se utilizarán tres medios de cultivo para la fase de mantenimiento de callos embriogénicos utilizados principalmente en embriogénesis somática en aguacate.

m_{MCE1} (Witjaksono&Litz, 1999 a)
 m_{MCE2} (Witjaksono&Litz, 1999 a)
 m_{MCE3} (Witjaksono&Litz, 1999 b)

5.2.11 Tratamientos

Cuadro 3. Tratamientos para la Etapa de Mantenimiento de Callos Embriogénicos en dos variedades de Aguacate (*Persea Americana* Mill.), INIAP, Cutuglagua – Pichincha, 2012.

ORDEN	SÍMBOLO	CÓDIGO	TRATAMIENTO
1	t_1	$ce_1v_1m_{MCE1}$	Callos embriogénicos obtenidos a partir de tejido nucelar de Duke 7 en medio MS suplementado 0.1 mg ^l ⁻¹ Picloram, 30 gl ⁻¹ Sacarosa, 8 gl ⁻¹ Agar.
2	t_2	$ce_1v_1m_{MCE2}$	Callos embriogénicos obtenidos a partir de tejido nucelar de Duke 7 en medio MS basal suplementado con: 100 mg ^l ⁻¹ Myo-Inositol, 4 mg ^l ⁻¹ Tiamina-HCL., 0.1 mg ^l ⁻¹ Picloram y 45 gl ⁻¹ Sacarosa.
3	t_3	$ce_1v_1m_{MCE3}$	Callos embriogénicos obtenidos a partir de tejido nucelar de Duke 7 en medio MS3:1 (12 mg ^l ⁻¹ de NH ₄ NO ₃ y 30.3 mg ^l ⁻¹ KNO ₃) suplementado con: 100 mg ^l ⁻¹ Myo-Inositol, 4 mg ^l ⁻¹ Tiamina-HCL, 0.1 mg ^l ⁻¹ Picloram y 45 gl ⁻¹ Sacarosa.
4	t_4	$ce_1v_2m_{MCE1}$	Callos embriogénicos obtenidos a partir de tejido nucelar de Puebla en medio MS suplementado 0.1 mg ^l ⁻¹ Picloram, 30 gl ⁻¹ Sacarosa, 8 gl ⁻¹ Agar.
5	t_5	$ce_1v_2m_{MCE2}$	Callos embriogénicos obtenidos a partir de tejido nucelar de Puebla en medio MS basal suplementado con: 100 mg ^l ⁻¹ Myo-Inositol, 4 mg ^l ⁻¹ Tiamina-HCL... 0.1 mg ^l ⁻¹ Picloram y 45 gl ⁻¹ Sacarosa.
6	t_6	$ce_1v_2m_{MCE3}$	Callos embriogénicos obtenidos a partir de tejido nucelar de Puebla en medio MS3:1 (12 mg ^l ⁻¹ de NH ₄ NO ₃ y 30.3 mg ^l ⁻¹ KNO ₃) suplementado con: 100 mg ^l ⁻¹ Myo-Inositol, 4 mg ^l ⁻¹ Tiamina-HCL, 0.1 mg ^l ⁻¹ Picloram y 45 gl ⁻¹ Sacarosa.
7	t_7	$ce_2v_1m_{MCE1}$	Callos embriogénicos obtenidos a partir de tejido foliar de Duke 7 en medio MS suplementado 0.1 mg ^l ⁻¹ Picloram, 30 gl ⁻¹ Sacarosa, 8 gl ⁻¹ Agar.
8	t_8	$ce_2v_1m_{MCE2}$	Callos embriogénicos obtenidos a partir de tejido foliar de Duke 7 en medio MS basal suplementado con: 100 mg ^l ⁻¹ Myo-Inositol, 4 mg ^l ⁻¹ Tiamina-HCL... 0.1 mg ^l ⁻¹ Picloram y 45 gl ⁻¹ Sacarosa.
9	t_{10}	$ce_2v_1m_{MCE3}$	Callos embriogénicos obtenidos a partir de tejido foliar de Duke 7 en medio MS3:1 (12 mg ^l ⁻¹ de NH ₄ NO ₃ y 30.3 mg ^l ⁻¹ KNO ₃) suplementado con: 100 mg ^l ⁻¹ Myo-Inositol, 4 mg ^l ⁻¹ Tiamina-HCL, 0.1 mg ^l ⁻¹ Picloram y 45 gl ⁻¹ Sacarosa.
10	t_{11}	$ce_2v_2m_{MCE1}$	Callos embriogénicos obtenidos a partir de tejido foliar de Puebla en medio MS suplementado 0.1 mg ^l ⁻¹ Picloram, 30 gl ⁻¹ Sacarosa, 8 gl ⁻¹ Agar.
11	t_{11}	$ce_2v_2m_{MCE2}$	Callos embriogénicos obtenidos a partir de tejido foliar de Puebla en medio MS basal suplementado con: 100 mg ^l ⁻¹ Myo-Inositol, 4 mg ^l ⁻¹ Tiamina-HCL., 0.1 mg ^l ⁻¹ Picloram y 45 gl ⁻¹ Sacarosa.
12	t_{12}	$ce_2v_2m_{MCE3}$	Callos embriogénicos obtenidos a partir de tejido foliar de Puebla en medio MS3:1 (12 mg ^l ⁻¹ de NH ₄ NO ₃ y 30.3 mg ^l ⁻¹ KNO ₃) suplementado con: 100 mg ^l ⁻¹ Myo-Inositol, 4 mg ^l ⁻¹ Tiamina-HCL, 0.1 mg ^l ⁻¹ Picloram y 45 gl ⁻¹ Sacarosa.
13	t_{14}	$ce_3v_1m_{MCE1}$	Callos embriogénicos obtenidos a partir de embriones cigóticos inmaduros de Duke 7 en medio MS suplementado 0.1 mg ^l ⁻¹ Picloram, 30 gl ⁻¹ Sacarosa, 8 gl ⁻¹ Agar.
14	t_{14}	$ce_3v_1m_{MCE2}$	Callos embriogénicos obtenidos a partir de embriones cigóticos inmaduros de Duke 7 en medio MS basal suplementado con: 100 mg ^l ⁻¹ Myo-Inositol, 4 mg ^l ⁻¹ Tiamina-HCL., 0.1 mg ^l ⁻¹ Picloram y 45 gl ⁻¹ Sacarosa.
15	t_{15}	$ce_3v_1m_{MCE3}$	Callos embriogénicos obtenidos a partir de embriones cigóticos inmaduros de Duke 7 en medio MS3:1 (12 mg ^l ⁻¹ de NH ₄ NO ₃ y 30.3 mg ^l ⁻¹ KNO ₃) suplementado con: 100 mg ^l ⁻¹ Myo-Inositol, 4 mg ^l ⁻¹ Tiamina-HCL, 0.1 mg ^l ⁻¹ Picloram y 45 gl ⁻¹ Sacarosa.
16	t_{16}	$ce_3v_2m_{MCE1}$	Callos embriogénicos obtenidos a partir de embriones cigóticos inmaduros de Puebla en medio MS suplementado 0.1 mg ^l ⁻¹ Picloram, 30 gl ⁻¹ Sacarosa, 8 gl ⁻¹ Agar.
17	t_{17}	$ce_3v_2m_{MCE2}$	Callos embriogénicos obtenidos a partir de embriones cigóticos inmaduros de Puebla en medio MS basal suplementado con: 100 mg ^l ⁻¹ Myo-Inositol, 4 mg ^l ⁻¹ Tiamina-HCL., 0.1 mg ^l ⁻¹ Picloram y 45 gl ⁻¹ Sacarosa.

