



DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA

COORDINACIÓN GENERAL DE ESTUDIOS DE POSGRADO

INDUCCIÓN *in vitro* DE BROTES Y CALLOS EN AGUACATE (*Persea americana* Mill.)

TESIS

QUE COMO REQUISITO PARCIAL

PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS EN BIOTECNOLOGÍA AGRÍCOLA

PRESENTA:

ELIZABETH RODARTE PERALES

DIRECTOR DE TESIS: DR. ALEJANDRO FACUNDO BARRIENTOS PRIEGO



Chapingo, Estado de México, junio de 2023



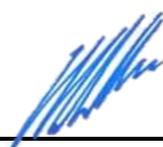
INDUCCIÓN *in vitro* DE BROTES Y CALLOS EN AGUACATE (*Persea americana* Mill.)

Tesis realizada por **ELIZABETH RODARTE PERALES** bajo la dirección del Comité Asesor indicado, aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS EN BIOTECNOLOGÍA AGRÍCOLA

COMITÉ ASESOR

DIRECTOR:



Dr. Alejandro Facundo Barrientos Priego

CO-DIRECTOR:



Dr. Gabriel Iturriaga de la Fuente

ASESOR:



Dr. José Oscar Mascorro Gallardo

ASESOR:



Dr. Ulises Yunuén Rosas López

Chapingo, Estado de México, junio de 2023

Tabla de contenido

LISTA DE CUADROS.....	v
LISTA DE FIGURAS	vii
DEDICATORIA	viii
AGRADECIMIENTOS	ix
DATOS BIOGRÁFICOS	x
.....	x
RESUMEN	xi
I. INTRODUCCIÓN	15
II. OBJETIVOS	17
2.1. Objetivo general.....	17
2.2. Objetivos particulares	17
III. REVISIÓN DE LITERATURA.....	18
3.1. Origen y distribución geográfica	18
3.2. Fenología y reproducción.....	19
3.3. Retos y desafíos de la producción sostenible de aguacate.....	21
3.4. La biotecnología en el mejoramiento genético de aguacate.....	21
3.4.1. Avances en genética molecular	23
3.4.2. Estudios de morfogénesis in vitro de aguacate.....	23
3.4.1. Avances en la transformación genética de aguacate.....	28
3.5. Literatura citada	33
IV. MATERIALES Y MÉTODOS	41
4.1. Material vegetal.....	41
4.2. Desinfección externa de explantes	43
4.3. Desinfección interna y establecimiento <i>in vitro</i> de explantes nodales de árboles adultos.....	44
4.4.1. Protocolo de desinfección interna de explantes	45
4.4.2. Agentes antioxidantes adicionados al medio de cultivo	46
4.4.3. Tratamientos para inducción de callo	47
4.4.4. Tratamientos para inducción de brotes	47
4.5. Establecimiento <i>in vitro</i> de embriones cigóticos	48
4.6. Agroinfección de tallos de <i>Persea americana</i> Mill.....	49
4.6.1. Cepas de <i>Agrobacterium</i>	49
4.6.2. Metodologías de transformación y condiciones de cultivo	50
4.7. Diseño experimental y análisis estadísticos	51
4.7.1. Desinfección de explantes de plantas de invernadero ‘Duke 7’ y Criollo mexicano.....	52
4.7.2. Antioxidantes adicionados al medio de cultivo	53
4.7.3. Inducción de callos	54
4.7.4. Inducción de brotes.....	55
V. DISCUSIÓN	55
5.1. Contaminación y necrosamiento de explantes	55
5.1.1. Explantes provenientes de árboles maduros	55
5.1.2. Explantes provenientes de plantas de invernadero	58
5.2.2. Efecto de antioxidantes adicionado al medio de cultivo (EA).....	60

5.2.	Respuestas morfogénicas <i>in vitro</i> de los genotipos 'Duke 7' y criollo mexicano	62
•	Experimento para inducción de callo	62
•	Experimento para inducción de brotes	68
5.2.3	Embriones cigóticos.....	75
5.2.	Expresión transitoria por agroinfección	78
VI.	CONCLUSIONES	79
VII.	Literatura Citada	81

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Estudios de morfogénesis in vitro de aguacate.....	25
Cuadro 2. Resumen de los estudios de transformación genética en aguacate.....	30
Cuadro 3. Tratamientos evaluados para inducción de brotes en cvs. Hass y Duke 7.....	44
Cuadro 4. Tratamientos evaluados en la inducción de callos en cvs. Hass y Duke 7.....	45
Cuadro 5. Secuencia de lavados para la desinfección de explantes provenientes de plantas de invernadero.....	45
Cuadro 6. Tratamientos de antioxidantes adicionados al medio de cultivo en cv. Duke 7 y criollo mexicano.....	46
Cuadro 7. Tratamientos evaluados para la inducción de callos en cv. Duke 7 y Criollo mexicano.....	47
Cuadro 8. Tratamientos evaluados para la inducción de brotes en cv. Duke 7 y Criollo mexicano.....	48
Cuadro 9. Niveles de necrosamiento.....	51
Cuadro 10. Niveles de inducción de callo.....	51
Cuadro 11. Categorías asociadas al color de callo.....	51
Cuadro 12. Tratamientos evaluados para la desinfección de explantes nodales Duke 7 y Criollo mexicano.....	52
Cuadro 13. Tratamientos evaluados para el experimento con antioxidantes.....	53
Cuadro 14. ANOVA de la variable contaminación para el experimento de desinfección.....	59
Cuadro 15. ANOVA para la variable necrosamiento del experimento de desinfección.....	59
Cuadro 16. Prueba Tukey para medias de variedades para la variable respuesta necrosamiento.....	60
Cuadro 17. ANOVA del experimento con antioxidantes para porcentaje de necrosamiento.....	61
Cuadro 18. Prueba Tukey de comparación de medias de tratamientos para variable necrosamiento.....	61
Cuadro 19. Prueba de comparación de medias Tukey para el día de observación de la variable necrosamiento.....	61
Cuadro 20. ANOVA de las variables predictoras (observación, variedad y tratamiento) para la variable respuesta IC.....	63
Cuadro 21. Coeficientes de regresión logística para variable respuesta IC.....	63
Cuadro 22. Coeficientes para cada efecto en el modelo de regresión ordinal logística para la variable respuesta NIC.....	63
Cuadro 23. Intervalos de confianza perfilados y odds ratio (OR) para los efectos en el modelo para la variable respuesta NIC.....	64
Cuadro 24. P-valores para los efectos (variedad, tratamientos y observaciones) asociados al color de callo (CC).....	64
Cuadro 25. ANOVA para la variable respuesta PIC por variedad.....	68

Cuadro 26. Prueba Tukey para comparación de medias entre variedades del experimento de brotación para PIC	68
Cuadro 27. Prueba Tukey para comparación de medias entre tratamientos de brotación para PIC.....	69
Cuadro 28. ANOVA del experimento de brotación para la variable respuesta PIB.	70
Cuadro 29. Prueba Tukey de comparación de medias de PIB para la variable observación.....	70
Cuadro 30. ANOVA de la variable respuesta PIB para la variedad criolla	71
Cuadro 31. Prueba Duncan de comparación de medias de los tratamientos para PIB de la variedad criolla	71
Cuadro 32. ANOVA para la variable respuesta LBP de la variedad criolla	73
Cuadro 33. Prueba Tukey de comparación de tratamientos para la variable LBP de la variedad criolla.....	73
Cuadro 34. Frutos recolectados y respuestas morfológicas obtenidas a 30 días de su establecimiento in vitro	75

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Brotes de árboles adultos de aguacate	41
Figura 2. Frutos inmaduros de aguacate recolectados a 7 meses de la floración.	42
Figura 3. Material vegetal de invernadero. Brotes etiolados de cv. Duke 7 de 19 semanas (A). Plantas de 5 meses de ‘Duke 7’ (B) y criollo mexicano (C).	42
Figura 4. Segmentos nodales de aguacate utilizados.	43
Figura 5. Plántulas germinadas de 17 semanas de criollo mexicano	49
Figura 6. Morfología general de callos cv. Duke 7 en el experimento para callogénesis a 60 días de cultivo. A) TDZ(0.1 mg.L ⁻¹)+ picloram(0.1 mg.L ⁻¹), B) TDZ (0.3 mg.L ⁻¹)+ (1 mg.L ⁻¹), C) testigo.....	57
Figura 7. Morfología general de callos en el experimento de callogénesis en cv. Hass a 60 días de cultivo. A) TDZ (0.1 mg.L ⁻¹), B) TDZ (0.3 mg.L ⁻¹)+ picloram(1 mg.L ⁻¹), C) 2,4-D (0.3 mg.L ⁻¹).....	57
Figura 8. Morfología general de callos obtenidos en el experimento de brotación de árboles adultos cv. Duke 7 a los 60 días de cultivo. A) KIN (0.1 mg.L ⁻¹), B,C) BA (0.3 mg.L ⁻¹).....	58
Figura 9. Morfología de callos del experimento de brotación cv. Hass a los 60 días de cultivo. A) testigo, B) BA (0.1 mg.L ⁻¹), C) BA (0.3 mg.L ⁻¹)	58
Figura 10. Porcentaje de necrosamiento y contaminación a los 60 días.....	60
Figura 11. Experimento con antioxidantes a los 7, 30 y 60 días de cultivo en Duke 7 (izquierda) y var. drymifolia (derecha). Los tratamientos T0 (testigo), T1 y T2 se muestran de la fila superior a la inferior, respectivamente.....	62
Figura 12. Morfología general de callos (C2) cv. Duke 7 a los 60 días de cultivo con 0.1 mg L ⁻¹ de picloram.....	65
Figura 13. Morfología general de callos (C2) Criollo mexicano a los 60 días de cultivo con 0.1 mg L ⁻¹ de picloram.	66
Figura 14. Morfología general de callos (C2) cv. Duke 7 a los 60 días de cultivo con 0.2 mg L ⁻¹ de picloram.....	66
Figura 15. Morfología general de callos (C2) var. criolla a los 60 días de cultivo con 0.2 mg L ⁻¹ de picloram.....	67
Figura 16. Brotes var. drymifolia a 45 días de cultivo	70
Figura 17. Brotes cv. Duke 7 a 45 días de cultivo	71
Figura 18. Porcentaje de inducción de brotes de la variedad criolla. Tratamientos con las mismas letras no son estadísticamente diferentes.....	72
Figura 19. Longitud de brotes promedio en la var. Criolla. Tratamientos con las mismas letras no son estadísticamente diferentes.....	74
Figura 20. Embriones cigóticos inmaduros var. Criolla (A), cv. Thomas (B) y ‘Hass’ (C) en medio suplementado con 0.2 mg L ⁻¹ de picloram a los 30 días.....	77
Figura 21. Subcultivos de callo derivado de embriones cigóticos inmaduros var. criolla (A,B) y cv. Thomas (C,D) en medio suplementado con 0.2 mg L ⁻¹ de picloram a los 90 días de cultivo	77
Figura 22. Niveles de expresión del gen GUS en aguacate. MT1: Tallo de criollo mexicano a los 10 días de la agroinfección con la cepa LBA4404(A). MT2: Tallos de Duke 7 a los 17 días de la agroinfección con la cepa EHA105 (B-H). Expresión negativa general observada.....	78

DEDICATORIA

A mis padres, Belen y Oscar

Y mi hermano, Julio

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada (CVU: 1104843) durante mis estudios de posgrado para la realización del presente trabajo.

A la Universidad Autónoma Chapingo por abrirme sus puertas y darme la oportunidad de continuar aprendiendo.

A mis asesores, el Dr. Alejandro F. Barrientos Priego, Dr. Gabriel Iturriaga de la Fuente, Dr. José Oscar Mascorro Gallardo y Dr. Ulises Y. Rosas López por su apoyo y disposición. Un agradecimiento especial al Dr. José Luis Rodríguez de la O, al Dr. Luis Fernando Contreras Cruz y al Dr. José Oscar Mascorro Gallardo por compartirme sus conocimientos, su tiempo y amistad.

A mi familia, por todo su apoyo y amor.

A David y a todas aquellas personas que conocí en este corto periodo de tiempo y que me hicieron sentir como en casa.

Gracias.

DATOS BIOGRÁFICOS



Datos personales

Nombre	Elizabeth Rodarte Perales
Fecha de nacimiento	24 de septiembre de 1997
Lugar de nacimiento	Pachuca de Soto, Hidalgo
CURP	970924MHGDRL02
Profesión	Ingeniera en Biotecnología
Cédula profesional	12038267

Desarrollo Académico

Estudios de preparatoria	PrepaTec del Tecnológico de Monterrey, Campus Hidalgo
Estudios de licenciatura	Tecnológico de Monterrey, Campus Querétaro
Estudios de maestría en ciencias	Departamento de Fitotecnia de la Universidad Autónoma Chapingo

RESUMEN

Los principales cultivares de aguacate (*Persea americana* Mill.) que se comercializan hoy en día son resultado de los esfuerzos de mejoramiento genético convencional que se vienen realizando desde los años 50, el cual es un proceso largo y laborioso. La biotecnología moderna y el cultivo *in vitro* son herramientas clave para el mejoramiento genético de las especies cuyo éxito recae en el desarrollo de protocolos de regeneración eficientes, ya sea por organogénesis o por embriogénesis somática. Sin embargo, a pesar de que durante los últimos 50 años se vienen realizando esfuerzos por estandarizar estos protocolos en aguacate, existen todavía bastantes limitaciones para el establecimiento *in vitro* de la especie. Dentro de estas destacan la amplia diversidad de respuestas morfogénicas que son dependientes del genotipo y que obligan a la estandarización de protocolos específicos para cada variedad; además de las bajas tasas de regeneración de plantas completas que se han obtenido hasta ahora, tanto por embriogénesis somática (utilizando embriones cigóticos inmaduros) como por organogénesis (a partir de yemas axilares), lo que a su vez ha limitado el desarrollo de protocolos de transformación genética para estudios de mejoramiento genético ya que dependen de un sistema de regeneración *in vitro* eficiente. Con el presente estudio se pretende contribuir al desarrollo de protocolos de regeneración y transformación genética en aguacate. Las plantas madre utilizadas inicialmente como fuente de explantes fueron árboles adultos cvs. Duke 7 y Hass; sin embargo, se presentaron severos problemas de contaminación y necrosamiento que limitaron el establecimiento *in vitro* de los explantes. Por lo tanto, se optó por utilizar plantas jóvenes de Duke 7 y var. *drymifolia*, lo cual permitió establecer un protocolo de desinfección eficiente con un promedio de viabilidad de los explantes del 90 %. Se realizaron diferentes experimentos para la inducción de respuestas morfogénicas. La inducción de callos se evaluó utilizando 0.1 y 0.2 mg/L de picloram; ambos tratamientos generaron callo, sin embargo, el nivel de inducción fue superior con 0.1mg/L, mientras que con 0.2 mg/L se obtuvo un mayor porcentaje de explantes con callo. En cuanto a la inducción de brotes, se logró una inducción del 68 % con una

longitud promedio de 1.5 cm a los 45 días de cultivo, aunque no se observó multiplicación de brotes en la var. *drymifolia*. En el caso de 'Duke 7' las respuestas morfogénicas fueron bastante reducidas a pesar de utilizar plantas etioladas. De igual manera, el establecimiento de embriones cigóticos obtenidos de frutos inmaduros de las variedades Hass, Thomas y var. *drymifolia* en un medio de inducción y mantenimiento de embriones suplementado con 0.2 mg/L de picloram resultó en una abundante formación de callo, aunque no se desarrollaron estructuras embrionarias. También se realizó un ensayo preliminar de agroinfección mediante sonicación y vacío utilizando el vector binario p35GUSint en explantes nodales de la variedad Duke 7, en donde a los 17 días del cultivo inicial y 6 días de co-cultivo con la cepa EHA105, se observaron niveles claramente visibles de expresión del gen GUSint.

Palabras clave: regeneración *in vitro*, brotación, callogénesis, transformación genética, árboles frutales

ABSTRACT

The main avocado cultivars (*Persea americana* Mill.) currently available in the market are the outcome of extensive and laborious conventional breeding efforts dating back to the 1950s. Modern biotechnology and plant *in vitro* culture technologies play a pivotal role in the genetic improvement of avocado species, with the success relying on the development of efficient regeneration protocols, encompassing organogenesis and somatic embryogenesis. Despite continuous efforts spanning over 50 years to standardize these protocols, significant limitations still exist in achieving successful *in vitro* establishment of avocado. These limitations primarily stem from the wide diversity of genotype-dependent morphogenic responses, highlighting the need for the standardization of specific regeneration protocols for each variety. Moreover, the low rates of complete plant regeneration that have been achieved so far, both through somatic embryogenesis (using immature zygotic embryos) or organogenesis (from axillary buds) further contribute to these limitations. Consequently, these challenges have impeded the development of genetic transformation protocols for genetic improvement studies, as they heavily rely on an efficient *in vitro* regeneration system. The objective of this study is to contribute to the advancement of regeneration and genetic transformation protocols in avocado. Initially, adult trees of the Duke 7 and Hass cultivars were employed as explant sources. However, severe contamination and necrosis issues hindered the successful *in vitro* establishment of the explants. Consequently, young plants of 'Duke 7' and var. *drymifolia* were substituted, resulting in the development of an efficient disinfection protocol with an average explant viability of 90 %. Various experiments were conducted to induce morphogenic responses. Callus induction was assessed using picloram at concentrations of 0.1 and 0.2 mg/L. Higher levels of callus induction were observed with 0.1 mg/L, while a greater percentage of explants with callus was obtained with 0.2 mg/L. Regarding shoot induction, a 68% induction rate was achieved in var. *drymifolia* with an average shoot length of 1.5 cm after 45 days of culture, although no shoot multiplication was observed. In the case of Duke 7, very limited responses were observed despite the utilization of etiolated

plants. Similarly, the establishment of zygotic embryos derived from immature fruits of the Hass, Thomas, and var. *drymifolia* varieties in an induction and maintenance medium supplemented with 0.2 mg/L of picloram resulted in abundant callus formation; however, no embryonic structures developed. A preliminary agroinfection assay employing a sonication and vacuum treatment with the binary vector p35GUSint was also performed on nodal explants of the Duke 7 variety. Expression of the binary vector was clearly visible after 17 days of initial culture and 6 days of co-culture with the EHA105 *Agrobacterium* strain.

Keywords: shoot formation, callus induction, genetic transformation, *in vitro* regeneration, fruit trees

Thesis, Master of Science
Universidad Autónoma Chapingo
Author: Elizabeth Rodarte Perales
Advisor: Alejandro Facundo Barrientos Priego

I. INTRODUCCIÓN

El aguacate (*Persea americana* Mill.) es un árbol originario de Mesoamérica y Centroamérica, cuyo fruto es altamente valorado por su contenido nutricional. Se encuentra distribuido en las zonas tropicales y subtropicales de todo el mundo (Galindo-Tovar et al., 2008) y posee una amplia diversidad genética inherente a las diferentes regiones geográficas de América en las que esta especie evolucionó, dando lugar al desarrollo de una extensa variedad de genotipos (Knight, 1999) . El género *Persea* pertenece a la familia de las Lauraceas, una de las más grandes y antiguas de las angiospermas basales (Rohwer, 1993) y se compone de ocho subespecies o ecotipos, tres de ellos de importancia hortícola: la raza mexicana, la raza guatemalteca y la raza antillana (Scora & Bergh, 1990; Storey et al., 1986) ; sus híbridos dieron lugar a los cultivares que se comercializan hoy en día como resultado de los esfuerzos de mejoramiento genético convencional que se han llevado a cabo en la especie desde los años 50 (Knight, 1999; Witney et al., 2005).

El aguacate es una de las principales exportaciones agroalimentarias de México. Durante las últimas seis décadas, este país ha liderado el mercado mundial de aguacate con una participación del 43 % de la producción global en 2020 (Cruz-López et al., 2022). Sin embargo, la propagación comercial excesiva de este fruto ha tenido repercusiones ambientales evidentes que deben ser abordadas si se busca satisfacer la creciente demanda del mercado en los próximos años (De la Vega-Rivera & Merino-Pérez, 2021; Sommaruga & Eldridge, 2021), especialmente en un marco ambiental poco alentador que amenaza la supervivencia de los cultivos (Álvarez Bravo et al., 2017; Gullino et al., 2021). Bajo este contexto, el uso de herramientas biotecnológicas para acelerar el mejoramiento genético de la especie cobra mayor relevancia.

Durante la última década, mejorar la resistencia a factores bióticos y abióticos han sido el principal objeto de estudio en el mejoramiento genético de aguacate. Sin embargo, la alta heterocigocidad y los largos periodos

vegetativos propios de las especies leñosas, son los principales factores que han limitado los avances en el mejoramiento genético (Araújo et al., 2018; Limerá et al., 2017; Petri & Burgos, 2005)

En este sentido, el cultivo de tejidos es una técnica crucial en la que convergen los esfuerzos de otras herramientas biotecnológicas como lo son la conservación de germoplasma, la transformación genética y recientemente la edición genética. Todas ellas con el objetivo de obtener cultivares con características sobresalientes y cuyo éxito recae en el desarrollo y optimización de protocolos para la regeneración de plantas completas ya sea por organogénesis o embriogénesis somática.

A pesar de los esfuerzos realizados durante los últimos 50 años en el cultivo *in vitro* de aguacate, la obtención de plantas completas se reporta con poco éxito. Los explantes más utilizados para este fin han sido callos embriogénicos derivados de embriones cigóticos inmaduros, así como yemas axilares. Sin embargo, la eficiencia de conversión, maduración y germinación de los embriones, así como los porcentajes de multiplicación y enraizamiento de los brotes, son bajos y dependientes del genotipo (Pliego-Alfaro & Murashige, 1988; Witjaksono et al., 1999; Witjaksono, 1997). Debido a esto, no ha sido posible la optimización de protocolos efectivos y específicos a cada cultivar, lo que ha limitado los avances en la transformación genética para la expresión estable de genes de interés (Tamayo-Ramos et al., 2022).

La mayoría de las investigaciones en torno a la transformación genética de aguacate se han realizado utilizando explantes provenientes de embriones cigóticos inmaduros debido a su eficiencia para generar embriones somáticos (Witjaksono & Litz, 1999); pero, por otro lado, la recuperación de transformantes de buena calidad con crecimiento radicular e inducción de brotes es menor al 2 % (Raharjo et al., 2008; Raharjo & Litz, 2005). Otro factor para considerar es que el uso de explantes que no han sufrido segregación o recombinación genética son los más deseables cuando se busca el mejoramiento genético de la especie, sin embargo, hasta la

fecha no se tiene conocimiento del uso de este tipo de tejidos para estudios de transformación genética en aguacate, a pesar de que ya ha sido posible la obtención de plantas completas a partir de yemas axilares en algunos genotipos.

De igual manera, existen otros enfoques de investigación que deben ser explorados de manera simultánea como el uso de sistemas de expresión transitoria que ofrecen ventajas en cuanto a la optimización de tiempo y de recursos. A diferencia de los protocolos de regeneración, estos sistemas no se ven limitados por la falta de un protocolo de regeneración eficiente, y al mismo tiempo, pueden contribuir al estudio de genes con implicaciones metabólicas y de crecimiento con posibles efectos en la regeneración y transformación de tejidos (Tamayo-Ramos et al., 2022). De esta manera, es posible evaluar con anticipación los genes de interés, lo que además permitirá realizar experimentos de transformación estable más eficientes y encaminados a la respuesta fenotípica de interés.

II. OBJETIVOS

2.1. Objetivo general

Contribuir al desarrollo de protocolos para el establecimiento *in vitro*, regeneración y transformación genética mediante agroinfección de *Persea americana* Mill.

2.2. Objetivos particulares

- Establecer un protocolo eficiente de desinfección de secciones de tallos con yemas axilares en *P. americana* para su establecimiento *in vitro* que garantice su viabilidad a largo plazo.
- Estudiar la inducción de brotes y callos *in vitro* en respuesta a la aplicación de diferentes reguladores de crecimiento en cvs. Hass, Duke 7 y Raza mexicana var. *drymifolia* a partir de explantes nodales.

- Estudiar la vía de regeneración por embriogénesis somática a partir de embriones cigóticos de aguacate cvs. Hass, Duke 7 y var. *drymifolia*
- Evaluar los niveles de expresión transitoria del gen reportero GUS por agroinfección de las cepas EHA105, GV3101 y LBA4404 de *Agrobacterium tumefaciens* en explantes nodales y yemas axilares de cv. Duke 7 y criollo mexicano.

III. REVISIÓN DE LITERATURA

3.1. Origen y distribución geográfica

Pertenece a la familia de las Lauraceas, una de las más grandes dentro de las especies de angiospermas de temprana divergencia (Rohwer, 1993) con ~2850 especies y ~45 géneros (Christenhusz & Byng, 2016; Rohwer, 1993). El aguacate, del género *Persea* tiene su origen en la región Africana de lo que fue el antiguo bloque continental Gondwana, su establecimiento surge en las regiones de Mesoamérica y Centroamérica (Pliego-Alfaro et al., 2020); mientras que la evidencia más antigua de su cultivo data de hace ~10 000 años en el Valle de Tehuacan, México (Smith, 1966).

Las subespecies o ecotipos de *Persea americana* se agrupan en cinco variedades botánicas silvestres: var. *floccosa* (Mez), var. *steyermarkii* (Allen), var. *nubigena* (William) Kopp, var. *zentmyerii* (Schieber y Bergh) y var. *tolimanensis* (Zentmyer y Schieber) y en tres razas hortícolas de importancia: la raza Mexicana (var. *drymifolia*), la raza Guatemalteca (var. *guatemalensis*) y la raza Antillana (var. *americana* Mill.), dos de ellas provenientes de las regiones que dan origen a su nombre, mientras que la raza antillana tiene su origen en la zona costera del océano Pacífico en Centroamérica (Scora & Bergh, 1990; Storey et al., 1986). El aguacate posee una amplia diversidad genética inherente a las diferentes regiones geográficas de América en las que esta especie evolucionó, lo que dio lugar al desarrollo de una extensa variedad de genotipos que a su vez dieron origen a los

cultivares (en su mayoría híbridos) que se comercializan hoy en día (Knight, 1999), como consecuencia de los esfuerzos de mejoramiento genético realizados principalmente en California a partir de los años 50 (Witney et al., 2005).

3.2. Fenología y reproducción

El aguacate es un árbol frondoso de 20 m de alto en la madurez, altamente valorado por el contenido nutricional de su fruto y actualmente distribuido en las regiones tropicales/subtropicales del mundo (Galindo-Tovar et al., 2008); tiene hojas perennes y semillas dicotiledóneas, su siembra debe realizarse en suelos de textura ligera, pH neutro o ligeramente ácido (i.e. 5.0-7.0) , una altitud generalmente no mayor a 2500 pies, aunque se han encontrado variedades que sobrepasan los 3000 psnm (Cruz-López et al., 2022; Pliego-Alfaro et al., 2020), y requiere de una precipitación entre 1200 y 1600 mm a lo largo del año (Gutiérrez-Contreras et al., 2010). Se ha documentado que temperaturas de ≤ 15 °C inducen la floración en aguacate mientras que temperaturas cálidas promueven la organogénesis floral (Acosta-Rangel et al., 2021; Salazar-Garcia, 2002), la cual se presenta en racimos y cada árbol puede llegar a producir hasta 1 millón de flores, donde cada inflorescencia genera de 200 a 900 flores y únicamente el 0.1 % resultarán en frutos (SIAP, 2020)

La raza con la mejor calidad hortícola es la Guatemalteca, pero su hibridación con las otras dos razas ha permitido eliminar las diferencias raciales y en su lugar obtener cultivares mediante polinización cruzada (Bergh, 1992) con ventajas adicionales como una mejor adaptación a las regiones tropicales que le confiere la raza Antillana o una mayor resistencia a las heladas por parte de la raza Mexicana (Bergh, 1992; Storey et al., 1986). El aguacate 'Hass' es el cultivar más consumido a nivel mundial, reemplazando a 'Fuerte' en la década de 1970 (Witney et al., 2005), representando el 95 % de la producción total (Zafar & Sidhu, 2011). Ambos son híbridos de las razas Guatemalteca x Mexicana que crecen generalmente en las zonas con climas Mediterráneos; mientras que en las regiones con climas tropicales

se cultivan híbridos de las razas Guatemalteca x Antillana (Pliego-Alfaro et al., 2020).

Los genotipos de aguacate se clasifican de acuerdo al tipo de floración que presentan: las flores de los cultivares de tipo A abren en las primeras horas de la mañana como flores femeninas y por segunda vez en la tarde del día siguiente, actuando ahora como flores masculinas; mientras que las flores de los cultivares tipo B tienen su primer apertura por la tarde como flores femeninas y la segunda por la mañana del día siguiente como flores masculinas (Peterson, 1955). Se trata de un patrón de floración inusual denominada dicogamia protógina, aspecto que debe considerarse a la hora de plantar huertos de aguacates, ya que deben sembrarse cultivares de tipo A y B que por sincronidad complementaria se polinicen mutuamente, aunque también puede ocurrir la autopolinización entre los periodos de cierre y apertura de sus flores (Bergh, 1992; Davenport, 1986; Dymond et al., 2021; Lobo Arias, 1977). Sin embargo, el aguacate cuenta con mecanismos evolutivos a favor de la polinización cruzada: si ambos tipos de polinización han ocurrido, se presentará la abscisión de los frutos provenientes de autopolinizaciones que aún no se han desarrollado (Degani et al., 1989), dando como resultado una planta altamente heterogénea (Bergh, 1992), lo cual promueve la variabilidad de la especie y maximiza la obtención de híbridos. Aunque existe una multiplicidad de factores edafo climáticos, agronómicos y genéticos que influyen en las tasas de cruzamiento observadas en diferentes variedades de aguacate (Sánchez-González et al., 2020).

El método de propagación clonal con fines comerciales en aguacate se da por medio de injertos entre cultivares seleccionados de tipo A y B ya que esto garantiza la calidad reproducible del fruto, y además permite cosechar dentro de los primeros 5 años, con un aumento gradual en el rendimiento (Cruz-López et al., 2022) a diferencia de los 8-20 años que requieren los árboles provenientes de semilla (Blumenfeld & Shmuel, 2022). No obstante, para lograr la multiplicación clonal de las variedades de porta injerto o patrón con características sobresalientes (e.g. resistencia a patógenos del suelo, enanismo, tolerancia al estrés por salinidad)

se vuelve necesario recurrir a otros métodos de propagación tales como el enraizamiento de esquejes (descrita en aguacate por primera vez por (Frolich & Platt, 1971), o por técnicas biotecnológicas como la micropropagación *in vitro* que se detalla más adelante.

3.3. Retos y desafíos de la producción sostenible de aguacate en México

El aguacate se encuentra dentro de las tres frutas tropicales más comercializadas a nivel mundial (Altendorf, 2019). México se ha consolidado como el principal país productor y exportador de este cultivo durante los últimos 60 años, participando en 2020 con el 43 % de la producción mundial (Cruz-López et al., 2022). Sin embargo, la propagación comercial excesiva de aguacate tiene repercusiones ambientales evidentes que deben ser atendidas si se busca aumentar su producción para satisfacer la creciente demanda del mercado de manera sostenible en los próximos años. Dentro de los principales obstáculos en este sentido se encuentra la deforestación, que ha ocasionado la pérdida de más de un tercio de los bosques de la Meseta Purépecha, además del uso excesivo de agroquímicos que se emplean a lo largo del proceso de producción (De la Vega-Rivera & Merino-Pérez, 2021); la producción de aguacate requiere además de una gran cantidad de recursos hídricos, especialmente en zonas mediterráneas como México, donde la producción comercial no es posible sin irrigación suplementaria (Sommaruga & Eldridge, 2021). Esto supone un gasto cercano a los 2.3 km³ de agua al año, en comparación con los 0.4 km³ que requiere República Dominicana, el segundo mayor productor de aguacate (Sommaruga & Eldridge, 2021), por lo que es importante la implementación de nuevas tecnologías y estrategias sostenibles para la optimización de los recursos utilizados en la producción de aguacate.

3.4. La biotecnología en el mejoramiento genético de aguacate

Aunque los programas de mejoramiento de aguacate mediante métodos tradicionales han sido fundamentales en el desarrollo de los cultivares comerciales

actuales, este proceso es lento y los avances en el mejoramiento genético han sido relativamente pocos (Pliego-Alfaro et al., 2020; Tamayo-Ramos et al., 2022). Una de las principales limitaciones es los largos periodos juveniles como resultado de la alta heterocigosidad de la especie (Araújo et al., 2018; Limera et al., 2017; Petri & Burgos, 2005). Aunque, por otro lado, ésta es igualmente responsable de la amplia diversidad genética de *P.americana*, misma que en la actualidad se ve amenazada por la destrucción del ecosistema de las poblaciones nativas de aguacate mexicano debido a la expansión de zonas ganaderas, incendios forestales, así como su sustitución por híbridos mejorados (Sánchez-González et al., 2020). Por lo tanto, cualquier intento de mejoramiento genético que se pretenda realizar, deberá venir de la mano de mayores esfuerzos en la conservación del germoplasma, lo que permitirá disponer de un valioso acervo genético para la identificación de genes de interés mediante técnicas moleculares, con el fin de obtener cultivares con características sobresalientes (Pliego-Alfaro et al., 2020; Sánchez-González et al., 2020; Witney et al., 2005).

En la actualidad se han identificado más de 500 variedades que enfrentan diversos problemas que impiden su producción comercial como el contenido de grasas y proteínas del fruto, problemas de resistencia a patógenos/enfermedades, daños de transportación, añerismo (i.e. producción alternada) (Ziv et al., 2014), la maduración heterogénea de los frutos de un mismo lote (Hernández et al., 2016), así como resistencia al estrés por salinidad y sequía (Acosta-Rangel et al., 2019; Oster et al., 2007). Todo esto en un marco ambiental poco alentador que favorecerá la aparición de plagas, retrasará la iniciación floral y ocasionará cambios en las áreas de producción, amenazando en última instancia la supervivencia de los cultivos (Álvarez et al., 2017; Gullino et al., 2021). Bajo este contexto, el uso de herramientas biotecnológicas para acelerar el mejoramiento genético de los cultivos cobra aún mayor relevancia.

3.4.1. Avances en genética molecular

En aguacate se ha empleado el uso de marcadores moleculares, en su mayoría microsatélites (SSR), para estimar la variabilidad genética así como la tasa de cruzamientos entre las especies (Sánchez-González et al., 2020) para delimitar su diferenciación entre las principales razas, estudiar la huella genética de genotipos, la construcción de mapas de ligamiento, caracterización de germoplasma, así como en estudios de diversidad y filogenéticos (Pliego-Alfaro et al., 2020).

Igualmente, se han llevado a cabo análisis genómicos comparativos por parte del Proyecto del Genoma Floral (Albert et al., 2005) para estudiar la evolución y el desarrollo floral del linaje de las angiospermas basales con el objetivo de contribuir a la estructuración del genoma de estas especies (Hong et al., 2021). En este proyecto se colectaron cerca de 10000 secuencias EST (Expressed Sequence Tags) de flores de cv. Hass en etapas tempranas de desarrollo, lo cual ha contribuido al estudio de la genética evolutiva del desarrollo floral en aguacate (Chanderbali et al., 2009).

Todos estos esfuerzos aunados a la reciente publicación del genoma del aguacate (Rendón-Anaya et al., 2019) y los análisis transcriptómicos de órganos específicos (Chabikwa et al., 2020; Ibarra-Laclette et al., 2015; Vergara-Pulgar et al., 2019) contribuirán en gran medida a la regulación y a la identificación de genes de interés para acelerar los procesos de mejoramiento genético de la especie ya sea mediante técnicas de edición o transformación genética (Tamayo-Ramos et al., 2022).

3.4.2. Estudios de morfogénesis *in vitro* de aguacate

El cultivo de tejidos vegetales es una herramienta clave dentro de los esfuerzos para la conservación y el mejoramiento de las especies. El objetivo principal para este fin, es el desarrollo de protocolos para la regeneración de plantas

completas a partir de diferentes tipos de explantes ya sea por organogénesis o embriogénesis somática.

La obtención de plantas por embriogénesis somática implica una serie de pasos que incluyen la iniciación de cultivos embriogénicos, la proliferación, la maduración de los embriones somáticos y, finalmente, la regeneración de plantas completas (Márquez-Martín et al., 2012). Por otro lado, la organogénesis *in vitro* consiste en la desdiferenciación del explante mediante la aplicación exógena de fitohormonas (auxinas y citoquininas particularmente) para adquirir competencia organogénica. Esto da lugar a la reorganización del tejido y el desarrollo de brotes meristemáticos, donde una vez elongados, es posible inducir el enraizamiento y recuperar plantas completas (Pliego-Alfaro & Litz, 2005; Sugiyama, 2002). Mediante este método es posible obtener plantas regeneradas en un menor tiempo en comparación con la embriogénesis somática, y se reduce el riesgo de variación somaclonal (Fehér, 2019), que no es deseable cuando se busca el mejoramiento genético de la especie.

El potencial de crecimiento de los explantes varía según la fuente del tejido, estado fisiológico y metabólico, así como al genoma de la variedad o el cultivar utilizado (Zulfiqar et al., 2009). En este sentido, la concentración y combinación de los fitoreguladores del medio deben ser determinados en función al tipo de explante (Nhut et al., 2008). Por lo general, se utilizan explantes juveniles debido a su mayor potencial de regeneración en comparación a los explantes maduros (Barceló-Muñoz et al., 1999; Nhut et al., 2008), ya que éstos suelen exhibir síntomas de necrosis y vitrificación que eventualmente llevan a la muerte de la planta (Cooper, 1987; Zulfiqar et al., 2009).

Para la regeneración de especies leñosas y árboles frutales se destacan cuatro tejidos en particular: el tejido materno juvenil (nucela), tejidos maduros de variedades clonales existentes (hojas, raíces), megasporocitos que produzcan embriones naturalmente o por apomixis inducida y tejidos embriogénicos o plántulas

obtenidas por fertilización sexual (James, 1987). Sin embargo, si se busca el mejoramiento genético, los explantes que no han sufrido segregación o recombinación génica son los más deseables. Los explantes que se han evaluado para su establecimiento *in vitro* en aguacate van desde embriones maduros e inmaduros (Quintero-Jiménez et al., 2020), ápices, yemas axilares, hojas, flores, mesocarpio de frutos, pendúnculos, polen, cotiledones, protoplastos (Mohamed-Yasseen, 1993; Suarez et al., 2006) y tejido nucelar (Suarez et al., 2006). En el Cuadro 1 se puede encontrar un resumen de algunos de los estudios más relevantes en este sentido.

Cuadro 1. Estudios de morfogénesis *in vitro* de aguacate.