18	t_{18}	ce_3 v_2m_{MCE3}	Callos embriogénicos obtenidos a partir de embriones cigóticos inmaduros de Puebla en medio MS3:1 (12 mg ^l ⁻¹ de NH ₄ NO ₃ y 30.3 mg ^l ⁻¹ KNO ₃) suplementado con: 100 mg ^l ⁻¹ Myo-Inositol, 4 mg ^l ⁻¹ Tiamina-HCl, 0.1 mg ^l ⁻¹ Picloram y 45 g ^l ⁻¹ Sacarosa.
----	----------	-------------------------	--

5.2.12 Unidad experimental

La unidad experimental estará conformada por un erlenmeyer de 100 ml de capacidad conteniendo 0.8 g-1 g de callo embriogénico en 40 ml de medio líquido.

5.2.13 Diseño experimental

Se utilizará un Diseño Completamente al Azar (DCA) dispuesto en arreglo factorial 3 x 2 x 3 (tres tipos de explantes por dos variedades de aguacate por tres medios de cultivo) con 5 observaciones o repeticiones por cada tratamiento.

5.2.14 Análisis Estadístico

El esquema del Análisis de Varianza (ADEVA) se presenta a continuación:

Cuadro 4. ADEVA para la Etapa de Mantenimiento de callos embriogénicos obtenidos a partir de tejido nucelar, foliar y embriones cigóticos inmaduros de dos variedades de aguacate (*Persea americana* Mill.) en tres medios de cultivos, INIAP, Cutuglagua – Pichincha 2012.

Fuente de Variación (F de V)	Grados de Libertad (GL)
Total	84
Tratamientos	17
Callos embriogénicos obtenidos a partir de tipo de explante(CE)	2
Variedades (V)	1
CE x V	2
Medios de cultivo (M)	2
CE x M	4
V x M	2
CE x V x M	4
Error Experimental	67
PROMEDIO	
CV (%)	

5.2.15 Análisis funcional

5.2.15.1 Pruebas de significación

Al encontrar diferencias estadísticas significativas en los factores en estudio y su interacción, se realizará pruebas de Tukey al 5% para tratamientos, callos embriogénicos obtenidos a partir de tipo de explante y medios de cultivo.

5.2.16 Variables y métodos de evaluación

Las variables que serán estudiadas en esta fase son determinantes en la formación completa de embriones somáticos en aguacate.

- **Porcentaje de callos compuestos por Masas Proembriogénicas (PEMs) (%).**

Se determinará el porcentaje de callos con masas proembriogénicas a la segunda, tercera y cuarta semana después de haber transferido los callos al medio de mantenimiento. Las características principales para determinar callos con masas proembriogénicas son: presencia de proembriones, embriones en estadio de corazón o cotiledonar; estos serán identificados mediante la utilización del estereomicroscopio e histología (Anexo 2).

- **Número de proembriones (PE) por callo tipo PEM**

Se determinará el número de embriones somáticos en estadio proembrionario a los cuatro y cinco días de introducidos los callos embriogénicos en medio de mantenimiento; se determinará esta variable mediante la utilización del estereomicroscopio e histología (Anexo 2).

- **Número de embriones en estadio o fase acorazonado (AC) por callo tipo PEM.**

Se determinará el número de embriones somáticos en fase acorazonada a los siete días de introducidos los callos embriogénicos en medio de mantenimiento; se determinará esta variable mediante la utilización del estereomicroscopio e histología (Anexo 2).

- **Porcentaje de Callos caracterizados por la presencia de embriones somáticos en estadios tempranos de desarrollo (SE) (%).**

Se determinará el porcentaje de callos caracterizados por la presencia de embriones somáticos en estadios de globular, torpedo y cotiledonar; a la segunda, tercera y cuarta semana después de haber transferido los callos al medio de mantenimiento; estos serán identificados mediante la utilización del estereomicroscopio e histología (Anexo 2).

- **Número de embriones en fase globular (G) por callo tipo SE.**

Se determinará el número de embriones somáticos en fase globular a los cinco y seis días de introducidos los callos embriogénicos en medio de mantenimiento; se determinara esta variable mediante la utilización del estereomicroscopio e histología (Anexo 2).

- **Número de embriones en fase torpedo (T) por callo tipo SE.**

Se determinará el número de embriones somáticos en fase torpedo a los ocho y nueve días de introducidos los callos embriogénicos en medio de mantenimiento; se determinara esta variable mediante la utilización del estereomicroscopio e histología (Anexo 2).