Explante	Respuesta <i>in vitro</i>	Cultivar/ variedad	Referencia
Embriones maduros	Germinación	Drymifolia	Quintero-Jiménez et al. (2020)
	Germinación y brotación	<i>Persea lingue</i>	Cob et al., (2010)
	Germinación	Suardia, Duke 7	Rodríguez et al (1999)
	Planta completa	Duke 7	Fuentes et al., (2004)
Embriones cigóticos inmaduros	Embriogénesis somática	Hass	Pliego-Alfaro & Murashige (1988)
	Embriogénesis somática	Fuerte, Duke	Mooney & Van Staden (1987)
	Brotación	Fuerte	Skene & Barlas (1983)
	Germinación de embriones somáticos	Reed, Hass, Duke 7, A10	Encina et al. (2014)
	Embriogénesis somática	Booth 8, Esther, Isham, Thomas, Yon, T362, M25864	Witjaksono & Litz (1999)
	Maduración y germinación	Anaheim	Perán-Quesada (2004)
	Germinación	Hass	Perán-Quesada (2005)
	Embriogénesis somática	Hass	Pliego-Alfaro (1981)
	Embriogénesis somática	<i>Persea spp.</i>	Raviv et al. (1998)
	Planta completa	Drymifolia	Quintero-Jiménez et al. (2020)
	Planta completa	Hass, Suardia, Catalina	Rodríguez et al (1999)
	Planta completa	Duke 7	Fuentes et al., (2004)
	Embriogénesis somática	Anaheim	Marquez-Martin et al., (2012)
	Nucela de embriones inmaduros		

Thomas, Lamb Hass,

Witkajsono (1997)

T
3
6
2

	Planta completa	Vero Beach	Suarez, I. et al., (2005)
Ejes embrionarios	Planta completa	Dade, Maxima, Catalina, Tower 2, Waldin, Choquette	Mohamed, Yasseen et al. (1992)
	Brotación	Topa Topa	Pliego-Alfaro & Murashige (1987)
	Brotación	Dade, Maxima, Tower 2, Choquette	Barringer et al. (1996)
Ápices y yemas axilares	Brotación	NR	Schroeder (1976,1979,1980)
	Brotación	Colin V-33, R. antillana	Solorzano-Vega (1989)
	Brotación	Lula, Waldin	Young (1983)
	Planta completa	Fuerte	Schall (1987)
	Brotación	R. antillana	Gonzalez & Salazar (1984)
	Brotación		Salazar-García (1984)
	Callo	NR	Schroeder (1973)
	Callo	NR	Desjardins (1958)
	Planta completa	P.shiedeana	González-Rosas et al. (1985)
	Brotación	Duke	Harty (1985)
	Planta completa	P. indica	Nel et al. (1982)
	Brotación	Topa Topa	Pliego-Alfaro (1981)
	Brotación	GA-13, IV-8	Pliego-Alfaro (1987)
	Enraizamiento	Topa Topa	Pliego-Alfaro & Murashige (1987)
	Brotación	Fuerte, Duke 7	Cooper (1987)
	Elongación de brotes	Oro verde	Biasi et al. (1994)
	Planta completa	Duke 7	Rodríguez et al. (1999)
	Planta completa	Gvaram13	Witjaksono et al., (1999)
	Planta completa	IV-8	Barceló-Muñoz (1999)
	Brotación y enraizamiento	RR-86	De la viña et al. (2000)
	Brotación	Velvick	Bandaralage et al. (2015)
	Planta completa	Drymifolia	Cortes-Rodríguez et al. (2011)
	Planta completa	Fuerte	Zulficar et al. (2009)
	Brotación	Drymifolia	Ibarra-López et al. (2017)
	Planta completa	NR	Nhut et al. (2008)
	Planta completa	Hass	Restrepo-Osorio et al., (2018)
	Planta completa	Hass	Raharjo & Litz (2005)
	Planta completa	Lula	Sholi (2022)
	Callos embriogénicos	Palto	Gálvez &Chico (2016)
	Brotación	Fuerte Topa Topa, Hass, Fuerte,	Dalsaso et al., (1985)

Brotos germinados	Callo	Topa topa, P.borboria	Aaouline (1986)
	Enraizamiento	Topa topa	Pliego-Alfaro (1988)
Hojas	Callo	Lula, Waldin	Young (1983)
	Callo	NR	Schroeder (1973,1977)
	Callo	Catalina	Seijo et al., (2004)
	protoplastos	Thomas, Hass	Witjaksono (1997)
Flor	Callo	NR	Schroeder (1975)
Mesocarpio del fruto	Callo	NR	Shroeder & Kay (1961)
	Callo	NR	Schroeder et al. (1962)
	Callo	Fuerte	Gazit & Blumenfield (1970,1971)
Pendúndulo	Callo	NR	Schroeder (1977)
Cotiledon	Callo	NR	Kay & Schroeder (1963)
	Callo	NR	Schroeder (1968,1977)
	Callo	Fuerte	Gazit & Blumenfield (1970,1971)
Protoplasto	Callo	NR	Blicke et al. (1986)
	Protoplasto	Hass	Percival. Et al. (1991)
Polen	Germinación	Ettinger, Topa Topa Fuerte, <i>R.antillana</i>	Sahar & Spigel (1984)
	Germinación	Anaheim, Fuerte, Hass, Gvaram13, Maoz, Topa Topa	Alcaraz et al., (2011)

NR: No reportado

La embriogénesis somática a partir de callos embriogénicos derivados de embriones cigóticos inmaduros ha sido de los métodos de regeneración más estudiados en aguacate debido a que este explante exhibe una mayor respuesta embriogénica (Pliego-Alfaro & Litz, 2005). No obstante, aunque ha sido posible la obtención de plantas completas a partir de embriones somáticos, la eficiencia de conversión, maduración y germinación de los embriónes es baja (Pliego-Alfaro &

Murashige, 1988; Witjaksono, 1997). Una solución efectiva ha sido el uso de injertos *in vitro* y *ex vitro* para la recuperación de plantas a partir de embriones somáticos en aguacate (Raharjo & Litz, 2005). Pese a que este tipo de tejidos no poseen la identidad genética de la planta madre, los resultados obtenidos son potencialmente relevantes para su aplicación en otras fuentes de explantes (Stamp & Meredith, 1988).

También se han llevado a cabo estudios donde indicado el uso de yemas axilares (Cuadro 1). En muchos de ellos, se ha logrado la brotación y la recuperación de plantas completas en diferentes cultivares de aguacate a partir de brotes en estado juvenil, aunque con muy bajos índices de multiplicación y enraizamiento (Hiti-bandaralage & Hayward, 2017). Por otro lado, la contaminación por hongos, bacterias y el necrosamiento del explante junto con la recalcitrancia que presentan algunos genotipos, continúan siendo de los principales obstáculos que limitan el establecimiento *in vitro* a partir de tejidos maduros en aguacate (Hiti-bandaralage & Hayward, 2017; Nhut et al., 2008). Por lo que se hace necesario realizar más investigaciones para estandarizar el protocolo de regeneración más adecuado a cada genotipo.

3.4.1. Avances en la transformación genética de aguacate

Al trabajar con edición o transformación genética para la expresión estable de genes de interés, es indispensable contar con un sistema de regeneración efectivo para recuperar las plantas modificadas genéticamente. En este sentido, la naturaleza recalcitrante al cultivo *in vitro* del aguacate para la obtención de plantas completas es el principal obstáculo para el desarrollo de protocolos de transformación eficientes (Palomo-Ríos et al., 2012; Song et al., 2019). Factores como la habilidad de *Agrobacterium* para transformar las células, los métodos de selección y la regeneración eficiente de las células transformadas, así como de la incorporación estable de ADN en el genoma de las plantas son clave para una transformación exitosa (Dandekar, 1992).

En la actualidad, el 95 % de las especies de frutales y cultivos de nueces son consideradas recalcitrantes a la transformación genética (Song et al., 2019) y dentro de este grupo, la eficiencia de transformación en aguacate se ha mostrado considerablemente menor en comparación con otras especies frutales (Tamayo-Ramos et al., 2022). No obstante, avances significativos en la materia se han llevado a cabo en las últimas décadas (Cuadro 2).

Cuadro 2. Resumen de los estudios de transformación genética en aguacate.

Cultivar	Explante	Vector	Genes	Cepa de Agrobacterium	Método de transformación	Eficiencia de transformación	Resultados principales	Referencia
Thomas	Embriones cigóticos inmaduros	pMON9749	GUS, nptII	9749 ASE2	Agro-inmersión	40% quimeras y 60% sin transformar	Se describe un protocolo de dos pasos para la selección de transformantes. No se regeneraron plantas transgénicas	Cruz-Hernández (1998)
Suardia	Masas proembrionarias provenientes de embriones cigóticos inmaduros	pAG4092	SamK (maduración del fruto), nptII	EHA101	Agro-inmersión	29-31%	Recuperación de plantas transgénicas con el gen SAM. Recuperación de cultivos embriogénicos criopreservados y regeneración de embriones somáticos	Efendi (2003)
Hass, Suardia	Cultivos embriogénicos en suspensión	pGPTV-BAFP	samK (maduración del fruto), AFP (resistencia a patógenos)	EHA105	Agro-inmersión	NR	Maduración y crecimiento de embriones somáticos transformados con la adición de agua de coco 20% al medio de cultivo. Tasa de germinación de embriones baja. Recuperación de brotes embriogénicos transformados por microinjertos con un 69% de éxito	Litz et al. (2007)
Hass	Embriones cigóticos inmaduros	pGPTV	pdf1.2 (resistencia a patógenos)	EHA105	Agro-inmersión	NR	Recuperación de plantas completas a partir de brotes transgénicos mediante microinjertos con un 83.6% de éxito. Se confiere resistencia a herbicidas del gen bar a plantas de invernadero	Raharjo et al. (2008)
Duke 7	Embriones somáticos globulares obtenidos a partir de embriones cigóticos	pBINubiGUSint pK7WG2NPR1	AtNPR1 (resistencia a patógenos)	AGL1	Agro-inmersión	1.6-3.33%	Establecimiento de líneas transgénicas recuperadas por microinjertos	Palomo-Ríos(2011)
Hass	Brotos embrionarios	pCGP904, pBI121, pCGP904, pBI121, pCGP904, pBI121	GUS	AGL1, GV3850, LBA4404	Agro-inmersión	NR	La cepa GV3850 es la más efectiva para transformación. Niveles de transformación "estable" decrecen con el tiempo. Sin regenerantes transformados	Ahmed et al. (2012)
Duke 7	Embriones somáticos globulares obtenidos a partir de embriones cigóticos	pBINubiGUSint	GUS, nptII	LBA4404, EHA105, AGL1	Agro-inmersión	1-6%	La cepa AGL1 obtuvo la mayor eficiencia de transformación (6.0 ± 0.02%). Regeneración deficiente de plantas transgénicas	Palomo-Ríos et al. (2012)
Duke 7	Callo embriogénico	pXK7S*NF2, pXK7RNR2	DsRed, EGFP	NA	Biobalística	No. Promedio de zonas azules por bombardeo: 91.6±33.5	Primer reporte de expresión transitoria en aguacate donde determinaron el uso efectivo de los promotores ubB1 y ATP en sistemas de expresión transitoria.	Chaparro-Pulido(2013)
Duke 7	Embriones somáticos globulares obtenidos a partir de embriones cigóticos	pK7FNF2, pK7RNR2 pK7S*NF2	GFP, DsRed, GFP-GUS, nptII	AGL1	Agro-inmersión	10%	Protocolo de regeneración de plantas transgénicas más eficiente utilizando TDZ y BA. Recuperación de plantas transgénicas mediante microinjertos y micropropagadas con un 60-80% de eficiencia	Palomo-Ríos et al.(2017)
Itzamna A0.74	Brotos etiolados y tallo basal de plantulas germinadas <i>ex vitro</i>	pRedRooIII, Pbyr2e1, pBINubiGUSint	DsRED1, GFP, GUS	K599, ARqua1 (<i>A.rhizogenes</i>)	Agroinfección <i>ex vitro</i>	<1%	Primer estudio de transformación <i>ex vitro</i> en plantas compuestas de aguacate.El uso de ARqua+pBINubiGUSint resultó entre un 17 y 25% de regeneración de plantas compuestas. <i>A.rhizogenes</i> puede contribuir al estudio de la biología del desarrollo en raíces.	Prabhu et al. (2017)
Hass	Hojas juvenes-maduras	pJL-TRBO-G 35S:RUBY	GFP, RUBY	LBA4404	Agro-inmersión con vacío	NR	Primer reporte de expresión transitoria en hojas de aguacate.La edad de las hojas es un factor en la eficiencia de transformación.Tratamiento previo con microlaceración del tejido y ácido jasmónico facilita la agroinfiltración por vacío.	Salazar-Gonzalez (2022)
Hass	Hojas jóvenes <i>in-planta</i>	pJL-TRBO 35S:RUBY	GFP, RUBY	AGL1, LBA4404, GV3101	Agro-inmersión con vacío	2.6 en una escala del 0 al 5	Primer protocolo de expresión transitoria <i>in-planta</i> en hojas de aguacate.La cepa LBA4404 muestra mayor eficiencia de transformación.	Salazar-Gonzalez (2023)

NR: No reportado

NA: No aplica

El primer estudio sobre transformación genética en aguacate fue reportado por Cruz-Hernández et al. (1998) utilizando el protocolo de regeneración a partir de masas proembrionarias derivadas de embriones cigóticos inmaduros (Fernando Pliego-Alfaro & Murashige, 1988; Witjaksono, 1997) y desde entonces han sido ampliamente utilizados para la transformación genética de aguacate debido a su eficiencia para generar embriones somáticos en cultivos en suspensión (Witjaksono & Litz, 1999); aunque la obtención de embriones bipolares de buena calidad con crecimiento radicular e inducción de brotes es menor al 2 % (Raharjo et al., 2008; Raharjo & Litz, 2005). En este sentido, una solución que se ha empleado para la recuperación de plantas transgénicas completas es el uso de microinjertos aunque las tasas de eficiencia de transformación continúan siendo bajas (Litz et al., 2007; Palomo-Ríos et al., 2017; Raharjo et al., 2008) y a la fecha no se han reportado estudios que demuestren la estabilidad de los genes insertados en la descendencia de las líneas transgénicas generadas, mismas que a su vez muestran una baja tasa de supervivencia (Tamayo-Ramos et al., 2022).

Estudios más recientes sobre transformación genética en aguacate se han enfocado al desarrollo de protocolos de expresión transitoria. Éstos tienen, naturalmente, objetivos de investigación diferentes a aquellos donde se busca una transformación estable y presentan ventajas significativas en cuanto a su metodología ya que no se encuentran limitados por la falta de un protocolo de regeneración *in vitro* eficiente; lo que se traduce en una optimización importante de tiempo y de recursos (Chaparro-Pulido et al., 2014; Tamayo-Ramos et al., 2022).

La transformación transitoria mediada por *Agrobacterium* se ha utilizado ampliamente en la caracterización funcional de genes de interés (Vaghchhipawala et al., 2011), ya que permite un control temporal y preciso de la expresión (a menudo superior) de genes o proteínas en periodos de tiempo relativamente cortos (Tyurin et al., 2020). Esto es particularmente relevante en el caso de especies con ciclos de desarrollo largos, como es el caso del aguacate, donde habría que esperar años para evaluar los efectos de una expresión estable (Tamayo-Ramos et al., 2022).

Si bien, la transformación genética estable es lo que se busca en última instancia para obtener líneas mejoradas de los cultivos, los sistemas de expresión transitoria pueden contribuir en este sentido al estudiar genes con implicaciones metabólicas y de crecimiento con posibles efectos en la regeneración y transformación de tejidos (Tamayo-Ramos et al., 2022), como los genes organogénicos IPT (Ma & Liu, 2009; Molinier et al., 2002; Skalák et al., 2016) o ESR1 (Matsuo & Banno, 2008). De igual manera, supone una alternativa para evaluar la genómica funcional o las rutas metabólicas (Sharma et al., 2020) de los genes de interés, lo que permite evaluar con anticipación las respuestas de expresión esperadas, haciendo más eficientes y precisos los experimentos de transformación estables.

Son pocos los estudios de transformación transitoria realizados en aguacate hoy en día. El primero de ellos por Chaparro-Pulido et al. (2014) donde determinaron el uso efectivo de los promotores ubB1 y ATP en sistemas de expresión transitoria. El segundo estudio de este tipo fue reportado por Prabhu et al. (2017) utilizando cepas de *A. rhizogenes* donde obtuvieron una generación entre el 17 y 25 % de plantas compuestas de aguacate *ex vitro* y destacan la necesidad de profundizar en este tipo de estrategias para especies maderables. Recientemente, otro grupo de investigación publicó dos estudios más, en los cuales se destaca el uso de un tratamiento previo de microlascelación del explante en sinergia con el ácido jasmónico para maximizar la transformación *ex vitro* del tejido mediante agroinfiltración por vacío de hojas individuales (Salazar-gonzález et al., 2022) así como en un sistema *in planta* (Salazar-Gonzalez et al., 2023).

A la fecha son escasos los explantes que se han evaluado para experimentos de transformación genética ya sea estable o transitoria. Además de los embriones cigóticos y hojas (*ex vitro*) antes mencionados, también se han utilizado brotes obtenidos a partir de plántulas germinadas *in vitro* (Ahmed et al., 2012; Prabhu et al., 2017). Lo anterior hace notar una evidente necesidad de probar otro tipo de explantes, en particular aquellos que conserven la identidad clonal de la planta

madre para los experimentos de transformación genética. Hasta la fecha no se tiene conocimiento de tales reportes, a pesar de que ya ha sido posible la obtención de plantas completas a partir de yemas axilares en algunos genotipos de aguacate, lo que resalta la importancia de realizar más investigaciones en esta área de estudio.

3.5. Literatura citada

- Acosta-Rangel, A., Li, R., Mauk, P., Santiago, L., & Lovatt, C. J. (2021). Effects of temperature, soil moisture and light intensity on the temporal pattern of floral gene expression and flowering of avocado buds (*Persea americana* cv. Hass). *Scientia Horticulturae*, 280, 109940. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2021.109940>
- Acosta-Rangel, A. M., Li, R., Celis, N., Suarez, D. L., Santiago, L. S., Arpaia, M. L., & Mauk, P. A. (2019). The physiological response of 'Hass' avocado to salinity as influenced by rootstock. *Scientia Horticulturae*, 256. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2019.108629>
- Ahmed, M. F., Kantharajah, A. S., & Holford, P. (2001). Factors affecting adventitious shoot and root formation from the avocado cultivar "Hass" (*Persea americana*, Mill.) *in vitro*. *Gartenbauwissenschaft*, 66(6), 293–297.
- Ahmed, M. F., Kantharajah, A. S., & Holford, P. (2012). Genetic transformation studies on avocado cultivar "Hass" (*Persea americana*). *American Journal of Plant Sciences*, 3(09), 1225–1231. <https://doi.org/10.4236/ajps.2012.39148>
- Albert, V. A., Soltis, D. E., Carlson, J. E., Farmerie, W. G., Wall, P. K., Ilut, D. C., Solow, T. M., Mueller, L. A., Landherr, L. L., Hu, Y., Buzgo, M., Kim, S., Yoo, M. J., Frohlich, M. W., Perl-Treves, R., Schlarbaum, S. E., Bliss, B. J., Zhang, X., Tanksley, S. D., ... Leebens-Mack, J. H. (2005). Floral gene resources from basal angiosperms for comparative genomics research. *BMC Plant Biology*, 5. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-5-5>
- Altendorf. (2019). *Major tropical fruits*. Statistical Compendium, FAO, 01, 18.
- Álvarez Bravo, A., Salazar García, S., Ruiz Corral, J. A., & Medina García, G. (2017). Escenarios de cómo el cambio climático modificará las zonas productoras de aguacate 'Hass' en Michoacán. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 19, 4035–4048. <https://doi.org/10.29312/remexca.v0i19.671>
- Araújo, R. G., Rodriguez-Jasso, R. M., Ruiz, H. A., Pintado, M. M. E., & Aguilar, C. N. (2018). Avocado by-products: Nutritional and functional properties. *Trends in Food Science and Technology*, 80, 51–60. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.07.027>
- Barceló-Muñoz, A., Encina, C. L., Simón-Pérez, E., & Pliego-Alfaro, F. (1999). Micropropagation of adult avocado. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 58(1), 11–17. <https://doi.org/10.1023/A:1006305716426>
- Bergh, B. (1992). The origin, nature, and genetic improvement of the avocado. *California Avocado Society*, 76, 61–75.
- Blumenfeld, A., & Shmuel, G. (2022). Development of seeded and seedless avocado fruits. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 99(5), 442–448. <https://doi.org/10.21273/jashs.99.5.442>

- Chabikwa, T. G., Barbier, F. F., Tanurdzic, M., & Beveridge, C. A. (2020). *De novo* transcriptome assembly and annotation for gene discovery in avocado, macadamia and mango. *Scientific Data*, 7(1), 1–7. <https://doi.org/10.1038/s41597-019-0350-9>
- Chanderbali, A. S., Albert, V. A., Leebens-Mack, J., Altman, N. S., Soltis, D. E., & Soltis, P. S. (2009). Transcriptional signatures of ancient floral developmental genetics in avocado (*Persea americana*; Lauraceae). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(22), 8929–8934. <https://doi.org/10.1073/pnas.0811476106>
- Chaparro-Pulido, C. A., Montiel, M. M., Palomo-Ríos, E., Mercado, J. A., & Pliego-Alfaro, F. (2014). Development of an efficient transient transformation protocol for avocado (*Persea americana* Mill.) embryogenic callus. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, 50(2), 292–298. <https://doi.org/10.1007/s11627-013-9564-2>
- Christenhusz, M. J. M., & Byng, J. W. (2016). The number of known plants species in the world and its annual increase. *Phytotaxa*, 261(3), 201–217. <https://doi.org/10.11646/phytotaxa.261.3.1>
- Cooper, P. (1987). Advances in micropropagation of avocado. *Acta Horticulturae*, 212, 571–576.
- Cortés-Rodríguez, M. A., López-Gómez, R., Martínez-Pacheco, M. M., Suárez-Rodríguez, L. M., Hernández-García, A., Salgado-Garciglia, R., Fernández, I. V., & Palomares, M. E. A. (2011). *In vitro* propagation of mexican race avocado (*Persea americana* Mill. var. *drymifolia*). *Acta Horticulturae*, 923, 47–52. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2011.923.5>
- Cruz-Hernández, A., Litz, W. R. E., & Lim, M. G. (1998). *Agrobacterium tumefaciens* - Mediated transformation of embryogenic avocado cultures and regeneration of somatic embryos. *Plant Cell Reports*, 17(6–7), 497–503. <https://doi.org/10.1007/s002990050431>
- Cruz-López, D. F., Caamal-Cauich, I., Pat-Fernández, V. G., & Reza Salgado, J. (2022). Competitividad de las exportaciones de aguacate Hass de México en el mercado mundial. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 13(2), 355–362. <https://doi.org/10.29312/remexca.v13i2.2885>
- Dalsaso, Ligia & Guevara, E. (1985). Multiplicación clonal *in vitro* del aguacate (*Persea americana*) variedad Fuerte. *Agronomía Costarricense*, 13(1), 61–71.
- Davenport, T. L. (1986). Avocado Flowering. *Horticultural Reviews*, 8, 257–289. <https://doi.org/10.1002/9781118060810.ch7>
- De la Vega-Rivera, A., & Merino-Pérez, L. (2021). Socio-environmental impacts of the avocado boom in the Meseta Purépecha, Michoacán, Mexico. *Sustainability*, 13(13). <https://doi.org/10.3390/su13137247>
- De la Viña, G., Barceló-Muñoz, A., & Pliego-Alfaro, F. (2000). Effect of culture media and irradiance level on growth and morphology of *Persea americana* Mill microcutting. *Annals of Operations Research*, 97(1–4), 131–141. <https://doi.org/10.1023/A>
- Degani, C., Goldring, A., & Gazit, S. (1989). Pollen parent effect on outcrossing rate in 'Hass' and 'Fuerte' avocado plots during fruit development. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 114(1), 106–111. <https://doi.org/10.21273/jashs.114.1.106>

- Dymond, K., Celis-Diez, J. L., Potts, S. G., Howlett, B. G., Willcox, B. K., & Garratt, M. P. D. (2021). The role of insect pollinators in avocado production: A global review. *Journal of Applied Entomology*, *145*(5), 369–383. <https://doi.org/10.1111/jen.12869>
- Fehér, A. (2019). Callus, dedifferentiation, totipotency, somatic embryogenesis: What these terms mean in the era of molecular plant biology? *Frontiers in Plant Science*, *10*. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00536>
- Frolich, E. F., & Platt, R. G. (1971). Use of the etiolation technique in rooting avocado Cuttings. *California Avocado Society Yearbook*, *9*, 97–109.
- Galindo-Tovar, M. E., Ogata-Aguilar, N., & Arzate-Fernández, A. M. (2008). Some aspects of avocado (*Persea americana* Mill.) diversity and domestication in Mesoamerica. *Genetic Resources and Crop Evolution*, *55*(3), 441–450. <https://doi.org/10.1007/s10722-007-9250-5>
- Gálvez Tuesta, O., & Chico-Ruiz, J. (2016). Callos embriogénicos inducidos en tallos de *Persea americana* Mill. “Palto” con diferentes concentraciones de reguladores del crecimiento. *Sagasteguiana*, *4*(2), 39–50.
- Gullino, M., Albajes, R., Al-Jboory, I., Angelotti, F., Chakraboti, S., Garret, K., Hurley, B. P., Juroszek, P., Makkouk, K., Pan, X., & Stephenson, T. (2021). Scientific review of the impact of climate change on plant pests. *Scientific review of the impact of climate change on plant pests*. FAO. <https://doi.org/10.4060/cb4769en>
- Gutiérrez-Contreras, M., Lara-Chávez, B. N., Guillén-Andrade, H., & Chávez-Bárceñas, A.T. (2010). Agroecología de la franja aguacatera en Michoacán, México. *Interciencia*, *35*(9), 47-653.
- Hernández, I., Fuentealba, C., Olaeta, J. A., Lurie, S., Defilippi, B. G., Campos-Vargas, R., & Pedreschi, R. (2016). Factors associated with postharvest ripening heterogeneity of ‘Hass’ avocados (*Persea americana* Mill.). *Fruits*, *71*(5), 259–268. <https://doi.org/10.1051/fruits/2016016>
- Hiti-Bandaralage, J. C., Hayward, A., & Mitter, N. (2017). Micropropagation of avocado (*Persea americana* Mill.). *American Journal of Plant Sciences*, *8*(11), 2898. <https://doi.org/10.4236/ajps.2017.811197>
- Hong, S., Lim, Y. P., Kwon, S. Y., Shin, A. Y., & Kim, Y. M. (2021). Genome-wide comparative analysis of flowering-time genes; insights on the gene family expansion and evolutionary perspective. *Frontiers in Plant Science*, *12*, 1–13. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.702243>
- Ibarra-Laclette, E., Méndez-Bravo, A., Pérez-Torres, C. A., Albert, V. A., Mockaitis, K., Kilaru, A., López-Gómez, R., Cervantes-Luevano, J. I., & Herrera-Estrella, L. (2015). Deep sequencing of the Mexican avocado transcriptome, an ancient angiosperm with a high content of fatty acids. *BMC Genomics*, *16*(1), 1–18. <https://doi.org/10.1186/s12864-015-1775-y>
- Ibarra-López, A., Ojeda-Zacarías, Ma. del C., García-Zambrano, E. A., & Gutiérrez-Diez, A. (2017). Inducción *in vitro* de brotes de dos cultivares de aguacate raza Mexicana *Persea americana* var. *drymifolia* Schltdl. & Cham. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, *7*(2), 337–347. <https://doi.org/10.29312/remexca.v7i2.348>
- James, D. J. (1987). Cell and tissue culture technology for the genetic manipulation of temperate fruit trees. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, *5*(1), 33–79. <https://doi.org/10.1080/02648725.1987.10647834>

- Knight Jr, R. J. (1999). Genetic diversity in avocado In M. L. Arpaia & R. Hofshi (Eds.), *Avocado Brainstorming. Session I. Plant Breeding and Genetics* (pp. 16–18). University California Riverside.
- Limera, C., Sabbadini, S., Sweet, J. B., & Mezzetti, B. (2017). New biotechnological tools for the genetic improvement of major woody fruit species. *Frontiers in Plant Science*, 8, 1–16. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01418>
- Litz, R. E., Raharjo, S. H. T., & Gómez-Lim, M. A. (2007). Plant recovery following transformation of avocado with anti-fungal protein and sam hydrolase genes. *Acta Horticulturae*, 738, 447–450. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2007.738.55>
- Lobo Arias, M. (1977). *Dicogamia en flores de aguacate* (pp. 37–44). Instituto Colombiano Agropecuario.
- Ma, Q. H., & Liu, Y. C. (2009). Expression of isopentenyl transferase gene (ipt) in leaf and stem delayed leaf senescence without affecting root growth. *Plant Cell Reports*, 28(11), 1759–1765. <https://doi.org/10.1007/s00299-009-0776-1>
- Márquez-Martín, B., Barceló-Muñoz, A., Pliego-Alfaro, F., & Sánchez-Romero, C. (2012). Somatic embryogenesis and plant regeneration in avocado (*Persea americana* Mill.): Influence of embryogenic culture type. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*, 21(2), 180–188. <https://doi.org/10.1007/s13562-011-0091-0>
- Marutani-Hert, M., Bowman, K. D., McCollum, G. T., Mirkov, T. E., Evens, T. J., & Niedz, R. P. (2012). A dark incubation period is important for *Agrobacterium*-mediated transformation of mature internode explants of sweet orange, grapefruit, citron, and a citrange rootstock. *PLoS ONE*, 7(10), 1–11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0047426>
- Matsuo, N., & Banno, H. (2008). The Arabidopsis transcription factor ESR1 induces *in vitro* shoot regeneration through transcriptional activation. *Plant Physiology and Biochemistry*, 46(12), 1045–1050. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2008.07.007>
- Mohamed-Yasseen, Y. (1993). Morphogenesis of avocado *in vitro*. A Review. *California Avocado Society yearbook*, 77, 101–105.
- Molinier, J., Thomas, C., Brignou, M., & Hahne, G. (2002). Transient expression of ipt gene enhances regeneration and transformation rates of sunflower shoot apices (*Helianthus annuus* L.). *Plant Cell Reports*, 21(3), 251–256. <https://doi.org/10.1007/s00299-002-0504-6>
- Nhut, D. T., Thi, N. N., Khiet, B. L. T., & Luan, V. Q. (2008). Peptone stimulates *in vitro* shoot and root regeneration of avocado (*Persea americana* Mill.). *Scientia Horticulturae*, 115(2), 124–128. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2007.08.011>
- Niedz, R. P., & Bausher, M. G. (2002). Control of *in vitro* contamination of explants from greenhouse- and field-grown trees. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, 38(5), 468–471. <https://doi.org/10.1079/IVP2002316>
- Oláh, R. (2017). The use of activated charcoal in grapevine tissue culture. *Vitis - Journal of Grapevine Research*, 56(4), 161–171. <https://doi.org/10.5073/vitis.2017.56.161-171>
- Osorio, C. R., Velásquez, F. A. G., Correal, A. G., Bonilla, J. M. T., & Trujillo, A. I. U. (2018). *In vitro* propagation of avocado (*Persea americana* Mill. cv. Hass) through morphogenesis. *Acta Agronomica*, 67(1), 1–24. <https://doi.org/10.15446/acag.v67n1.61474>

- Oster, J. D., Stottlmyer, D. E., & Arpaia, M. L. (2007). Salinity and water effects on 'Hass' avocado yields. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 132(2), 253–261. <https://doi.org/10.21273/jashs.132.2.253>
- Palomo-Ríos, E., Barceló-Muñoz, A., Mercado, J. A., & Pliego-Alfaro, F. (2012). Evaluation of key factors influencing *Agrobacterium*-mediated transformation of somatic embryos of avocado (*Persea americana* Mill.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 109(2), 201–211. <https://doi.org/10.1007/s11240-011-0086-5>
- Palomo-Ríos, E., Cerezo, S., Mercado, J. A., & Pliego-Alfaro, F. (2017). *Agrobacterium*-mediated transformation of avocado (*Persea americana* Mill.) somatic embryos with fluorescent marker genes and optimization of transgenic plant recovery. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 128(2), 447–455. <https://doi.org/10.1007/s11240-016-1122-2>
- Peterson, P. A. (1955). Dual cycle of avocado flowers study of the continuous dual opening cycle of the avocado flower shows need of large flying insects for pollination. *California Agriculture*, 9(10), 6–7.
- Petri, C., & Burgos, L. (2005). Transformation of fruit trees. Useful breeding tool or continued future prospect? *Transgenic Research*, 14(1), 15–26. <https://doi.org/10.1007/s11248-004-2770-2>
- Pliego-Alfaro, F., & Litz, R. E. (2007). Biotechnology and avocado improvement. *California Avocado Society Yearbook*, 90, 149-167.
- Pliego-Alfaro, F., & Murashige, T. (1988). Somatic embryogenesis in avocado (*Persea americana* Mill.) in vitro. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 12(1), 61–66. <https://doi.org/10.1007/BF00043108>
- Pliego-Alfaro, F., Palomo-Ríos, E., Mercado, J. A., Pliego, C., Barceló-Muñoz, A., López-Gómez, R., Hormaza, J. I., & Litz, R. E. (2020). *Persea americana* avocado. In R. E. Litz, F. Pliego-Alfaro, & J. I. Hormaza (Eds.). *Biotechnology of fruit and nut crops* (2nd ed., pp. 258–281). CABI.
- Prabhu, S. A., Ndlovu, B., Engelbrecht, J., & Van Den Berg, N. (2017). Generation of composite *Persea americana* (Mill.) (avocado) plants: A proof-of-concept-study. *PLoS ONE*, 12(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0185896>
- Quintero-Jiménez, A., Heredia-García, E., Aguirre-Mancilla, C. L., Raya-Pérez, J. C., Ramírez-Pimentel, J. G., & Iturriaga, G. (2020). Embriogénesis y organogénesis de aguacate criollo mexicano. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 11(7), 1525–1536. <https://doi.org/10.29312/remexca.v11i7.2274>
- Raharjo, S. H. T., & Litz, R. E. (2005). Micrografting and *ex vitro* grafting for somatic embryo rescue and plant recovery in avocado (*Persea americana*). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 82(1), 1–9. <https://doi.org/10.1007/s11240-004-5486-3>
- Raharjo, S. H. T., Witjaksono, N. F. N., Gomez-Lim, M. A., Padilla, G., & Litz, R. E. (2008). Recovery of avocado (*Persea americana* Mill.) plants transformed with the antifungal plant defensin gene PDF1.2. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, 44(4), 254–262. <https://doi.org/10.1007/s11627-008-9117-2>
- Raharjo, S., Witjaksono, E. D., Gomez-Lim, M., Suarez, I., & Litz, R. (2003). Genetic transformation of avocado. *Acta Horticulturae*, 692, 115-118.
- Rendón-Anaya, M., Ibarra-Laclette, E., Méndez-Bravo, A., Lan, T., Zheng, C., Carretero-Paulet, L., Perez-Torres, C. A., Chacón-López, A., Hernandez-Guzmán, G., Chang, T. H., Farr, K. M., Brad Barbazuk, W., Chamala, S., Mutwil, M., Shivhare, D., Alvarez-Ponce, D., Mitter, N., Hayward, A., Fletcher, S., ... Herrera-

- Estrella, L. (2019). The avocado genome informs deep angiosperm phylogeny, highlights introgressive hybridization, and reveals pathogen-influenced gene space adaptation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 116(34), 17081–17089. <https://doi.org/10.1073/pnas.1822129116>
- Rodríguez, N., Capote, M., & Zamora, V. (1999). Cultivo *in vitro* del aguacatero (*Persea americana* Mill.). *Revista Chapingo Serie Horticultura*, 5, 231–237.
- Rohwer, J. G. (1993). Lauraceae. *Flowering Plants · Dicotyledons*, 89(1789), 366–391. https://doi.org/10.1007/978-3-662-02899-5_46
- Salazar-Garcia, S., & C. J. Lovatt. (2002). Flowering of avocado (*Persea americana* Mill.). I. Inflorescence and flower development. *Revista Chapingo Serie Horticultura*, 8(1), 71–75.
- Salazar-Gonzalez, J. A., Castro-Medina, M., Bernardino-Rivera, L. E., Martínez-Terrazas, E., Casson, S. A., & Urrea-López, R. (2023). *In - planta* transient transformation of avocado (*Persea americana*) by vacuum agroinfiltration of aerial plant parts. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 152, 635–646. <https://doi.org/10.1007/s11240-022-02436-9>
- Salazar-González, J., Martínez-terrazas, E., Casson, S. A., & Urrea-lopez, R. (2022). Leaf wounding and jasmonic acid act synergistically to enable efficient *Agrobacterium*-mediated transient transformation of *Persea americana*. *Research Square*. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-1631178/v1>
- Sánchez-González, E. I., Gutiérrez-Díez, A., & Mayek-Pérez, N. (2020). Outcrossing rate and genetic variability in Mexican race avocado. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 145(1), 53–59. <https://doi.org/10.21273/JASHS04785-19>
- Scora, R. W., & Bergh, B. (1990). the origins and taxonomy of avocado (*Persea americana*) Mill. Lauraceae. *Acta Horticulturae*, 275, 387–394. <https://doi.org/10.17660/actahortic.1990.275.47>
- Seijo, M. F., Patricia, A., Fiquitiva, B., Kosky, R. G., Ramírez, Y. G., & Autor, C. (2004). Formación de callos de *Persea americana* Mill. cultivar Catalina a partir de segmentos de hojas de plantas *in vitro*. *Bioteconología Vegetal*, 4(2), 85–90.
- Sharma, R., Liang, Y., Lee, M. Y., Pidatala, V. R., Mortimer, J. C., & Scheller, H. V. (2020). *Agrobacterium*-mediated transient transformation of sorghum leaves for accelerating functional genomics and genome editing studies. *BMC Research Notes*, 13(1), 1–7. <https://doi.org/10.1186/s13104-020-04968-9>
- Skalák, J., Cerný, M., Jedelský, P., Dobrá, J., Ge, E., Novák, J., Hronková, M., Dobrev, P., Vanková, R., & Brzobohatý, B. (2016). Stimulation of ipt overexpression as a tool to elucidate the role of cytokinins in high temperature responses of *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany*, 67(9), 2861–2873. <https://doi.org/10.1093/jxb/erw129>
- Smith, C. E. (1966). Archeological evidence for selection in avocado. *Economic Botany*, 20(2), 169–175. <https://doi.org/10.1007/BF02904012>
- Song, G. Q., Prieto, H., & Orbovic, V. (2019). *Agrobacterium*-mediated transformation of tree fruit crops: Methods, progress, and challenges. *Frontiers in Plant Science*, 10, Article 226. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00226>
- Stamp, J. A., & Meredith, C. P. (1988). Proliferative somatic embryogenesis from zygotic embryos of grapevine. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 113(6), 941–945. <https://doi.org/10.21273/jashs.113.6.941>

- Storey, W. B., Bergh, B., & Zentmyer, G. A. (1986). The origin, indigenous range, and dissemination of the avocado. *California Avocado Society Yearbook*, 70, 127–133.
- Suarez, I. E., Schnell, R. A., Kuhn, D. N., & Litz, R. E. (2006). Recovery and indexing of avocado plants (*Persea americana*) from embryogenic nucellar cultures of an avocado sunblotch viroid-infected tree. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 84(1), 27–37. <https://doi.org/10.1007/s11240-005-7532-1>
- Sugiyama, M. (2002). Organogenesis *in vitro*. *Tanpakushitsu Kakusan Koso. Protein, Nucleic Acid, Enzyme*, 47(12), 1587–1592.
- Tamayo-Ramos, D. I., Salazar-González, J. A., Casson, S. A., & Urrea-López, R. (2022). Old and new horizons on *Persea americana* transformation techniques and applications. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 150(2), 253–266. <https://doi.org/10.1007/s11240-022-02268-7>
- Tyurin, A. A., Suhorukova, A. V., Kabardaeva, K. V., & Goldenkova-Pavlova, I. V. (2020). Transient gene expression is an effective experimental tool for the research into the fine mechanisms of plant gene function: Advantages, limitations, and solutions. *Plants*, 9(9), 1–19. <https://doi.org/10.3390/plants9091187>
- Vaghchhipawala, Z., Rojas, C.M., Senthil-Kumar, M., Mysore, K.S. (2011). Agroinoculation and agroinfiltration: Simple tools for complex gene function analyses. In A. Pereira (Ed.) *Plant reverse genetics. Methods in molecular biology* (Vol. 678, pp. 65–76). Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-60761-682-5_6
- Vancanneyt, G., Schmidt, R., O'Connor-Sanchez, A., Willmitzer, L., & Rocha-Sosa, M. (1990). Construction of an intron-containing marker gene: Splicing of the intron in transgenic plants and its use in monitoring early events in *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *MGG Molecular & General Genetics*, 220(2), 245–250. <https://doi.org/10.1007/BF00260489>
- Vergara-Pulgar, C., Rothkegel, K., González-Agüero, M., Pedreschi, R., Campos-Vargas, R., Defilippi, B. G., & Meneses, C. (2019). *De novo* assembly of *Persea americana* cv. “Hass” transcriptome during fruit development. *BMC Genomics*, 20(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/s12864-019-5486-7>
- Witjaksono. (1997). Development of protocols for Avocado tissue culture: somatic embryogenesis, protoplast culture, shoot proliferation and protoplast fusion (Doctoral dissertation, University of Florida).
- Witjaksono, & Litz, R. E. (1999). Induction and growth characteristics of embryogenic avocado cultures. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 58(1), 19–29. <https://doi.org/10.1023/A:1006370912755>
- Witjaksono, Litz, R. E., & Pliego-Alfaro, F. (1999). Somatic embryogenesis of avocado (*Persea americana* Mill.). In S. M. Jain, P. K. Gupta, & R. J. Newton (Eds.), *Somatic embryogenesis in woody plants* (Vol. 5, pp. 197–214). Springer. https://doi.org/10.1007/978-94-011-4774-3_13
- Witney, G. W., Arpaia, M. L., Clegg, M. T., & Douhan, G. W. (2005). Avocado germplasm preservation and breeding program in California. *New Zealand and Australia Avocado Grower’s Conference, September, 8*.
- Young, M. J. (1983). Avocado callus and bud culture. *Proceedings of the Florida State Horticulture Society*, 96(1), 181–182.
- Zafar, T., & Sidhu, J. S. (2011). Avocado: Production, quality, and major processed products. *Handbook of Vegetables and Vegetable Processing, 1871*, 525–543. <https://doi.org/10.1002/9780470958346.ch26>

- Zirari, A., & Lionakis, S. M. (1994). Effect of cultivar, explant type, etiolation pretreatment and the age of plant material on the *in vitro* regeneration ability of avocado (*Persea americana*). *Acta Horticulturae*, 365, 69–76. <https://doi.org/10.17660/actahortic.1994.365.6>
- Ziv, D., Zviran, T., Zezak, O., Samach, A., & Irihimovitch, V. (2014). Expression profiling of FLOWERING LOCUS T-like gene in alternate bearing 'Hass' avocado trees suggests a role for PaFT in avocado flower induction. *PLoS ONE*, 9(10), Article e110613. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0110613>
- Zulfiqar, B., Abbasi, N. A., Ahmad, T., & Hafiz, I. A. (2009). Effect of explant sources and different concentrations of plant growth regulators on *in vitro* shoot proliferation and rooting of avocado (*Persea americana* Mill.) cv. Fuerte. *Pakistan Journal of Botany*, 41(5), 2333–2346.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Material vegetal

Las plantas madre utilizadas fueron árboles adultos de 10 años de edad de los cultivares Hass y Duke 7 (Figura 1) localizados en el Campo Agrícola Experimental Fitotecnia de la Universidad Autónoma Chapingo, localizado en el municipio de Texcoco en las coordenadas latitud norte 19°29'31" y longitud oeste 98°52'31" a una altitud de 2250 msnm y un clima templado semiseco. De igual manera se recolectaron frutos inmaduros de árboles de la raza mexicana, así como de los cultivares Hass y Thomas (Figura 2).