- **Número de embriones en fase cotiledonar (C) por callo tipo SE.**

Se determinará el número de embriones somáticos en fase cotiledonar a los ocho y nueve días de introducidos los callos embriogénicos en medio de mantenimiento; se determinara esta variable mediante la utilización del estereomicroscopio e histología (Anexo 2)

- **Número de Embriones hiperhídricos (EHH) (%).**

Se determinará el número de embriones hiperhídricos a la cuarta semana mediante histología (Anexo 6-10) y la visualización de aquellos embriones con aspecto vidrioso y amorfo.

5.2.17 Manejo específico del experimento

Para el mantenimiento de callos embriogénicos se realizará lo siguiente:

a) Paso de los callos embriogénicos inducidos a partir de tejido nucelar, foliar y embriones cigóticos inmaduros a medios mantenimiento de cultivos embriogénicos

Se realizará el paso de los callos embriogénicos a los diferentes medios de mantenimiento a ser utilizados (Anexo 1) a la cuarta semana de haber estado los callos en medios de inducción. Para medios de mantenimiento líquido se utilizará 0.8-1g de callo embriogénico por cada 40 ml de medio con agitación de 125 rpm, luz difusa (semioscuridad) y 2 subcultivos cada dos semanas. En medio de mantenimiento semisólido (10 ml) se realizará 3 subcultivos cada 3-5 semanas a 25°C y oscuridad.

b) Histología

Se realizará un protocolo histológico (Modificado González, 2006) (Anexo 2) a la primera, segunda, tercera y cuarta semana después de introducido el material vegetal en los diferentes medios de mantenimiento a ser utilizados.

c) Toma de datos

La recolección de los datos se realizará a partir de la primera semana luego de haber colocado los explantes en los medios de inducción y dependiendo de cada variable.

5.2.18 Factores de Estudio

FASE III: Desarrollo- Maduración de embriones somáticos.

a) Embriones somáticos de callos embriogénicos obtenidos a partir de tipo de explante (ES)

Se utilizará los embriones somáticos en diferentes estadios obtenidos a partir de callos embriogénicos (ES):

- es₁=Embriones somáticos de callos embriogénicos obtenidos a partir de tejido nucelar
- es₂= Embriones somáticos de callos embriogénicos obtenidos a partir de tejido foliar
- es₃= Embriones somáticos de callos embriogénicos obtenidos a partir de embriones cigotos inmaduros

b) Variedades de aguacate (V)

Se utilizará dos variedades de aguacate:

- v₁ =Duke 7.
- v₂= Puebla

d) Medios de cultivo para el Desarrollo-Maduración de embriones somáticos (M_{DES})(Ver anexo 3)

Se utilizarán medios de cultivo para el desarrollo-maduración utilizados para la embriogénesis somática en aguacate.

- m_{DES1}(Witjaksono&Litz, 1999 b)
- m_{DES2}(Avenido, 2005)

5.2.19 Tratamientos

Cuadro 3. Tratamientos para la Etapa de Desarrollo-Maduración de Embriones Somáticos en dos variedades de Aguacate (*Persea Americana* Mill.), INIAP, Cutuglagua – Pichincha, 2012.

ORDEN	SÍMBOLO	CÓDIGO	TRATAMIENTO
1	t ₁	es ₁ v ₁ m _{DES1}	Embriones somáticos de callos embriogénicos obtenidos a partir de tejido nucelar de Duke 7 en medio MS suplementado con: 100 mg l ⁻¹ Myo-Inositol, 4 mg l ⁻¹ Tiamina-HCl, 30 g l ⁻¹ Sacarosa, 6 g l ⁻¹ Agar y 20 ml l ⁻¹ Agua de coco.
2	t ₂	es ₁ v ₁ m _{DES2}	Embriones somáticos de callos embriogénicos obtenidos a partir de tejido nucelar de Duke 7 en medio de Sales B5 y Vitaminas MS suplementado con: 50 g l ⁻¹ Sacarosa, 4.5%Phytigel y 100 ml l ⁻¹ Agua de coco.
3	t ₃	es ₁ v ₂ m _{DES1}	Embriones somáticos de callos embriogénicos obtenidos a partir de tejido nucelar de Puebla en medio MS suplementado con: 100 mg l ⁻¹ Myo-Inositol, 4 mg l ⁻¹ Tiamina-HCl, 30 g l ⁻¹ Sacarosa, 6 g l ⁻¹ Agar y 20 ml l ⁻¹ Agua de coco.
4	t ₄	es ₁ v ₂ m _{DES2}	Embriones somáticos de callos embriogénicos obtenidos a partir de tejido nucelar de Puebla en medio de Sales B5 y Vitaminas MS suplementado con: 50 g l ⁻¹ Sacarosa, 4.5%Phytigel y 100 ml l ⁻¹ Agua de coco.
5	t ₅	es ₂ v ₁ m _{DES1}	Embriones somáticos de callos embriogénicos obtenidos a partir de tejido foliar de Duke 7 en medio MS suplementado con: 100 mg l ⁻¹ Myo-Inositol, 4 mg l ⁻¹ Tiamina-HCl, 30 g l ⁻¹ Sacarosa, 6 g l ⁻¹ Agar y 20 ml l ⁻¹ Agua de coco.
6	t ₆	es ₂ v ₁ m _{DES2}	Embriones somáticos de callos embriogénicos obtenidos a partir de tejido foliar de Duke 7 en medio de Sales B5 y Vitaminas MS suplementado con: 50 g l ⁻¹ Sacarosa, 4.5%Phytigel y 100 ml l ⁻¹ Agua de coco.
7	t ₇	es ₂ v ₂ m _{DES1}	Embriones somáticos de callos embriogénicos obtenidos a partir de tejido foliar de Puebla en medio MS suplementado con: 100 mg l ⁻¹ Myo-Inositol, 4 mg l ⁻¹ Tiamina-HCl, 30 g l ⁻¹ Sacarosa, 6 g l ⁻¹ Agar y 20 ml l ⁻¹ Agua de coco.
8	t ₈	es ₂ v ₂ m _{DES2}	Embriones somáticos de callos embriogénicos obtenidos a partir de tejido foliar de Puebla en medio de Sales B5 y Vitaminas MS suplementado con: 50 g l ⁻¹ Sacarosa, 4.5%Phytigel y 100 ml l ⁻¹ Agua de coco.
9	t ₉	es ₃ v ₁ m _{DES1}	Embriones somáticos de callos embriogénicos obtenidos a partir de embriones cigotos inmaduros de Duke 7 en medio MS suplementado con: 100 mg l ⁻¹ Myo-Inositol, 4 mg l ⁻¹ Tiamina-HCl, 30 g l ⁻¹ Sacarosa, 6 g l ⁻¹ Agar y 20 ml l ⁻¹ Agua de coco.
10	t ₁₀	es ₃ v ₁ m _{DES2}	Embriones somáticos de callos embriogénicos obtenidos a partir de embriones cigotos inmaduros de Duke 7 en medio de Sales B5 y Vitaminas MS suplementado con: 50 g l ⁻¹ Sacarosa, 4.5%Phytigel y 100 ml l ⁻¹ Agua de coco.
11	t ₁₁	es ₃ v ₂ m _{DES1}	Embriones somáticos de callos embriogénicos obtenidos a partir de embriones cigotos inmaduros de Puebla en medio MS suplementado con: 100 mg l ⁻¹ Myo-Inositol, 4 mg l ⁻¹ Tiamina-HCl, 30 g l ⁻¹ Sacarosa, 6 g l ⁻¹ Agar y 20 ml l ⁻¹ Agua de coco.
12	t ₁₂	es ₃ v ₂ m _{DES2}	Embriones somáticos de callos embriogénicos obtenidos a partir de embriones cigotos inmaduros de Puebla en medio de Sales B5 y Vitaminas MS suplementado con: 50 g l ⁻¹ Sacarosa, 4.5%Phytigel y 100 ml l ⁻¹ Agua de coco.