Los árboles adultos fueron tratados con bactericidas y fungicidas durante dos meses previos a la toma de explantes con dos aplicaciones por semana en "drench" de Ridomil® (1.5 ml L⁻¹), Agri-mycin 100® (2 g L⁻¹) y Antrak® (1 g L⁻¹); mientras que de manera foliar se aplicó Dap Plus® (1 ml L⁻¹) con Agri-mycin 100 (2 g L⁻¹) y Antrak (0.5 g L⁻¹).



Figura 1. Brotes de árboles adultos de aguacate.



Figura 2. Frutos inmaduros de aguacate recolectados a 7 meses de la floración.

De igual manera se utilizaron como fuentes de explantes árboles injertados de 'Duke 7' etiolados (Figura 3A) y sin etiolar (Figura 3B), así como árboles germinados de la raza mexicana de 5 meses de edad (Figura 3C) que fueron trasladados a condiciones de invernadero. Estos fueron tratados con 2 g L⁻¹ de Agri-mycin100 y Captan una vez por semana por lo menos cuatro semanas a previas a la toma de explantes.

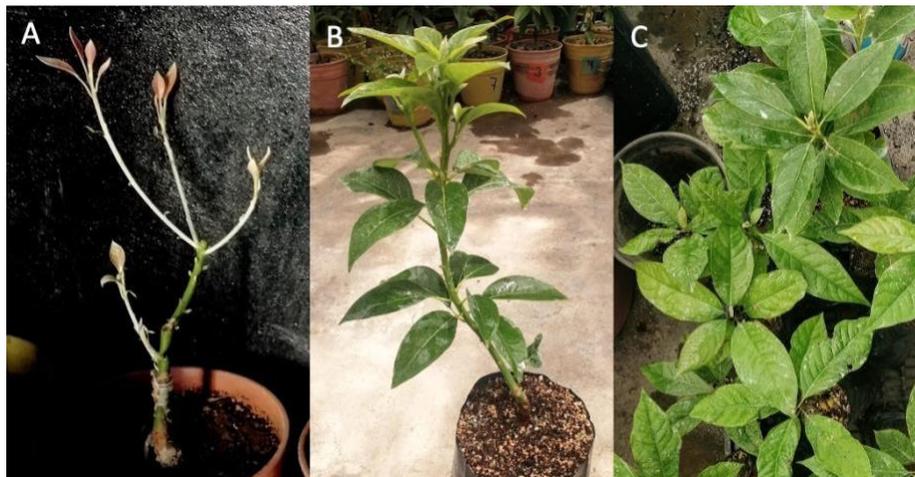


Figura 3. Material vegetal de invernadero. Brotes etiolados de cv. Duke 7 de 19 semanas (A). Plantas de 5 meses de 'Duke 7' (B) y criollo mexicano (C).

4.2. Desinfección externa de explantes

Los explantes recolectados consistieron en segmentos nodales jóvenes de 10 cm de longitud (Figura 4), los cuales fueron colocados inmediatamente en una solución de agua antioxidante (150 mg L^{-1} de ácido cítrico y 100 mg L^{-1} de ácido ascórbico) con jabón en polvo comercial y 4-5 gotas de Tween-20 por litro. Después se trasladaron al laboratorio donde las varetas fueron seccionadas nuevamente en fragmentos de 2-3 cm y junto con las hojas fueron talladas suavemente con las yemas de los dedos ya que el uso de cepillos puede resultar muy abrasivo para retirar las impurezas superficiales. Posteriormente, se colocaron bajo un chorro de agua corriente por aproximadamente 30 segundos.

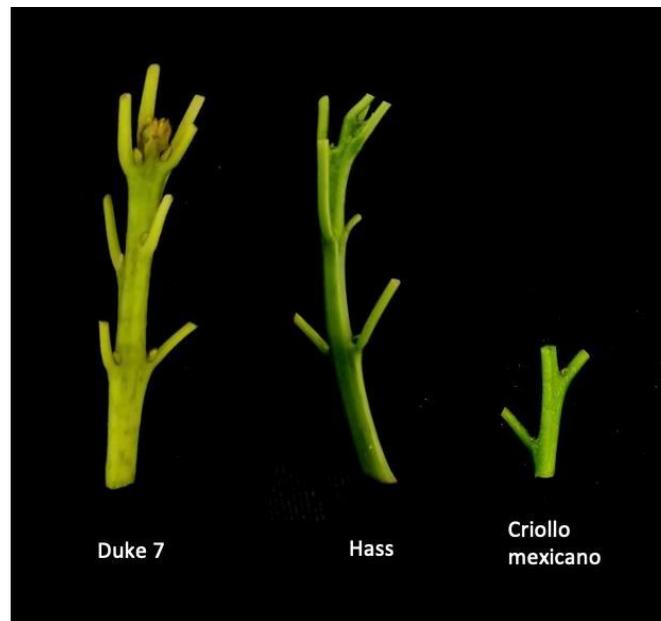


Figura 4. Segmentos nodales de aguacate utilizados.

4.3. Desinfección interna y establecimiento *in vitro* de explantes nodales de árboles adultos

Después de la desinfección externa, se llevaron los explantes a la campana de flujo. La desinfección interna consistió en la inmersión de los explantes en una solución de pesticidas (Antrak y Agri-mycin100 a una concentración de 2 g L⁻¹) por 30 minutos, seguido de una segunda inmersión en alcohol al 70 % por 3 minutos y por último se colocaron en una solución de hipoclorito de sodio por 10 minutos a una concentración del 5 y 1 % para el establecimiento de los experimentos de callogénesis y brotación, respectivamente. Una vez realizado todo el proceso de desinfección, se realizaron tres enjuagues finales con una solución de agua antioxidante estéril para eliminar restos que pueden resultar tóxicos para el explante si no son eliminados por completo. Posteriormente, los tallos desinfectados fueron seccionados nuevamente en fragmentos de aproximadamente 1 cm de longitud con una o dos yemas axilares y se sembraron de manera vertical en los medios de cultivo.

Los explantes se sembraron inicialmente en medios de cultivo con los tratamientos para brotación y callogénesis antes mencionados y que se describen en los Cuadros 3 y 4, respectivamente.

Cuadro 3. Tratamientos evaluados para inducción de brotes en cvs. Hass y Duke 7.

Tratamiento	Fitoreguladores (mg.L ⁻¹)	
	KIN	BA
T0	0.0	0.0
T1	0.1	0.0
T2	0.3	0.0
T3	0.0	0.1
T4	0.0	0.3

KIN: kinetina, BA: 6 -bencilaminopurina

Cuadro 4. Tratamientos evaluados en la inducción de callos en cvs. Hass y Duke 7.

Tratamiento	Fitoreguladores (mg.L ⁻¹)		
	TDZ	2,4-D	Picloram
T0	0	0	0
T1	0	0	1
T2	0.1	0	1
T3	0.3	0	1
T4	0.1	0	0
T5	0.3	0	0
T6	0	0.1	1
T7	0	0.3	1
T8	0	0.1	0
T9	0	0.3	0

TDZ: Thidiazurón, 2,4-D: Ácido 2,4-diclorofenoxiacético

4.4. Experimentos realizados a partir de plantas jóvenes de invernadero

4.4.1. Protocolo de desinfección interna de explantes

Considerando los problemas de necrosamiento y contaminación que se presentaron en los explantes obtenidos de árboles adultos y que se detallan más adelante, se planteó la siguiente serie de lavados (Cuadro 5) para la desinfección interna de los explantes nodales de árboles jóvenes.

Cuadro 5. Secuencia de lavados para la desinfección de explantes provenientes de plantas de invernadero.

Lavado	Agentes desinfectantes	Concentración	Tiempo
1	Pesticidas	2 g L ⁻¹	30 min
	Alcohol	80 %	2 min
	Peróxido de Hidrógeno	50 %	5 min
	Timsen	4 g L ⁻¹	5 min
2	Pesticidas	2 g L ⁻¹	30 min

	Vacío	-0.07 MPa	3 min
	Alcohol	80 %	2 min
	Peróxido de Hidrógeno	50 %	5 min
	Timsen	4 g L ⁻¹	5 min
3	Pesticidas	2 g L ⁻¹	30 min
	Alcohol	80 %	2 min
	Peróxido de Hidrógeno	50 %	5 min
	Timsen	4 g L ⁻¹	10 min
4	Pesticidas	2 g L ⁻¹	30 min
	Vacío	-0.07 MPa	3 min
	Alcohol	80 %	2 min
	Peróxido de Hidrógeno	50 %	5 min
	Timsen	4 g L ⁻¹	10 min

4.4.2. Agentes antioxidantes adicionados al medio de cultivo

Con el objetivo de disminuir el necrosamiento de los explantes que se presentó durante los experimentos anteriores con árboles adultos, se consideró la adición de carbón activado al medio de cultivo en combinación con ácido cítrico + ácido ascórbico o polivinilpirrolidona (PVP), Como se muestra en el Cuadro 6, tomando como tratamiento testigo el ácido cítrico + ácido ascórbico que se empleó en los experimentos con árboles adultos.

Cuadro 6. Tratamientos de antioxidantes adicionados al medio de cultivo en cv. Duke 7 y criollo mexicano.

Tratamiento	Ácido cítrico (150 mg L ⁻¹)	Ácido ascórbico. (100 mg L ⁻¹)	PVP (70 mg L ⁻¹)	CA (1 g.L ⁻¹)
T0	+	+	-	-
T1	+	+	-	+
T2	-	-	+	+

CA: Carbón activado

4.4.3. Tratamientos para inducción de callo

El medio base para la inducción de callo consistió en las sales Murashige y Skoog (1962) (MS) adicionadas con vitaminas Gamborg, sacarosa (30 g.L⁻¹), PVP (70 mg.L⁻¹) carbón activado (1g.L⁻¹) y agar Sigma-Aldrich (7 g.L⁻¹). Se ajustó el pH del medio a 5.7, y se esterilizó en autoclave a 121 °C y 1.1 kg/cm² por 15 minutos. Los cultivos se mantuvieron bajo condiciones de oscuridad a 25 °C con subcultivos cada cuatro semanas. Los tratamientos con reguladores que se evaluaron para la inducción de callo se describen en el (Cuadro 7).

Cuadro 7. Tratamientos evaluados para la inducción de callos en cv. Duke 7 y Criollo mexicano.

Tratamiento	Picloram (mg.L⁻¹)
0	0.0
1	0.1
2	0.2

4.4.4. Tratamientos para inducción de brotes

Los tratamientos para la inducción de brotes de plantas jóvenes ‘Duke 7’ y criollo mexicano se describen en el Cuadro 8. El medio base consistió en las sales MS adicionadas con vitaminas Gamborg, sacarosa (20 g L⁻¹), sulfato de adenina (80 mg L⁻¹), PVP (70 mg L⁻¹), carbón activado (1 g L⁻¹), AgNO₃ (70 mg L⁻¹), y agar Sigma-Aldrich (7 g L⁻¹). Se ajustó el pH del medio a 5.7, y esterilizó en autoclave a 121 °C y 1.1 kg/cm² por 15 minutos. Los cultivos se mantuvieron bajo condiciones de oscuridad a 25°C durante las primeras dos semanas para promover la inducción de brotes por etiolación (Osorio et al., 2018; Zirari & Lionakis, 1994) y disminuir la fenolización de los explantes; posteriormente fueron transferidos a condiciones de fotoperiodo 16/8 con una intensidad lumínica de 35 μmol m⁻² s⁻¹.

Cuadro 8. Tratamientos evaluados para la inducción de brotes en cv. Duke 7 y Criollo mexicano.

Tratamiento	Fitoreguladores (mg.L ⁻¹)		
	KIN	BA	GA ₃
T0	0.0	0.0	0.0
T1	0.0	0.3	0.3
T2	0.0	1.0	0.3
T3	0.0	3.0	0.1
T4	0.3	0.0	0.3
T5	1.0	0.0	0.3
T6	3.0	0.0	0.1

KIN: kinetina, BA: 6-bencilaminopurina, GA₃: Ácido giberélico.

4.5. Establecimiento *in vitro* de embriones cigóticos

Se recolectaron frutos inmaduros de los genotipos ‘Hass’, ‘Thomas’ y Criollo mexicano, los cuales se sometieron a una desinfección superficial con una solución de jabón en polvo comercial + NaClO₂ al 15 % por 10 minutos y fueron almacenados a 5 °C. Previo a su establecimiento, dentro de la campana de flujo, se retiraron las semillas y se colocaron en una solución de 2 g L⁻¹ de sales cuaternarias (Timsen) por 15 minutos. Posteriormente se separaron los cotiledones de las semillas para aislar los embriones.

Los embriones cigóticos fueron sembrados en el medio de inducción y mantenimiento utilizado por (Quintero-Jiménez et al., 2020), el cual consistió en las sales Gamborg, piridoxina (1 mg L⁻¹), tiamina (1 mg L⁻¹), mio-inositol (100 mg L⁻¹), sacarosa (20 g L⁻¹), picloram (0.2 mg L⁻¹), carbón activado (1 g L⁻¹) y agar Sigma-Aldrich (7 g L⁻¹). Se ajustó el pH del medio a 5.7, y esterilizó en autoclave a 121 °C y 1.1 kg/cm² por 15 minutos. Los cultivos se mantuvieron bajo condiciones de oscuridad a 25 °C y los subcultivos se realizaron cada dos semanas.

4.6. Agroinfección de tallos de *Persea americana* Mill.

4.6.1. Cepas de *Agrobacterium*

Se probaron las cepas de *Agrobacterium tumefaciens* GV3101, EHA105 y LBA4404 transformadas mediante electroporación con el vector binario p35GUSint (Vancanneyt et al., 1990) para la agroinfección de tallos de ~1 cm con una o dos yemas axilares de 'Duke 7', y criollo mexicano con cortes longitudinales; así como segmentos de tallos de 5 mm y hojas de plántulas de Criollo mexicano germinadas *in vitro* a partir de embriones cigóticos maduros (Figura 5) con el objetivo de identificar mediante expresión transitoria la cepa más adecuada para la transformación de cada uno de los cultivares evaluados.



Figura 5. Plántulas germinadas de 17 semanas de criollo mexicano.

La preparación de los cultivos de *Agrobacterium* consistió en la inoculación de las colonias en medio líquido Luria-Bertani (LB) suplementado con 100 mg/L de acetosiringona e incubadas en agitación por 24 horas. Posteriormente, se centrifugaron y el pellet fue resuspendido en medio de co-cultivo líquido (MBp), ajustando a una densidad óptica celular $OD_{600} = 0.5$ para la infiltración.

4.6.2. Metodologías de transformación y condiciones de cultivo

Se realizaron dos metodologías de para la transformación por agroinfección. La metodología de transformación 1 (MT1) consistió únicamente en la inmersión de los explantes por 25 minutos en el medio de co-cultivo con cada una de las cepas en constante agitación. La metodología de transformación 2 (MT2) se describe a continuación:

1. Agroinmersión por 25 minutos en constante agitación.
2. Tratamiento de sonicación por 3 minutos en el equipo Ultrasonics® (117 VAC, 50-60 Hz).
3. Tratamiento de vacío por 5 minutos en un desecador a -0.07 MPa.
4. Nuevamente agroinmersión por 10 minutos en constante agitación.

Una vez realizado el proceso anterior, los explantes se colocaron en sanitas estériles para eliminar el exceso de líquido de los explantes y fueron sembrados en cajas petri con medio de co-cultivo MBp de manera horizontal. Este consistió en las sales MS con vitaminas B5, sacarosa (30 g L⁻¹), PVP (80 mg L⁻¹), picloram (0.2 mg L⁻¹), carbón activado (1 g L⁻¹) y agar Sigma-Aldrich (7 g L⁻¹). Los explantes permanecieron en el medio de co-cultivo (Marutani-Hert et al., 2012) durante 3 y 6 días para MT1 y MT2, respectivamente, luego fueron subcultivados en medio MBp adicionado con 50 µg/ml de Meropenem para eliminar la bacteria. Todo el experimento se llevó a cabo bajo condiciones de oscuridad a 25 °C para facilitar la agroinfección por *Agrobacterium* (Marutani-Hert et al., 2012) Se realizó una evaluación cualitativa de la expresión transitoria tomando muestras de 5 explantes para cada variedad y explante a los 3, 10 y 17 días mediante tinción histoquímica X-Gluc de acuerdo a Jefferson et al. (1987).

4.7. Diseño experimental y análisis estadísticos

Los diseños experimentales que se detallan a continuación consistieron en un completamente al azar y para su análisis se utilizó el software estadístico R versión 4.1.2. Las variables respuesta de necrosamiento, inducción y color de callos fueron evaluadas de acuerdo con los niveles y categorías de respuesta de los Cuadros 9 , 10 y 11 respectivamente.

Cuadro 9. Niveles de necrosamiento.

Nivel	Superficie necrosada (%)
0	0–10
1	15 – 25
2	30 – 45
3	50 – 65
4	70 – 85
5	90 – 100

Cuadro 10. Niveles de inducción de callo.

Nivel	Inducción de callo
0	Sin callo
1	Poco
2	Moderado
3	Abundante

Cuadro 11. Categorías asociadas al color de callo.

Nivel	Inducción de callo
0	Sin callo
1	Transparente
2	Blanco
3	Amarillo–crema
4	Blanco–crema

4.7.1. Desinfección de explantes de plantas de invernadero ‘Duke 7’ y Criollo mexicano

Los tratamientos evaluados en la sección 4.4.1 para la desinfección de explantes provenientes de plantas jóvenes ‘Duke 7’ y Criollo mexicano consistieron en la aplicación de un tratamiento de vacío y un lavado con sales cuaternarias (Timsen) durante 5 o 10 minutos (Cuadro 12).

Cuadro 12. Tratamientos evaluados para la desinfección de explantes nodales Duke 7 y Criollo mexicano.

Tratamiento	Genotipo	Timsen	Vacío
1	Criollo mexicano	5 min	-
2			+
3		10 min	-
4			+
5	Duke 7	5 min	-
6			+
7		10 min	-
8			+

La unidad experimental consistió en tubos de ensayo con un explante por tubo y 10 repeticiones por tratamiento. Para el análisis estadístico de los diferentes tratamientos de lavado se planteó un modelo de regresión logística para evaluar la presencia (1) ausencia (0) de contaminación, y un modelo lineal simple para analizar el porcentaje de superficie necrosada de los explantes, considerando un promedio de oxidación para la evaluación de cada tratamiento. Los datos se registraron a los 30 y a los 60 días de su establecimiento.

El modelo estadístico utilizado se describe a continuación:

$$y = \mu + fob + var + tim + vac + e$$

Donde:

y = variable respuesta (contaminación o porcentaje de necrosamiento)
 μ = media general

fob = fecha de observación (30 o 60 días)
 var = Variedad Duke 7 o Criollo mexicano
 tim = tiempo de inmersión en timsen (5 o 10 minutos)
 vac = aplicación o no de vacío
 e = residual

4.7.2. Antioxidantes adicionados al medio de cultivo

Los tratamientos del experimento con agentes antioxidantes (Sección 4.4.2) para los genotipos 'Duke 7' y Criollo mexicano se detallan en el Cuadro 13.

Cuadro 13. Tratamientos evaluados para el experimento con antioxidantes.