5.2.20 Unidad experimental

La unidad experimental estará conformada por: una caja Petri de 60 mm de diámetro por 15 mm de alto, conteniendo cinco embriones de callos embriogénicos obtenidos a partir de tejidos nucelar o tejido foliar o embriones cigóticos inmaduros.

5.2.21 Diseño experimental

Se utilizará un Diseño Completamente al Azar (DCA) dispuesto en arreglo factorial 3 x 2 x 2 (tres tipos de explantes por dos variedades de aguacate por dos medios de cultivo) con 5 observaciones o repeticiones por cada tratamiento.

5.2.22 Análisis Estadístico

El esquema del Análisis de Varianza (ADEVA) se presenta a continuación.

Cuadro 4. ADEVA para la Etapa de Desarrollo-Maduración de embriones somáticos de callos embriogénicos obtenidos a partir de tejido nucelar, foliar y embriones cigotos inmaduros de dos variedades de aguacate (*Persea americana* Mill.) en dos medios de cultivos, INIAP, Cutuglagua – Pichincha 2012.

Fuente de Variación (F de V)	Grados de Libertad (GL)
Total	59
Tratamientos	11
Embriones somáticos de callos embriogénicos obtenidos a partir de tipo de explante(ES)	2
Variedades (V)	1
ES x V	2
Medios de cultivo (M)	1
ES x M	2
V x M	1
ES x V x M	2
Error Experimental	48
PROMEDIO	
CV (%)	

5.2.23 Análisis funcional

5.2.23.1 Pruebas de significación

Al encontrar diferencias estadísticas significativas en los factores en estudio y su interacción, se realizará pruebas de Tukey al 5% para tratamientos y embriones somáticos de callos embriogénicos obtenidos a partir de tipo de explantes y Diferencia Mínima Significativa (DMS) al 5% para variedades y medios de cultivo

5.2.24 Variables y métodos de evaluación

- **Porcentaje de embriones blancos-opacos (w-o)(%).**

Se determinará el porcentaje de embriones blancos-opacos a la segunda, tercera y cuarta semana mediante la utilización del estereomicroscopio.

- **Porcentaje de embriones viables totales (%).**

Se determinará el porcentaje de embriones viables que formaron completamente todas las fases de desarrollo del embrión hasta la fase cotiledonar.

- **Porcentaje de embriones no viables totales (%)**

Se determinará el porcentaje de embriones no viables o muertos que no llegaron a formar completamente todas las fases de desarrollo del embrión hasta la fase cotiledonar.

- **Porcentaje de embriones con sustancias de reserva. (%)**

Se determinará el porcentaje de embriones somáticos con sustancias de reserva a la primera, segunda, tercera semana y cuarta semana mediante un protocolo histológico (Anexo 2).

5.2.25 Manejo específico del experimento

Para el desarrollo-maduración de embriones somáticos se realizará lo siguiente:

a) Paso de embriones somáticos a medios de cultivo para el desarrollo y maduración

Los cultivos embriogénicos o tejidos embriogénicos que serán cultivados en medio líquido en la fase II serán filtrados a través de un tamiz estéril de 1.8 mm de diámetro y serán transferidos a los diferentes medios de cultivo a ser utilizados en esta fase (Anexo 1); no obstante los cultivos embriogénicos que no fueron cultivados en medio líquidos, pero sí en medio sólido, serán directamente transferidos a los medios de cultivo mencionados en el mismo anexo a 25 °C y oscuridad por 3-4 meses con subcultivos en intervalos cada 3 semanas.

b) Histología

Se realizará un protocolo histológico (Modificado González, 2006) (Anexo 2) a la primera, segunda, tercera y cuarta semana después de introducido el material vegetal en los diferentes medios de mantenimiento a ser utilizados

d) Toma de datos

La recolección de los datos se realizará a partir de la primera semana luego de haber colocado los explantes en los medios de inducción y dependiendo de cada variable.

5.2.26 Factores de Estudio

FASE IV: Germinación de embriones somáticos

a) Embriones somáticos de callos embriogénicos obtenidos a partir de tipo de explante (ES)

Se utilizará los embriones somáticos en diferentes estadios obtenidos a partir de callos embriogénicos (ES):

es_1 = Embriones somáticos de callos embriogénicos obtenidos a partir de tejido nucelar

es_2 = Embriones somáticos de callos embriogénicos obtenidos a partir de tejido foliar

es_3 = Embriones somáticos de callos embriogénicos obtenidos a partir de embriones cigotos inmaduros.

b) Medios de cultivo para la Germinación de embriones somáticos (M_{GES}) (Ver anexo 4)

m_{GES1} (Witjaksono & Litz, 2002)

m_{GES2} (Witjaksono and Litz, 1999b)

Cuadro 5. Tratamientos para la Etapa de Germinación de Embriones Somáticos en dos variedades de Aguacate (*Persea Americana* Mill.). INIAP, Cutuglagua – Pichincha, 2012.

ORDEN	SÍMBOLO	CÓDIGO	TRATAMIENTO
1	t_1	$es_1 v_1 m_{GES1}$	Embriones somáticos de callos embriogénicos obtenidos a partir de tejido nucelar de Duke 7 en medio MS suplementado con: 100 $mg\ l^{-1}$ Myo-inositol, 4 $mg\ l^{-1}$ Tiamina, 4.44 μM BA, 2.89 μM AG_3 y 8 $g\ l^{-1}$ Agar 30 $g\ l^{-1}$ Sacarosa y 3 $g\ l^{-1}$ Gelrite.
2	t_2	$es_1 v_1 m_{GES2}$	Embriones somáticos de callos embriogénicos obtenidos a partir de tejido nucelar de Duke 7 en medio MS 3:1 (800 $mg\ l^{-1}$ NH_4NO_3 y 2200 KNO_3) suplementado con: 100 $mg\ l^{-1}$ Myo-inositol, 4 $mg\ l^{-1}$ Tiamina, 1 μM BA, 10 μM AG_3 , 30 $g\ l^{-1}$ Sacarosa y 3 $g\ l^{-1}$ Gelrite.
3	t_3	$es_1 v_2 m_{GES1}$	Embriones somáticos de callos embriogénicos obtenidos a partir de tejido nucelar de Puebla en medio MS suplementado con: 100 $mg\ l^{-1}$ Myo-inositol, 4 $mg\ l^{-1}$ Tiamina, 4.44 μM BA, 2.89 μM AG_3 y 8 $g\ l^{-1}$ Agar 30 $g\ l^{-1}$ Sacarosa y 3 $g\ l^{-1}$ Gelrite.
4	t_4	$es_1 v_2 m_{GES2}$	Embriones somáticos de callos embriogénicos obtenidos a partir de tejido nucelar de Puebla en medio MS 3:1 (800 $mg\ l^{-1}$ NH_4NO_3 y 2200 KNO_3) suplementado con: 100 $mg\ l^{-1}$ Myo-inositol, 4 $mg\ l^{-1}$ Tiamina, 1 μM BA, 10 μM AG_3 , 30 $g\ l^{-1}$ Sacarosa y 3 $g\ l^{-1}$ Gelrite.
5	t_5	$es_2 v_1 m_{GES1}$	Embriones somáticos de callos embriogénicos obtenidos a partir de tejido foliar de Duke 7 en medio MS suplementado con: 100 $mg\ l^{-1}$ Myo-inositol, 4 $mg\ l^{-1}$ Tiamina, 4.44 μM BA, 2.89 μM AG_3 y 8 $g\ l^{-1}$ Agar 30 $g\ l^{-1}$ Sacarosa y 3 $g\ l^{-1}$ Gelrite.
6	t_6	$es_2 v_1 m_{GES2}$	Embriones somáticos de callos embriogénicos obtenidos a partir de tejido foliar de Duke 7 en medio MS 3:1 (800 $mg\ l^{-1}$ NH_4NO_3 y 2200 KNO_3) suplementado con: 100 $mg\ l^{-1}$ Myo-inositol, 4 $mg\ l^{-1}$ Tiamina, 1 μM BA, 10 μM AG_3 , 30 $g\ l^{-1}$ Sacarosa y 3 $g\ l^{-1}$ Gelrite.
7	t_7	$es_2 v_2 m_{GES1}$	Embriones somáticos de callos embriogénicos obtenidos a partir de tejido foliar de Puebla en medio MS suplementado con: 100 $mg\ l^{-1}$ Myo-inositol, 4 $mg\ l^{-1}$ Tiamina, 4.44 μM BA, 2.89 μM AG_3 y 8 $g\ l^{-1}$ Agar 30 $g\ l^{-1}$ Sacarosa y 3 $g\ l^{-1}$ Gelrite.

8	t ₈	es ₂ v ₂ m _{GES2}	Embriones somáticos de callos embriogénicos obtenidos a partir de tejido foliar de Puebla en medio MS 3:1 (800 mg l ⁻¹ NH ₄ NO ₃ y 2200 KNO ₃) suplementado con: 100 mg l ⁻¹ Myo-inositol, 4 mg l ⁻¹ Tiamina, 1 uM BA, 10 uM AG ₃ , 30 gl ⁻¹ Sacarosa y 3 gl ⁻¹ Gelrite.
9	t ₉	es ₃ v ₁ m _{GES1}	Embriones somáticos de callos embriogénicos obtenidos a partir de embriones cigotos inmaduros de Duke 7 en medio MS suplementado con: 100 mg l ⁻¹ Myo-inositol, 4 mg l ⁻¹ Tiamina, 4.44 uM BA, 2.89 uM AG ₃ y 8 gl ⁻¹ Agar 30 gl ⁻¹ Sacarosa y 3 gl ⁻¹ Gelrite.
10	t ₁₀	es ₃ v ₁ m _{GES2}	Embriones somáticos de callos embriogénicos obtenidos a partir de embriones cigotos inmaduros de Duke 7 en medio MS 3:1 (800 mg l ⁻¹ NH ₄ NO ₃ y 2200 KNO ₃) suplementado con: 100 mg l ⁻¹ Myo-inositol, 4 mg l ⁻¹ Tiamina, 1 uM BA, 10 uM AG ₃ , 30 gl ⁻¹ Sacarosa y 3 gl ⁻¹ Gelrite.
11	t ₁₁	es ₃ v ₂ m _{GES1}	Embriones somáticos de callos embriogénicos obtenidos a partir de embriones cigotos inmaduros de Puebla en medio MS suplementado con: 100 mg l ⁻¹ Myo-inositol, 4 mg l ⁻¹ Tiamina, 4.44 uM BA, 2.89 uM AG ₃ y 8 gl ⁻¹ Agar 30 gl ⁻¹ Sacarosa y 3 gl ⁻¹ Gelrite.
12	t ₁₂	es ₃ v ₂ m _{GES2}	Embriones somáticos de callos embriogénicos obtenidos a partir de embriones cigotos inmaduros de Puebla en medio MS 3:1 (800 mg l ⁻¹ NH ₄ NO ₃ y 2200 KNO ₃) suplementado con: 100 mg l ⁻¹ Myo-inositol, 4 mg l ⁻¹ Tiamina, 1 uM BA, 10 uM AG ₃ , 30 gl ⁻¹ Sacarosa y 3 gl ⁻¹ Gelrite.