Tratamiento	Genotipo	Antioxidantes
T1	Duke 7	Ac. Ascórbico + Ac. Cítrico (Testigo)
T2		Ac. Ascórbico + Ac. Cítrico + Carbón activado
T3		PVP + Carbón activado
T4	Criollo mexicano	Ac. Ascórbico + Ac. Cítrico
T5		Ac. Ascórbico + Ac. Cítrico + Carbón activado
T6		PVP + Carbón activado

La unidad experimental consistió en tubos de ensayo con un explante por tubo y 10 repeticiones por tratamiento con observaciones a los 7, 30 y 60 días de su establecimiento. El análisis estadístico para evaluar el porcentaje de necrosamiento de cada tratamiento de acuerdo con los niveles establecidos consistió en un modelo lineal simple, como se describe a continuación:

$$y = \mu + tto + fob + var + e$$

Donde:

y = variable respuesta (necrosamiento)

μ = media general

tto = tratamiento antioxidante

fob = fecha de observación (7,30 o 60 días)

var = Variedad Duke 7 o Criollo mexicano

e = residual

4.7.3. Inducción de callos

El diseño experimental del experimento para callogénesis de las plantas jóvenes Duke 7 y criollo mexicano (sección 4.4.3), consistió en un modelo de regresión logística binomial para asociar la presencia (1) ausencia (0) de callos a cada tratamiento (IC). Mientras que para evaluar el tamaño o nivel de inducción de callo (NIC) se realizó un modelo de regresión ordinal logística (Cuadro 10). Para evaluar el color del callo (CC) se utilizó un modelo de regresión multinomial lineal considerando la variable respuesta como categoría (Cuadro 11). La unidad experimental consistió en tubos de ensayo con un explante por tubo y 30 repeticiones por tratamiento con observaciones a los 30 y 60 días.

El modelo estadístico empleado fue:

$$y = \mu + fob + var + tto + e$$

Donde:

y = variable respuesta (IC, NIC, CC)

μ = media general

fob = fecha de observación (30 o 60 días)

tto = tratamiento

var = Variedad (Duke 7 o Criollo mexicano)

e = residual

4.7.4. Inducción de brotes

La unidad experimental para la inducción de brotes (Sección 4.4.4), consistió en frascos tipo gerber con cinco explantes por frasco y tres repeticiones por tratamiento con observaciones a los 15, 30 y 45 días de su establecimiento. Las variables respuesta evaluadas fueron el porcentaje de inducción de callo (PIC), porcentaje de inducción de brotes (PIB), número de brotes promedio (NBP) y largo de brotes promedio (LBP) para lo cual, el análisis estadístico consistió en un modelo lineal como se muestra a continuación:

$$y = \mu + fob + var + e$$

Donde:

y = variable respuesta (PIC, PIB, NBP, LBP)

μ = media general

fob = fecha de observación (15, 30 o 45 días)

var = Variedad Duke 7 o Criollo mexicano

e = residual

V. DISCUSIÓN

51. . Contaminación y necrosamiento de explantes

5.1.1. Explantes provenientes de árboles maduros

Al trabajar con especies donde no se tienen líneas puras establecidas, la única manera de mantener la identidad genética de la planta para su establecimiento *in vitro* es recolectando explantes provenientes de la misma, por lo que el procedimiento de desinfección del explante empleado para controlar la contaminación, es una etapa crucial ya que de ésta dependerá la viabilidad del explante a largo plazo, y en parte también, el nivel de respuestas morfogénicas que exhibirá. Se ha evidenciado en diversos estudios que la contaminación por hongos, bacterias y el necrosamiento del explante son los principales obstáculos junto con

la maduración incompleta, los principales factores que limitan en gran medida el establecimiento *in vitro* de aguacate (Hiti-Bandaralage & Hayward, 2017; Nhut et al., 2008); por lo que eliminar la contaminación del material vegetal es el primer paso para un establecimiento *in vitro* exitoso, particularmente para aquellas especies que de manera natural se encuentran bajo condiciones ambientales donde son constantemente infectadas por microorganismos endógenos y exógenos (Niedz & Bausher, 2002).

Los agentes desinfectantes más comúnmente utilizados para la desinfección de explantes en la mayoría de los cultivos son el alcohol y el cloro comercial (NaClO_3), en concentraciones y tiempos variables. Sin embargo, estos productos pueden llegar a resultar tóxicos para el explante a ciertas concentraciones y tiempos de inmersión, lo que en especies leñosas como el aguacate resulta particularmente relevante por la tendencia de fenolización de los tejidos (Ahmed et al., 2001). Este fue el caso de los primeros experimentos realizados en árboles adultos de 'Duke 7' y 'Hass', en donde los lavados utilizados previo al establecimiento de los experimentos, limitaron en gran medida las respuestas morfogénicas, principalmente en los tratamientos para brotación donde las yemas axilares se necrosaron como resultado del proceso de desinfección empleado, aunque la fenolización presentada se puede explicar también en parte por el uso de explantes provenientes de árboles adultos (Zirari & Lionakis, 1994). Por otro lado, aunque la pérdida de explantes por contaminación y/o necrosamiento, fue cercano al 80 %, la obtención de explantes limpios y callos abundantes fue posible en algunos tratamientos para callogénesis (Figuras 6 y 7) y de brotación (Figuras 8 y 9).

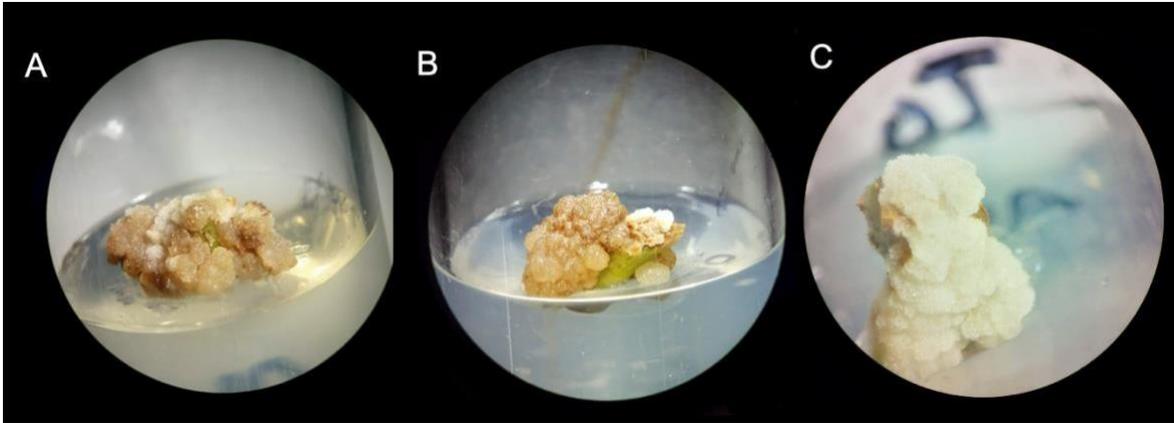


Figura 6. Morfología general de callos cv. Duke 7 en el experimento para callogénesis a 60 días de cultivo. A) TDZ(0.1 mg.L⁻¹)+ picloram(0.1 mg.L⁻¹), B) TDZ (0.3 mg.L⁻¹)+ (1 mg.L⁻¹), C) testigo

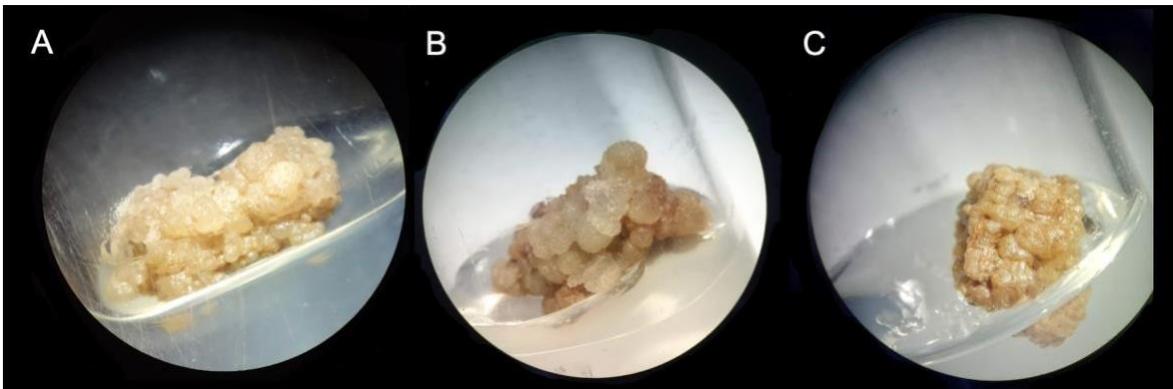


Figura 7. Morfología general de callos en el experimento de callogénesis en cv. Hass a 60 días de cultivo. A) TDZ (0.1 mg.L⁻¹), B) TDZ (0.3 mg.L⁻¹)+ picloram(1 mg.L⁻¹), C) 2,4-D (0.3 mg.L⁻¹)

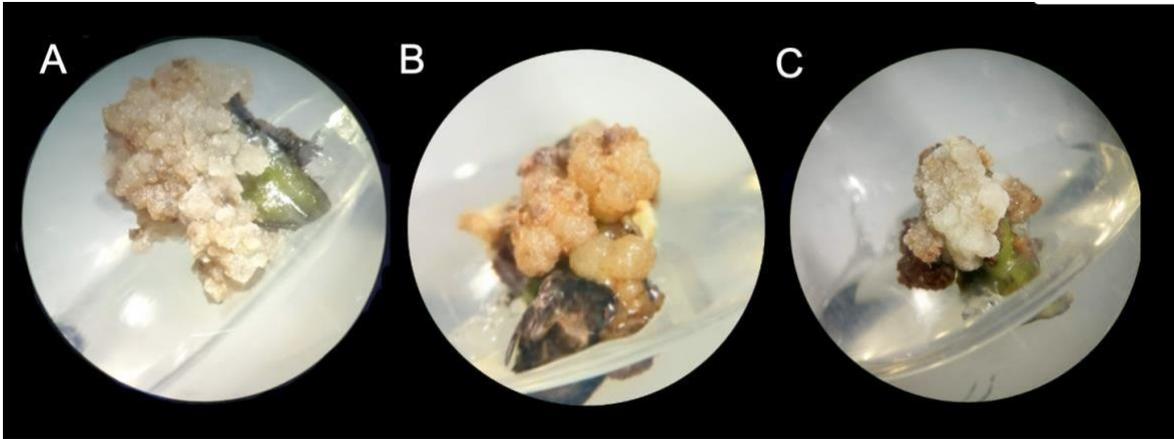


Figura 8. Morfología general de callos obtenidos en el experimento de brotación de árboles adultos cv. Duke 7 a los 60 días de cultivo. A) KIN (0.1 mg.L^{-1}), B,C) BA (0.3 mg.L^{-1})

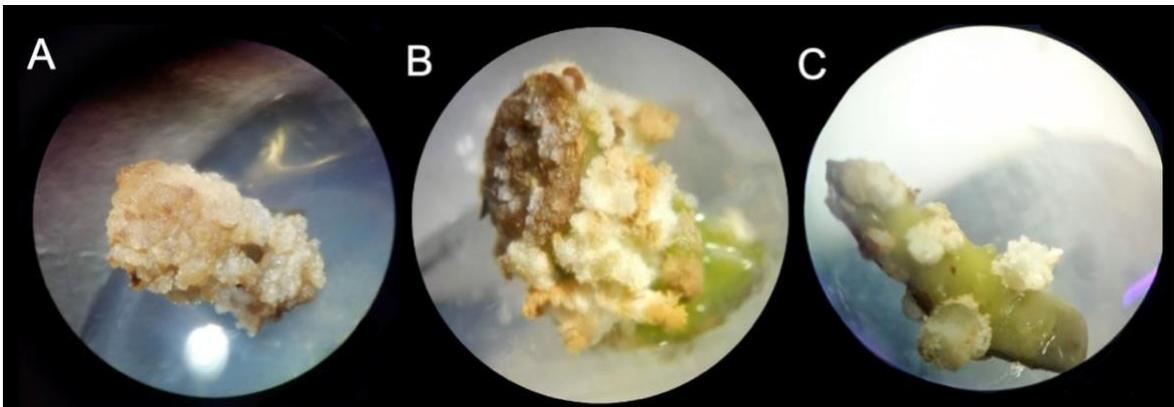


Figura 9. Morfología de callos del experimento de brotación cv. Hass a los 60 días de cultivo. A) testigo, B) BA (0.1 mg.L^{-1}), C) BA (0.3 mg.L^{-1})

5.1.2. Explantes provenientes de plantas de invernadero

Debido a la baja viabilidad de los explantes provenientes de árboles maduros, se propuso utilizar plantas jóvenes bajo condiciones de invernadero de los genotipos 'Duke 7' y criollo mexicano como nuevas fuentes de explantes y se realizó un experimento con diferentes agentes desinfectantes para determinar el mejor protocolo de lavados para maximizar la viabilidad de los mismos. En los Cuadros 14

y 15 se presentan los análisis de varianza para las variables contaminación y necrosamiento, respectivamente.

La variedad fue la única variable con un efecto significativo, siendo el genotipo Criollo mexicano el más susceptible a la contaminación y el necrosamiento (Cuadro 16). No se presentó diferencia significativa en las variables de tiempo de inmersión con Timsen, ni en la aplicación o no de vacío, así como tampoco en ninguno de los tiempos de observación (30 o 60 días) por lo que se puede asumir que cualquier tratamiento es efectivo para mantener porcentajes altos de viabilidad de los explantes por periodos largos de tiempo.

Cuadro 14. ANOVA de la variable contaminación para el experimento de desinfección.

	Df	Deviance	Resid.	Df	Resid.	Dev	Pr(>Chi)
NULL				159		94.949	
Datos\$OBS	1	0.0000		158		94.949	1.000000
Datos\$VARIEDAD	1	8.6103		157		86.339	0.003343 **
Datos\$TIEMPO_TIMSEN	1	0.3302		156		86.008	0.565531
Datos\$VACIO	1	1.3373		155		84.671	0.247509

 Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Cuadro 15. ANOVA para la variable necrosamiento del experimento de desinfección.

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Datos\$OBS	1	22	22.5	0.0286	0.8660
Datos\$VARIEDAD	1	28622	28622.5	36.3386	1.166e-08 ***
Datos\$TIEMPO_TIMSEN	1	903	902.5	1.1458	0.2861
Datos\$VACIO	1	202	202.5	0.2571	0.6128
Residuals	155	122088	787.7		

 Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Cuadro 16. Prueba Tukey para medias de variedades para la variable respuesta necrosamiento.

```

Mean Square Error: 787.7
Datos$VARIEDAD, means
  Datos.Necro_Porcentaje      std      r Min Max
C                31.50 36.66820 80    0 100
D                 4.75 14.66719 80    0  80

Alpha: 0.05 ; DF Error: 155
Critical Value of Studentized Range: 2.793619
Minimum Significant Difference: 8.766024
Treatments with the same letter are not significantly different.

  Datos$Necro_Porcentaje groups
C                31.50      a
D                 4.75      b
    
```

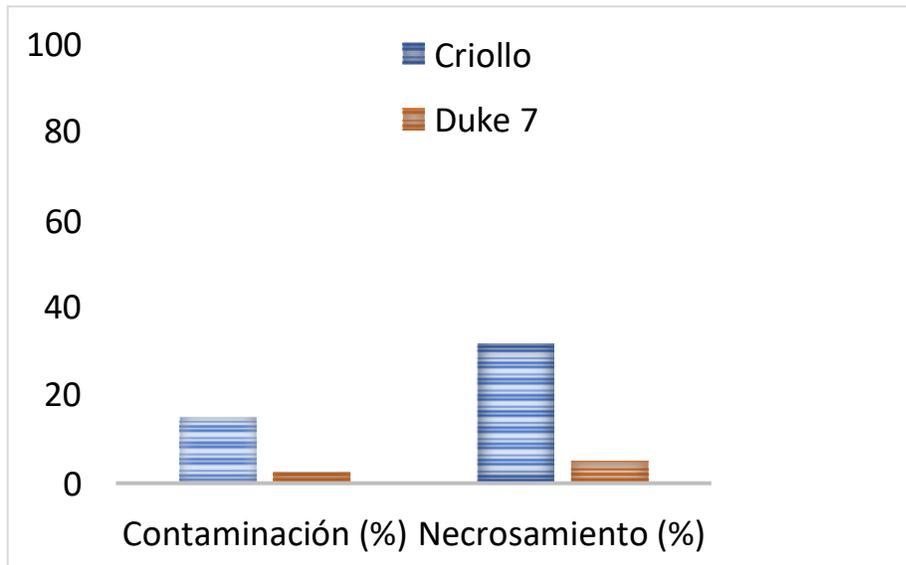


Figura 10. Porcentaje de necrosamiento y contaminación a los 60 días.

5.2.2. Efecto de antioxidantes adicionado al medio de cultivo (EA)

Las variables significativas para el experimento con antioxidantes fueron la fecha de observación y el tratamiento empleado (Cuadro 17). En este último caso, los tratamientos 2 y 3 suplementados con 1 g L⁻¹ de carbón activado mostraron diferencias significativas respecto al tratamiento testigo suplementado únicamente

con ácido ascórbico y ácido cítrico (Cuadro 18), lo que resalta el antioxidante del carbón activado a los 60 días de cultivo (Cuadro 19).

Cuadro 17. ANOVA del experimento con antioxidantes para porcentaje de necrosamiento.

Response: Datos\$Necro_Porcentaje							
	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)		
Datos\$OBS	2	7853.3	3926.7	24.1333	5.62e-10	***	
Datos\$VARIEDAD	1	55.6	55.6	0.3414	0.559754		
Datos\$TRATAMIENTO	2	2080.0	1040.0	6.3918	0.002096	**	
Residuals	174	28311.1	162.7				

 Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Cuadro 18. Pueba Tukey de comparación de medias de tratamientos para variable necrosamiento.

Datos.Necro_Porcentaje	std	r	Min	Max
T0	13 20.444219	60	0	80
T1	7 10.300568	60	0	40
T2	5 9.477896	60	0	40

Alpha: 0.05 ; DF Error: 174
 Critical Value of Studentized Range: 3.343121
 Minimum Significant Difference: 5.505164
 Treatments with the same letter are not significantly different.

Datos\$Necro_Porcentaje	groups
T0	13 a
T1	7 b
T2	5 b

Cuadro 19. Prueba de comparación de medias Tukey para el día de observación de la variable necrosamiento.

Datos.Necro_Porcentaje	std	r	Min	Max
30	6.000000 9.242496	60	0	20
60	17.333333 19.988697	60	0	80
7	1.666667 5.574356	60	0	20

Alpha: 0.05 ; DF Error: 174
 Critical Value of Studentized Range: 3.343121
 Minimum Significant Difference: 5.505164
 Treatments with the same letter are not significantly different.

Datos\$Necro_Porcentaje	groups
60	17.333333 a
30	6.000000 b
7	1.666667 b

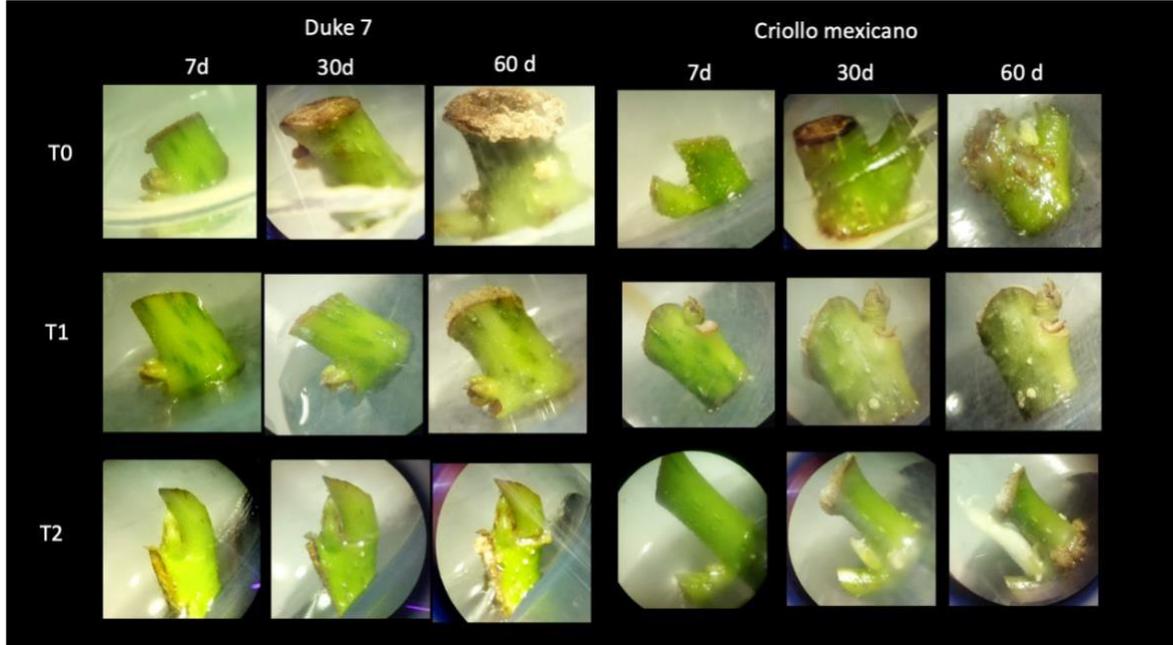


Figura 11. Experimento con antioxidantes a los 7, 30 y 60 días de cultivo en Duke 7 (izquierda) y var. *drymifolia* (derecha). Los tratamientos T0 (testigo), T1 y T2 se muestran de la fila superior a la inferior, respectivamente.