5.2.27 Unidad experimental

La unidad experimental estará conformada por un tubo de 150 mm de diámetro por 25 mm de alto conteniendo un embrión opaco y maduro de 0.8 cm-1cm en 25 ml de medio semisólido.

5.2.28 Diseño experimental

Se utilizará un Diseño Completamente al Azar (DCA) dispuesto en arreglo factorial 3 x 2 x 2 (tres tipos de explantes por dos variedades de aguacate por dos medios de cultivo) con 5 observaciones o repeticiones por cada tratamiento.

5.2.29 Análisis Estadístico

El esquema del Análisis de Varianza (ADEVA) se presenta a continuación:

Cuadro 6. ADEVA para la Etapa de Germinación de embriones somáticos de callos embriogénicos obtenidos a partir de tejido nucelar, foliar y embriones cigóticos inmaduros de dos variedades de aguacate (*Persea americana* Mill.) en dos medios de cultivos, INIAP, Cutuglagua – Pichincha 2012.

Fuente de Variación (F de V)	Grados de Libertad (GL)
Total	59
Tratamientos	11
Embriones somáticos de callos embriogénicos obtenidos a partir de tipo de explante (ES)	2
Variedades (V)	1
ES x V	2
Medios de cultivo (M)	1

ES x M	2
V x M	1
ES x V x M	2
Error Experimental	48
PROMEDIO	
CV (%)	

5.2.30 Análisis funcional

5.2.30.1 Pruebas de significación

Al encontrar diferencias estadísticas significativas en los factores en estudio y su interacción, se realizará pruebas de Tukey al 5% para tratamientos y embriones somáticos de callos embriogénicos obtenidos a partir de tipo de explante y Diferencia Mínima Significativa (DMS) al 5% para variedades y medios de cultivo.

5.2.31 Variables y métodos de evaluación.

- Porcentaje de germinación de embriones somáticos (%).

Se determinará el porcentaje de embriones germinados, es decir, embriones, bipolares, que presenten raíz y brote a la segunda, tercera, cuarta y quinta semana después de haber colocado el embrión a medio de germinación mediante histología (Anexo 6-10) y visualización en estereomicroscopio.

5.2.32 Manejo específico del experimento

En la fase de germinación de embriones somáticos se escogerá aquellos embriones opacos y maduros de aproximadamente 0.8-1cm, formados en la etapa de desarrollo, estos serán transferidos individualmente a tubos de ensayo con 25 ml de medio de germinación (Anexo 1) a 25° C, intensidad lumínica de 40 $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-2}$ por 3-4 meses con subcultivos en intervalos de 3 semanas. Finalmente se recopilarán las fotografías obtenidas, mediante histología, de cada estadio de desarrollo de embriones somáticos obtenidos a partir de embriones cigóticos inmaduros y se comparará con los posibles estadios de desarrollo formados a partir de tejido nucelar y foliar.

6. CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES

Actividad	Meses											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Elaboración y aprobación del proyecto	x	x										
Adquisición de material vegetal para extracción de tejido nucelar	x	x										
Adquisición de material vegetal para tejido foliar de plantas de invernadero	x	x										
Preparación de medios de cultivo para inducción de callos		x										
Inducción de explantes en medios de cultivo			x	x	x							
Estudio histológico de callos nucleares, foliares y cigóticos			x	x	x							
Toma de datos (Inducción de explantes a callos)			x	x	x							
Preparación de medios de cultivo para mantenimiento de callos				x								
Inducción de cultivos embriogénicos a estadios tempranos en medios de cultivo de mantenimiento						x	x	x				
Estudio histológico de cultivo embriogénico						x	x	x				
Toma de datos (Inducción de cultivos embriogénicos)						x	x	x				
Preparación de medios de cultivo para desarrollo completo de embriones							x					
Inducción de embriones en medios de cultivo de desarrollo									x	x		
Estudio histológico de posibles embriones somáticos obtenidos a partir de tejido nucelar, foliar y embriones cigóticos inmaduros									x	x		
Preparación de medios de cultivo para germinación de embriones somáticos									x			
Germinación de embriones somáticos											x	x
Estudio histológico de embriones somáticos											x	x
Toma de datos (Germinación de embriones)											x	x
Análisis de datos						x	x	x	x	x	x	x
Redacción de manuscrito						x	x	x	x	x	x	x

7. PRESUPUESTO

7.1 Personal

Rubro	Unidad	Precio Unitario (USD)	Cantidad	Total (USD)
Becario	Mensual	383.93	8	3071.44
Subtotal				3071.44

7.2 Reactivos

Rubro	Unidad	Precio Unitario (USD)	Cantidad	Total (USD)
Medio M&S	l	228.00	1	228.00
Parafina Histosec Gránulos	kg	42.00	1	42.00
Bálsamo de Canadá	ml	152.04	1	152.04
Formaldehido	l	29.80	2	59.60
Xilol	l	74.00	1	74.00
Ac. Acético	l	42.00	1	42.00
Etanol (99.99%)	l	56.00	6	336.00
Cubreobjetos	pH 100	3.55	1	3.55
Porta objetos	pH 50	3.45	1	3.45
Nitrato de Potasio	g	50.00	2	100.00
Aceite de inmersión	ml	43.55	1	43.55
Subtotal				1084.19

7.3. Materiales de Laboratorio

Rubro	Unidad	Precio Unitario (USD)	Cantidad	Total (USD)
Marcadores	Unidad	2.00	3	6.00
Mandiles	Unidad	8.00	1	8.00
Desinfectante	l	1.00	4	4.00
Jabón líquido	l	2.50	1	2.50
Guantes	Par	0.65	12	7.80
Hojas de bisturí	Unidad	0.20	400	80.00
Papel absorbente	Paquete	1.00	5	5.00
Papel aluminio	Paquete	4.00	2	8.00
Rollopac	Paquete	3.20	2	6.40
Cinta auto lavable	Rollo	10.00	1	10.00
Fundas	Unidad	0.01	100	1.00
Servilletas	Paquete	0.50	10	5.00
Subtotal				143.70