52 Respuestas morfológicas *in vitro* de los genotipos ‘Duke 7’ y criollo mexicano

- Experimento para inducción de callo

En el Cuadro 20 se puede observar que la variedad y los tratamientos muestran diferencias significativas. Los resultados particulares pueden ser analizados mediante una tabla de coeficientes del modelo (Cuadro 21), donde el tratamiento 2 es estadísticamente diferente y el cv. Duke 7 es el genotipo que genera mayor cantidad de callo que la variedad criolla, aunque para ambas variedades, el tratamiento 2 (0.2 mg L⁻¹ de picloram) es el que induce una mayor cantidad de callos.

Cuadro 20. ANOVA de las variables predictoras (observación, variedad y tratamiento) para la variable respuesta IC.

	Df	Deviance	Resid.	Df	Resid. Dev	Pr(>Chi)
NULL				359	494.61	
Datos\$OBS	1	1.6213		358	492.99	0.2029136
Datos\$VARIEDAD	1	16.4528		357	476.54	4.988e-05 ***
Datos\$TRATAMIENTO	2	14.1215		355	462.42	0.0008581 ***

Signif. codes:	0	'***'	0.001	'**'	0.01	'*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Cuadro 21. Coeficientes de regresión logística para variable respuesta IC.

```
Call:
glm(formula = Datos$CALLO ~ Datos$OBS + Datos$VARIEDAD + Datos$TRATAMIENT
O,
     family = binomial(link = logit))

Deviance Residuals:
    Min       1Q   Median       3Q      Max
-1.788 -1.137  0.672  1.031  1.553

Coefficients:
              Estimate Std. Error z value Pr(>|z|)
(Intercept)   -0.8500    0.2512  -3.384 0.000715 ***
Datos$OBS60     0.2948    0.2222   1.327 0.184514
Datos$VARIEDAD D  0.9095    0.2232   4.076 4.59e-05 ***
Datos$TRATAMIENTOT1  0.4600    0.2673   1.721 0.085246 .
Datos$TRATAMIENTOT2  1.0187    0.2761   3.690 0.000224 ***
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
```

Por otro lado, para la variable respuesta NIC (tamaño del callo) considerando la escala antes mencionada con valores de 0 a 3, se utilizó una tabla de coeficientes (Cuadro 22) y sus intervalos de confianza (Cuadro 23) para evaluar cada efecto siguiendo un modelo de regresión logística ordinal.

Cuadro 22. Coeficientes para cada efecto en el modelo de regresión ordinal logística para la variable respuesta NIC.

	Value	Std. Error	t value	p value
Datos\$OBS60	0.5833243	0.2054215	2.839646	4.516369e-03**
Datos\$VARIEDADD	0.7827783	0.2070228	3.781122	1.561233e-04***
Datos\$TRATAMIENTOT1	0.6146046	0.2623855	2.342373	1.916157e-02*
Datos\$TRATAMIENTOT2	0.4454505	0.2493327	1.786571	7.400689e-02 ns

Cuadro 23. Intervalos de confianza perfilados y odds ratio (OR) para los efectos en el modelo para la variable respuesta NIC.

	OR	2.5 %	97.5 %
Datos\$OBS60	1.791986	0.18070550	0.9859430
Datos\$VARIEDADD	2.187542	0.37702114	1.1885355
Datos\$TRATAMIENTOT1	1.848925	0.10033847	1.1288706
Datos\$TRATAMIENTOT2	1.561193	-0.04323259	0.9341335

En cuanto a los niveles de inducción de callo, el tratamiento 1 fue estadísticamente significativo, lo cual significa que el tratamiento 1, aunque generó menor cantidad de callos que el tratamiento 2, tiene una probabilidad 1.85 veces superior de formar mayores masas de callo que en el tratamiento 2. De igual manera, es posible determinar que la variedad Duke 7 tiene mayores probabilidades de generar callo (2.19 veces superior a la variedad criolla), lo que corrobora datos anteriores, además de que la mayor formación de callo se presentó a los 60 días de cultivo.

Para la evaluación del color del callo (CC) se calcularon los p-valores a partir de un modelo de regresión multinomial (Cuadro 24).

Cuadro 24. P-valores para los efectos (variedad, tratamientos y observaciones) asociados al color de callo (CC).

	(Intercept)	OBS 60	VARIEDAD D	T1	T2
1	1.484933e-05	0.4808301ns	2.555327e-02**	0.81780941ns	0.132428
835ns					
2	4.773703e-08	0.2402957ns	2.382098e-05***	0.01633168*	0.0016
110**					
3	2.515713e-08	0.001239528**	5.359114e-01ns	0.16303214ns	0.006603
362**					
4	0.000000e+00	0.1037781ns	4.651147e-02*	0.00000000***	0.0000
00***					

Los resultados muestran que solo la variedad Duke 7 esta asociada de manera significativa al tipo de color transparente (1), blanco (2) y blanco-amarillo (4), con una significancia del color amarillo (3) unicamente a los 60 días de cultivo para ambas variedades. El tratamiento 1 esta asociado a los colores 2 y 4, mientras que el tratamiento 2 a los colores 2,3, y 4. De manera general se puede concluir que la aparición de callos amarillos se forma como consecuencia de un proceso de

maduración del callo a partir de los 60 días que resulta en ese color, considerando que los primeros callos en aparecer (alrededor de las dos semanas de cultivo), generalmente mostraban colores transparentes-blancos. Siguiendo esta línea sobre la maduración del callo asociada al color amarillo, se puede concluir también que el tratamiento 2 está relacionado con la maduración del callo y que los callos de la variedad Duke tardan más tiempo en madurar.

La morfología general de los callos obtenidos en ambos tratamientos se puede observar en las Figuras 12-15.

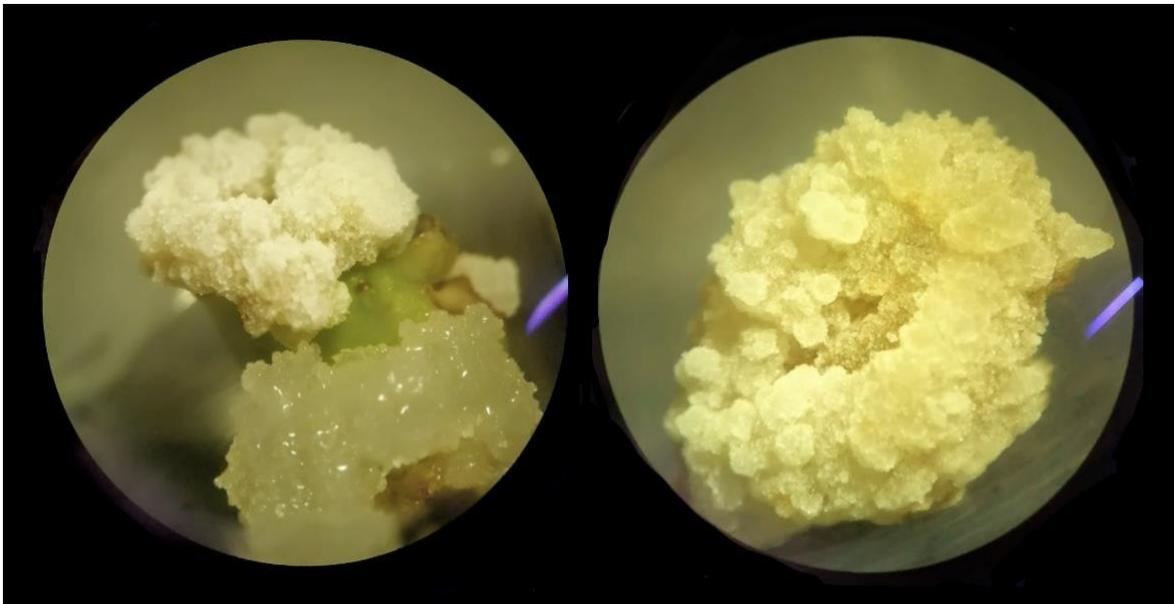


Figura 12. Morfología general de callos (C2) cv. Duke 7 a los 60 días de cultivo con 0.1 mg L^{-1} de picloram.

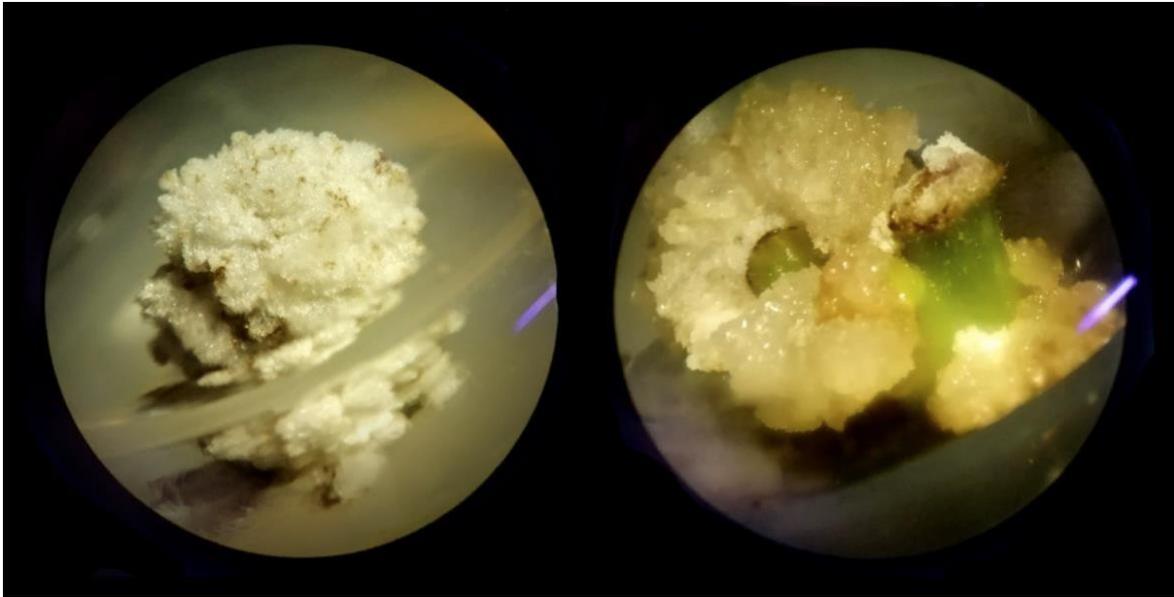


Figura 13. Morfología general de callos (C2) Criollo mexicano a los 60 días de cultivo con 0.1 mg L^{-1} de picloram.

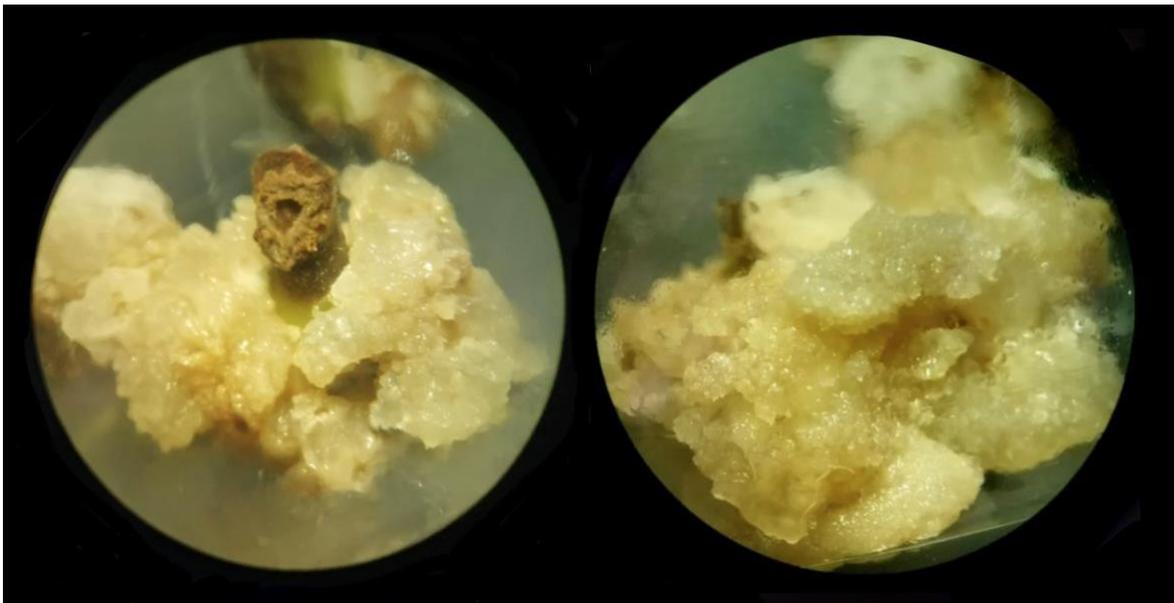


Figura 14. Morfología general de callos (C2) cv. Duke 7 a los 60 días de cultivo con 0.2 mg L^{-1} de picloram.

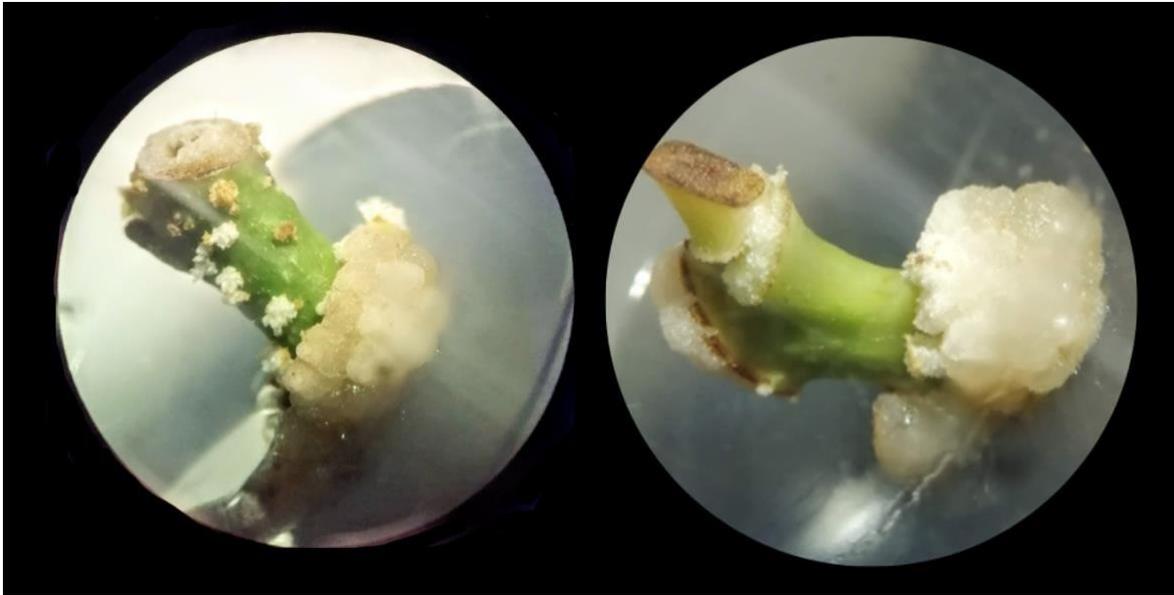


Figura 15. Morfología general de callos (C2) var. criolla a los 60 días de cultivo con 0.2 mg L^{-1} de picloram.

El uso de picloram en explantes de hojas (Seijo et al., 2004) y en embriones cigóticos ha resultado en un abundante formación de callo a bajas concentraciones (generalmente $0.1\text{-}0.2 \text{ mg.L}^{-1}$), en este último caso es particularmente utilizado para la inducción de embriones somáticos. Gálvez Tuesta & Chico-Ruiz, (2016) igualmente reportan la inducción de callos embriogénicos en cv. Hass a partir de segmentos internodales con la aplicación de reguladores BA/2,4-D y 2,4.D/TDZ a bajas concentraciones, con un nivel de inducción de callos igualmente baja; sin embargo, es el único reporte de este tipo y es necesaria una investigación más detallada al respecto.

En el presente estudio se planteó utilizar picloram para la inducción de callos ya que el uso de este regulador en explantes nodales no ha sido reportado en aguacate con anterioridad, y hasta donde se tiene conocimiento, Seijo et al. (2004) y Gálvez-Tuesta & Chico-Ruiz (2016) han realizado los únicos trabajos con un enfoque en la callogénesis en aguacate a partir de explantes somaclonales a pesar de que la formación de callo es ampliamente reportada prácticamente a partir de cualquier tipo de tejido en aguacate; en parte debido quizá a que la mayoría de los callos

generados no son morfogénicos (Nhut et al., 2008). Sin embargo, existe una amplia variedad de características morfológicas dentro de los callos de aguacate provenientes de diferentes explantes y combinaciones de reguladores que puede ser estudiada para determinar la capacidad embriogénica u organogénica de callos obtenidos de explantes somáticos.

De manera general los resultados obtenidos respaldan lo que se ha reportado en relación con una formación de callos más abundante con la aplicación de bajas dosis de auxinas, lo que además garantiza la estabilidad genética del material vegetal (Vikrant & Rashid, 2003).

- **Experimento para inducción de brotes**

La inducción de callo, aunque mínima en comparación con los experimentos para callogénesis, fue significativa para los tratamientos y las variedades evaluadas (Cuadro 25), presentándose en el 42.9 % de los explantes ‘Duke 7’ en comparación con el 8.57 % de la variedad criolla (Cuadro 26). Se destaca además que la ausencia de reguladores tiene un efecto negativo en la producción de callo (Cuadro 27, Figura 16).

La presencia de contaminación y necrosamiento a lo largo del experimento para ambas variedades fue mínima, presentándose en un 8.57 y 7.15%, respectivamente, a los 45 días de cultivo.

Cuadro 25. ANOVA para la variable respuesta PIC por variedad.

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Datos\$OBS	2	76	38	0.0896	0.9143306
Datos\$VARIEDAD	1	37035	37035	87.5758	7.58e-16 ***
Datos\$TRATAMIENTO	6	12108	2018	4.7720	0.0002207 ***
Residuals	116	49056	423		

 Signif. codes: 0 ‘***’ 0.001 ‘**’ 0.01 ‘*’ 0.05 ‘.’ 0.1 ‘ ’ 1

Cuadro 26. Prueba Tukey para comparación de medias entre variedades del experimento de brotación para PIC.

Alpha: 0.05 ; DF Error: 116
 Critical Value of Studentized Range: 2.801028

Minimun Significant Difference: 7.258007

Treatments with the same letter are not significantly different.

	Datos	PIC	groups
D.ET	42.860317		a
C	8.571429		b

Cuadro 27. Prueba Tukey para comparación de medias entre tratamientos de brotación para PIC.

Alpha: 0.05 ; DF Error: 116
 Critical Value of Studentized Range: 4.243676

Minimun Significant Difference: 20.57198

Treatments with the same letter are not significantly different.

	Datos	PIC	groups
T4	38.88889		a
T2	37.77778		ab
T6	28.88889		abc
T5	26.67778		abc
T1	20.00000		abc
T3	17.77778		bc
T0	10.00000		c

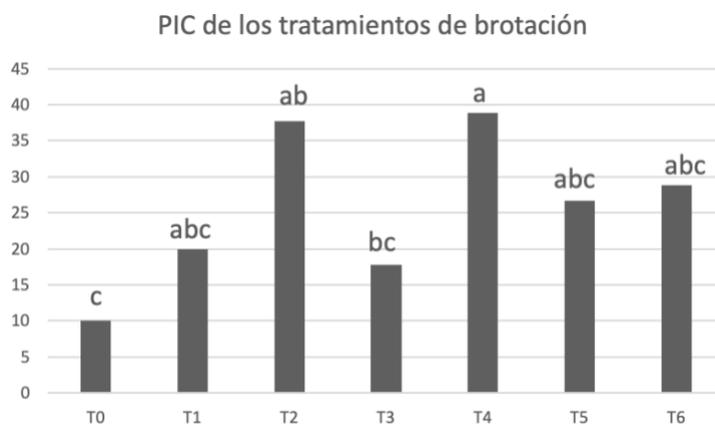


Figura 16. Porcentaje de inducción de callos de la variedad criolla a los 45 días de cultivo. Tratamientos con las mismas letras no son estadísticamente diferentes.

En cuanto a la inducción de brotes, ésta mostró diferencias significativas en cuanto a los días de observación, la variedad empleada y los tratamientos (Cuadro 28). A partir de los 30 días de cultivo la inducción de brotes fue mayor (Cuadro 29)

y la variedad criolla fue claramente superior en comparación de cv. Duke 7 (Figuras 16 y 17).