7.4 Materiales de Oficina

Rubro	Unidad	Precio Unitario (USD)	Cantidad	Total (USD)
Material fotográfico	Unidad	20.00	4	80.00
Empastado del texto	Unidad	15.00	8	120.00
Copias	Unidad	0.03	800	24.00
Subtotal				224.00

7.5 Costo total

Rubro	Total (USD)
Personal	3071.44
Reactivos	1084.19
Materiales de Laboratorio	143.70
Materiales de Oficina	224.00
SUBTOTAL	4523.33
Imprevistos 5%	226.17
TOTAL	4749.50

Fuente de financiamiento:

Institución	Proyecto	USD	Porcentaje (%)
INIAP	BIOTECNOLOGIA	4749.50	100

8. BIBLIOGRAFÍA CITADA

- Avenido, R.A.; Gálvez, H.; Dimaculangan, J. ; Frankie, R.; Damasco, O. (2005). Generation of variability in avocado through somaclonal variation and *in vitro* mutation. Institute of Plant Breeding, College of Agriculture, University of the Philippines Los Baños, College, Laguna. pp. 31.
- Castro, M. 2003. Propagación de Plantas de Aguacate. Valparaíso, CL. Universidad Católica de Valparaíso. p. 2.
- CICO (Centro de Información e Inteligencia Comercial). 2010. En línea. Fecha de consulta: 31 de Marzo del 2012. Disponible en: <http://www.pucesi.edu.ec/pdf/aguacate.pdf>.
- Cooper, P.A. 1987. Advances in the Micro propagation of Avocado (*Persea americana* Mill.). Acta Horticulture. 212 (2): 571-575.
- Copeland, L.; Mc Donald, M. 1995. Principles of Seed Science and Technology. 3^{ra} edition. Chapman & Hall. New York. pp. 400-409.
- Efendi, D. 2003. Transformation and Cryopreservation of Embryogenic Avocado (*Persea americana* Mill.) Cultures. Thesis the degree of Doctor of Philosophy. Florida. University of Florida. p 22-100.
- Fajardo, L.; Freire, M.; García, Y. ; Argente, L. 2005. Formación de Embriones Somáticos en *Persea americana* Mill. Catalina a partir de Embriones Cigóticos Inmaduros. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central “Martha Abreu” de Las Villas. Artículo Científico Biotecnología Vegetal 5 (2): 103-107.
- Freire, M. 2003. Aspectos básicos de la Embriogénesis Somática. Biotecnología Vegetal. Reseña Bibliográfica. 3 (4): 195-209.
- González, A. 2006. El uso de la histología en los sistemas de cultivo *in vitro* de tejidos. En línea. Consultado el 01 de Marzo del 2012. Disponible en: <http://www.biologia.edu.ar/microscopia/microscopia.pdf>
- González, O.; Sam, O.; Hernández, M.; Coronado, M.; Silva, J. 2005. Caracterización Histológica de la Embriogénesis Somática a partir de Limbos Foliar de Boniato (*Ipomoea batatas* L. Lam). Revista de Divulgación Científica Cultivos Tropicales 26 (4): 37-41
- Harty, P.A. 1985. Propagation of Avocado by tissue culture: Development of a Culture Medium for Multiplication of Shoots. South African. Avocado Growers Association: Yearbook. 8: 70-71.
- Iles, D. 2011. Inducción de callos embriogénicos en cinco variedades de aguacate (*Persea americana* Mill.) a partir de tejido nucelar y foliar. Tesis Ing. Agrónomo. Quito: Universidad Central del Ecuador, Facultad de Ingeniería en Ciencias Agropecuarias.
- León, J. 2008. Un nuevo embajador nacional: El aguacate ecuatoriano se comercializa con éxito en Francia, España y Colombia. Diario de negocios. En línea. Consultado el 03 de Marzo del 2012. Disponible en: <http://www.hoy.com.ec/noticias-ecuador/un-nuevo-embajador-nacional-321510.html>.
- Márquez, B.; Sánchez, C.; Perán R.; Barceló, A.; Pliego, 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.). En Actas: III Congreso Mundial del Aguacate

- Mooney, P.A. & Van Staden, J. 1987. Induction of Embryogenesis in callus from Immature Embryos for *Persea Americana*. Can.J.Bot. 65:622-626.
- Parrot, W. 2002. La Embriogénesis Somática en las Angiospermas. Villa Clara. CU. Instituto de Biotecnología de las Plantas. p. 7-13.
- Pliego-Alfaro, F. 1981. A Morphogenetic study of the Avocado (*Persea americana* Mill.) *in vitro*: I Development of the rooting bioassay and its Application to Studying Restoration by Grafting of Rooting Competence in Adult Shoot; II Somatic Embryogenesis in Callus. PhD. Dissertation. University of California Riverside.
- _____; Murashige, T. 1988. Somatic Embryogenesis in Avocado (*Persea americana* Mill.). Plant Cell Tiss. Org. Cult. 12:61-66.
- _____; Barceló, A.; Perán, R.; Pérez, S.; Sánchez, R. 1999. La Micropropagación en la Mejora de Patrones de Aguacate (*Persea americana* Mill.): Problemas y Limitaciones. Revista Capingo Serie Horticultura 5: 239-244.
- Schall, S. 1987. La multiplication de l' avocatier (*Persea americana* Mill) cv, Fuerte par microbouturage *in vitro*. Fruits. 42 (3): 171-176.
- Suárez, I.; Litz, R.; Jaraba, D. 2004. Somatic Embryogenesis in Three Avocado (*Persea americana* Mill.) Cultivars. Revista de Divulgación Científica Temas Agrarios 9 (2): 32-41.
- Williams, E. & Mashewaran, M. 1986. Somatic Embryogenesis: Factors influencing coordinated behaviour of Cell as an Embryogenic Group. Annals of Botany. 57: 443-462.
- Witjaksono & Litz, R. E. 1999 a. Induction and Growth Characteristics of Embryogenic Avocado cultures. Plant Cell Tiss Org Cult 59: 19-29.
- _____. 1999 b. Maturation of Avocado Somatic Embryos and Plant Recovery. Plant Cell Tiss Org Cult 58: 141-148.
- _____. 2002. Somatic Embryogenesis of Avocado (*Persea americana* Mill) and its application for Plant Improvement. Acta Hort. 575: 133-138.

9. ANEXOS

Anexo I. Composición de los medios de cultivo para las diferentes etapas de formación de embriogénesis somática.

Medio de cultivo	Composición
m _{IC1}	MS suplementado con: 100 mg l ⁻¹ Myo-Inositol, 0.4 mg l ⁻¹ Tiamina-HCL, 0.1 mg l ⁻¹ Picloram, 30 g l ⁻¹ Sucrosa, 0.1 % Carbón activado, 30 g l ⁻¹ Sucrosa y 8 g l ⁻¹ Agar. (Mejía, 1994).
m _{IC2}	MS 75% suplementado con: 2 mg l ⁻¹ BAP, 0.5 mg l ⁻¹ AIB, 30 g l ⁻¹ Sucrosa y 8 g l ⁻¹ Agar. (Dalsasoet <i>al.</i> , 2004)

Medio de cultivo	Composición
m _{MCE1}	Medio MS suplementado con: 0.1 mg l ⁻¹ Picloram y 8 g l ⁻¹ Agar. (Witjaksono & Litz, 1999 a)
m _{MCE2}	Medio MS basal suplementado con: 100 mg l ⁻¹ Myo-Inositol, 4 mg l ⁻¹ Tiamina-HCL... 0.1 mg l ⁻¹ Picloram y 45 g l ⁻¹ Sacarosa. (Witjaksono & Litz, 1999 a)

m _{MCE3}	Medio MS3:1 (12 mg ^l ⁻¹ de NH ₄ NO ₃ y 30.3 mg ^l ⁻¹ KNO ₃) suplementado con: 100 mg ^l ⁻¹ Myo-Inositol, 4 mg ^l ⁻¹ Tiamina-HCl, 0.1 mg ^l ⁻¹ Picloram y 45 g ^l ⁻¹ Sacarosa. (Witjaksono&Litz, 1999 b)
-------------------	--

Medio de cultivo	Composición
m _{DES1}	Medio MS suplementado con: 100 mg ^l ⁻¹ Myo-Inositol, 4 mg ^l ⁻¹ Tiamina-HCl, 30 g ^l ⁻¹ Sacarosa, 6 g ^l ⁻¹ Agar y 20ml ^l ⁻¹ Agua de coco.(Witjaksono&Litz, 1999 b)
m _{DES2}	Medio de Sales B5 y Vitaminas MS suplementado con: 50 g ^l ⁻¹ Sacarosa, 4.5%Phytigel y 100 ml ^l ⁻¹ Agua de coco.(Avenida, 2005)

Medio de cultivo	Composición
m _{GES1}	Medio MS suplementado con: 100 mg ^l ⁻¹ Myo-inositol, 4 mg ^l ⁻¹ Tiamina, 4.44 uM BA, 2.89 uM AG ₃ y 8 g ^l ⁻¹ Agar 30 g ^l ⁻¹ Sacarosa y 3 g ^l ⁻¹ Gelrite. (Witjaksono&Litz, 2002).
m _{GES2}	Medio MS 3:1 (800 mg ^l ⁻¹ NH ₄ NO ₃ y 2200 KNO ₃) suplementado con: 100 mg ^l ⁻¹ Myo-inositol, 4 mg ^l ⁻¹ Tiamina, 1 uM BA, 10 uM AG ₃ , 30 g ^l ⁻¹ Sacarosa y 3 g ^l ⁻¹ Gelrite. (Witjaksono and Litz, 1999 b)

NUTRIENTES	B5 (mg/l)	MS (mg/l)
NH ₄ NO ₃	-	1650
KNO ₃	2500	1900
CaCl ₂ x2H ₂ O	150	400
MgSO ₄ x 7H ₂ O	250	370
KH ₂ PO ₄	-	170
(NH ₄) ₂ SO ₄	134	-
NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O	150	-
H ₃ BO ₃	3	6.2
MnSO ₄ x H ₂ O	10	16.9
ZnSO ₄ x 7H ₂ O	2	8.6
KI	0.75	0.83
Na ₂ MoO ₄ x 2H ₂ O	0.25	0.25
CuSO ₄ x 5H ₂ O	0.025	0.025
CoCl ₂ x 6H ₂ O	0.025	0.025
FeSO ₄ x 7H ₂ O	27.8	27.8
Na ₂ EDTA (2H ₂ O)	37.3	37.3
Myo-Inositol	100	100
Ac. Nicotínico	1	0.5
Tiamina- HCL	1	0.1
Piridoxina	1	0.5
Sucrosa	3000	3000
AIA		1 - 30
Kinetina		4 - 10
Agar		1000

FUENTE: Mejía, 1994

Anexo 2. Protocolo histológico

Fijación

Compuesto	Volumen (ml)
Alcohol 70 %	90
Formol	5
Ácido acético	5

Deshidratación de tejidos.

Concentración de Etílico (%)	Tiempo de inmersión (horas)
30	72

50	48
70	48
85	1
96	1
Cambio continuo de Alcohol Anhidro al 100%	Tiempo de inmersión
1	30 min
2	30 min
3	2 horas

Aclaramiento.

Compuesto	Tiempo de inmersión (Horas)
Xilol+ alcohol (100%)	1-24

Inclusión o Impregnación.

Cambio continuo de Parafina Líquida en estufa a 60°C	Tiempo de inmersión (Horas)
1	10
2	10

Tinción.

Compuestos	Tiempo
Xilol	10 min
Alcohol etílico 30%	24 horas
Alcohol etílico 20%	24 horas
Alcohol etílico 10%	24 horas
Agua	24 horas
Azul de Toluidina (2 %)	45 segundos
Montar con bálsamo de Canadá sintético	

Fuente: Modificado Gonzalez, 2006