Cuadro 28. ANOVA del experiment de brotación para la variable respuesta PIB.

Analysis of Variance Table						
Response: Datos\$PIB						
	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)	
Datos\$OBS	2	8197	4098	11.6596	2.432e-05	***
Datos\$VARIEDAD	1	71429	71429	203.2077	< 2.2e-16	***
Datos\$TRATAMIENTO	6	4616	769	2.1886	0.04892	*
Residuals	116	40775	352			

 Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Cuadro 29. Prueba Tukey de comparación de medias de PIB para la variable observación.

Alpha: 0.05 ; DF Error: 116		
Critical Value of Studentized Range: 3.35759		
Minimun Significant Difference: 9.720181		
Treatments with the same letter are not significantly different.		
	Datos\$PIB	groups
45	37.14286	a
30	30.00000	a
15	17.61905	b



Figura 16. Brotes var. drymifolia a 45 días de cultivo.



Figura 17. Brotes cv. Duke 7 a 45 días de cultivo.

En el caso de la variedad criolla, de los siete tratamientos evaluados, los tratamientos 3 y 6 tuvieron efectos estadísticamente diferentes para la variable respuesta PIB, mostrando los porcentajes más bajos de inducción de brotes con relación a los demás tratamientos que no mostraron diferencias significativas entre ellos con un porcentaje de inducción de brotes promedio entre el 53 y 65 % a partir de los 30 días de cultivo (Cuadros 30,31, Figura 18). Cabe mencionar que los tratamientos 3 y 6 correspondían a la concentración más alta de citocininas BA y KIN evaluadas con 3 mg L⁻¹, mientras que los mejores tratamientos fueron aquellos con dosis más bajas de citocininas, incluyendo el tratamiento testigo que contenía solamente coadyuvantes de la brotación (sulfato de adenina y nitrato de plata).

Cuadro 30. ANOVA de la variable respuesta PIB para la variedad criolla.

Analysis of Variance Table						
Response: Datos_Criollo\$PIB						
	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)	
Datos_Criollo\$OBS	2	9155.6	4577.8	9.5567	0.0002797	***
Datos_Criollo\$TRATAMIENTO	6	8609.5	1434.9	2.9956	0.0133884	*
Residuals	54	25866.7	479.0			

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1						

Cuadro 31. Prueba Duncan de comparación de medias de los tratamientos para PIB de la variedad criolla.

Alpha: 0.05 ; DF Error: 116

Critical Range

2 3 4 5 6 7
17.51732 18.43588 19.04656 19.49455 19.84281 20.12416

Means with the same letter are not significantly different.

Datos_Criollo\$PIB	groups
T2	64.44444 a
T4	62.22222 a
T5	60.00000 a
T0	55.55556 a
T1	53.33333 a
T3	35.55556 b
T6	33.33333 b

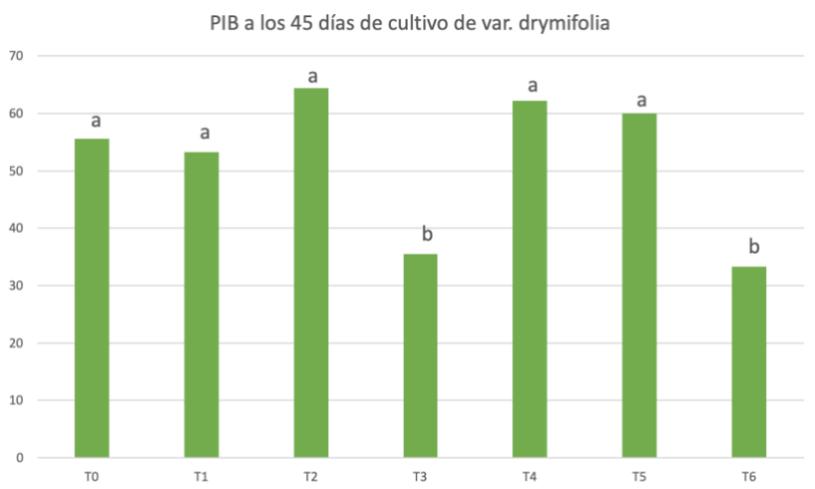


Figura 18. Porcentaje de inducción de brotes de la variedad criolla. Tratamientos con las mismas letras no son estadísticamente diferentes.

El alargamiento de los brotes de la variedad criolla comenzó a ser evidente a partir de los 30 días de cultivo donde además se presentó una diferencia significativa para los tratamientos empleados (Cuadro 32). Los tratamientos 4, 5 y 6 suplementados con la citocinina KIN tienen un efecto superior en cuanto al alargamiento de los brotes en comparación con los tratamientos donde se utilizó la citocinina BA (Cuadro 33, Figura 19), probablemente debido a que esta citocinina se opone a la dominancia apical y promueve la multiplicación de brotes (Dalsaso, Ligia & Guevara, 1985; Zulficar et al., 2009), aunque esto último tampoco fue el caso.

Por otro lado, cabe mencionar también, que a pesar de que el tratamiento 6 (KIN 3 mg L⁻¹ + AG₃ 0.1 mg L⁻¹) fue el peor evaluado en cuanto al promedio de inducción de brotes, al mismo tiempo fue el mejor para el alargamiento de los mismos con un promedio de 1.5 cm a los 45 días de cultivo. El peor tratamiento en ambos casos fue el tratamiento 3 (BA 3 mg L⁻¹ + AG₃ 0.1 mg L⁻¹).

Cuadro 32. ANOVA para la variable respuesta LBP de la variedad criolla.

Analysis of Variance Table						
Response: Datos_Criollo\$LBP_CM						
	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)	
Datos_Criollo\$OBS	2	21.1458	10.5729	42.5474	8.04e-12	***
Datos_Criollo\$TRATAMIENTO	6	8.1667	1.3611	5.4774	0.0001742	***
Residuals	54	13.4189	0.2485			

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1						

Cuadro 33. Prueba Tukey de comparación de tratamientos para la variable LBP de la variedad criolla.

Alpha: 0.05 ; DF Error: 54		
Critical value of Studentized		
Minimum Significant Difference		
Treatments with the same letter		
	Datos_Criollo\$LBP_CM	groups
T6	1.466667	a
T4	1.286667	ab
T5	1.233333	ab
T0	0.938889	abc
T2	0.783333	abc
T1	0.693333	bc
T3	0.354444	c

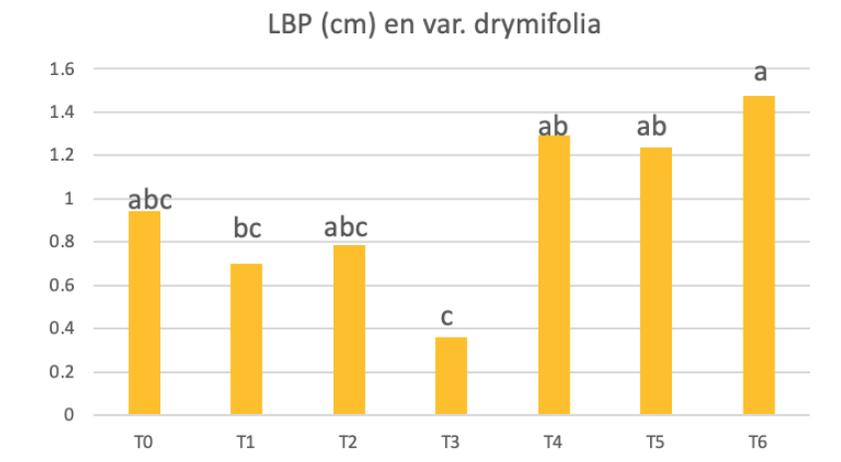


Figura 19. Longitud de brotes promedio en la var. Criolla. Tratamientos con las mismas letras no son estadísticamente diferentes.

Resultados similares en var. drymifolia son obtenidos por Cortés-Rodríguez et al., 2011) donde indicaron un porcentaje de inducción de brotes del 71.3 % a los 45 días con un tamaño aproximado de 2.25 cm después de 90 días de cultivo en un medio suplementado con concentraciones bajas de reguladores (IBA 0.5 mg L⁻¹ + BA 0.1 mg L⁻¹).

A la fecha se han encontrado cuatro estudios donde utilizan explantes nodales del cultivar Duke 7 para la inducción de brotes (Cooper, 1987; Harty 1985) y regeneración de plantas completas (Rodríguez et al., 1999; Zirary & Lionakis, 1994). Todos ellos a excepción de Harty (1985), utilizaron como fuente de explantes, plantas 'Duke 7' previamente etioladas en condiciones de invernadero con el objetivo de maximizar la obtención y la elongación de brotes, además de presentar menores tasas de fenolización; aunque Rodríguez et al. (1999) no indicaron la multiplicación de brotes. Sin embargo, este no fue el caso para los tratamientos evaluados en este experimento ya que ningún tratamiento resultó efectivo para la inducción de brotes dentro de los 45 días evaluados, además de que no se presentó diferencia significativa en el necrosamiento respecto a la variedad criolla. Los resultados previos con resultados positivos en cuanto a la inducción de brotes en

‘Duke 7’ de los estudios mencionados anteriormente, varían considerablemente en cuanto a la concentración y los reguladores empleados, y en algunos casos llegan a ser contradictorios, lo que resalta la importancia de realizar más estudios de regeneración con este genotipo en particular.

5.2.3 Embriones cigóticos

En el Cuadro 34 se pueden observar las respuestas obtenidas de germinación completa, incompleta (radial o apical), así como de la formación de callo a los 30 días de cultivo en medio de inducción y mantenimiento de embriones somáticos a partir de embriones cigóticos que se detalla con anterioridad.

Cuadro 34. Frutos recolectados y respuestas morfológicas obtenidas a 30 días de su establecimiento *in vitro*.

	Genotipos		
	‘Hass’	‘Thomas’	Criollo mexicano
Frutos recolectados	38	40	82
Diámetro promedio del fruto (cm)	10.9	14.2	10.2
Longitud promedio del fruto (cm)	6.5	7.3	9.3
Germinación completa (%)	0 %	7.5 %	21.9 %
Germinación incompleta (%)	13 %	10 %	14.6 %
Formación de callo (%)	26.3 %	100 %	100 %

Mientras que para el cv. Hass la formación de callo fue mínima, en el caso de los otros dos genotipos el callo se presentó en el 100 % de los explantes, aunque de manera más abundante en la variedad criolla. Sin embargo, la formación de estructuras embrionarias no se presentó en ninguna etapa del cultivo a pesar de

que su aparición ha sido reportada a partir de los 7 días después de su establecimiento en la variedad criolla (Quintero-Jiménez et al., 2020).

Los callos embriogénicos que se han reportado en aguacate, independientemente del genotipo, presentaron una morfología friable constituida por masas proembrionarias o estructuras globulares translúcidas (Quintero-Jiménez et al., 2020; Witjaksono et al., 1999). En este caso, los callos de los genotipos 'Thomas' y Criollo mexicano presentaron en todo momento una estructura más compacta sin ningún tipo de diferenciación a lo largo de los subcultivos (Figura 20 y 21) y con características morfológicas similares a los callos obtenidos de explantes nodales, probablemente debido a la etapa de desarrollo de los embriones empleados. Estudios sobre embriogénesis somática en 'Thomas' con embriones cigóticos inmaduros reportan el uso de estructuras globulares con frutos de longitud promedio no mayor a 0.5 cm (Cruz-Hernández et al., 1998; Witjaksono, 1997), mientras que en este caso se disponía de frutos 'Thomas' de 7.3 cm de longitud promedio; para el caso de la variedad criolla, se ha reportado el uso de embriones cigóticos en etapa cotiledonar con un diámetro promedio del fruto entre 5 y 8 cm de diámetro (Quintero-Jiménez et al., 2020) a diferencia de los 10.2 cm de diámetro promedio de los frutos que se emplearon en este caso. Mismo caso con el cv. Hass, donde Pliego-Alfaro y Murashige (1988) utilizaron frutos de 0.9 cm de longitud promedio. Las respuestas de germinación completa e incompleta que se presentaron se explican también por el uso de embriones cigóticos en etapas avanzadas de desarrollo.

Los callos se subcultivaron cada dos semanas durante 4 meses cuando estos comenzaron a exhibir síntomas de necrosis y muerte. La presencia de contaminación en este tipo de explantes fue nula.

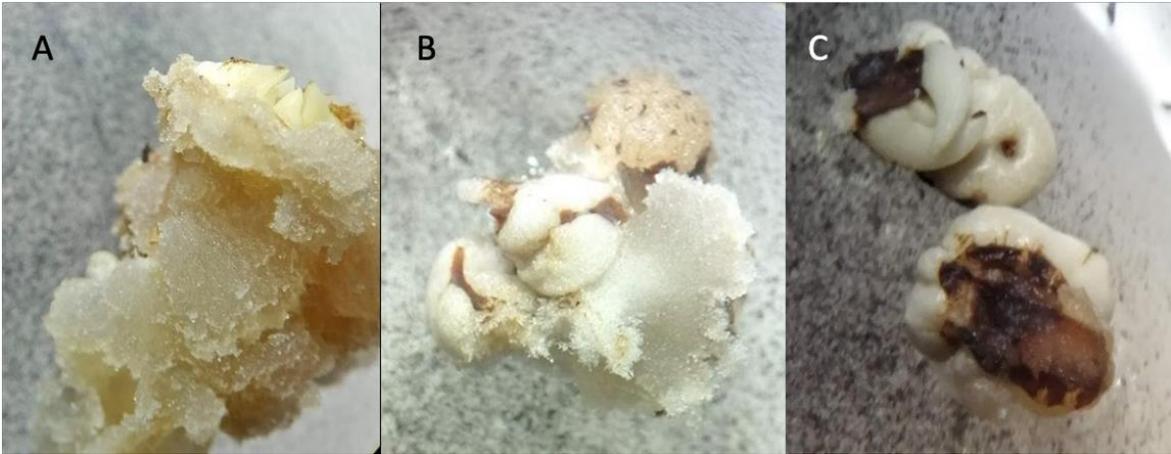


Figura 20. Embriones cigóticos inmaduros var. Criolla (A), cv. Thomas (B) y 'Hass' (C) en medio suplementado con 0.2 mg L⁻¹ de picloram a los 30 días.

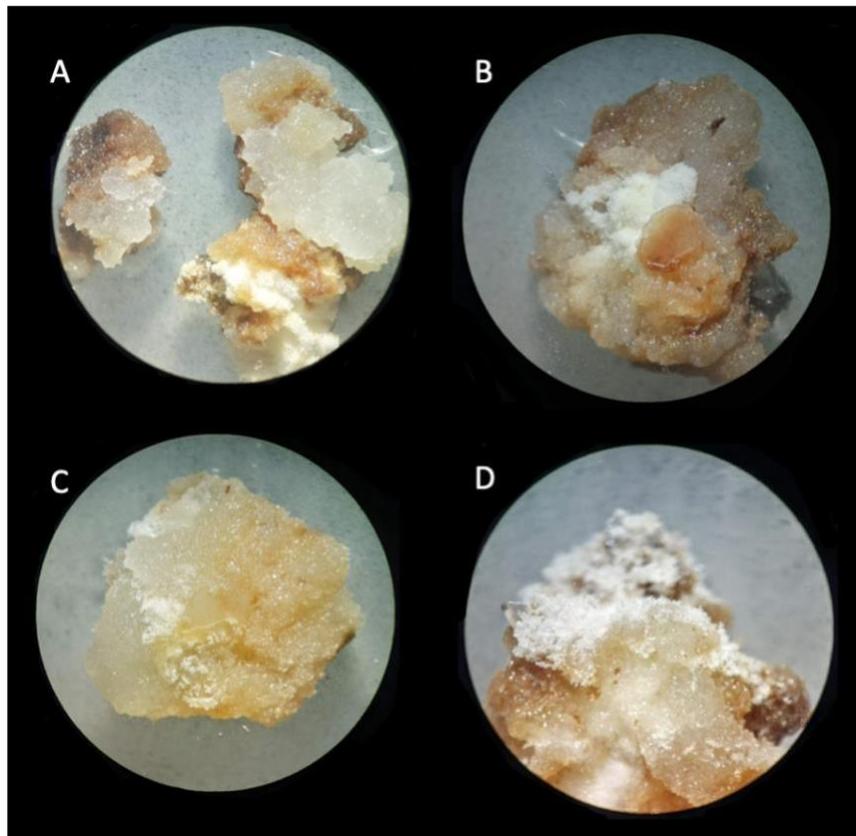


Figura 21. Subcultivos de callo derivado de embriones cigóticos inmaduros var. criolla (A,B) y cv. Thomas (C,D) en medio suplementado con 0.2 mg L⁻¹ de picloram a los 90 días de cultivo.

5.2. Expresión transitoria por agroinfección

Los ensayos de transformación realizados mediante las metodologías de transformación (MT1 y MT2) descritas en la sección 4.6.2, resultaron en un nivel de expresión evidentemente bajo, ya que por cuestiones de tiempo no fue posible realizar experimentos previos con diferentes concentraciones de acetosiringona, así como a diferentes tiempos de exposición a los tratamientos con vacío y/o sonicación para incrementar la respuesta de transformación de los tejidos, misma que se ve limitada en gran medida, debido a la activación de respuestas inmunes de la planta en respuesta a la infección de *Agrobacterium* (Pitzschke, 2013). A pesar de lo anterior, la expresión del gen GUS en algunos de los tejidos, aunque escasa, fue detectable (Figura 22); por lo que de estandarizar las metodologías empleadas cabría esperar una mayor eficiencia de transformación y en este sentido, los resultados aquí presentados pueden servir de referencia para la planificación de experimentos futuros.

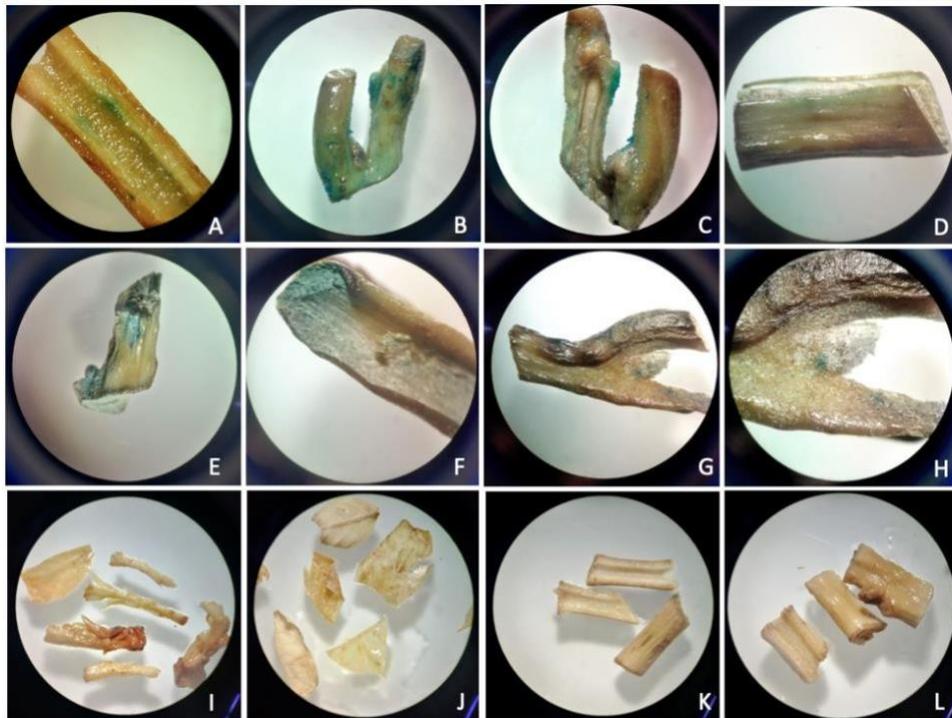


Figura 22. Niveles de expresión del gen GUS en aguacate. MT1: Tallo de criollo mexicano a los 10 días de la agroinfección con la cepa LBA4404(A). MT2: Tallos

de Duke 7 a los 17 días de la agroinfección con la cepa EHA105 (B-H). Expresión negativa general observada.

La cepa que mostró mayor eficiencia de transformación en los cinco explantes evaluados fue la cepa EHA105 a los 17 días de cultivo para el genotipo 'Duke 7' en la MT2, lo que hasta cierto punto cabría esperar ya que los métodos de agroinfección por inoculación o infiltración directa en hojas de aguacate no son efectivos y requieren de un tratamiento previo de microlasceración (Salazar et al., 2022). Sin embargo, es necesario realizar experimentos más extensivos para determinar una eficiencia estadística real de los tratamientos de transformación que se proponen aquí con diferentes cepas de *Agrobacterium* de acuerdo con los diferentes tejidos que se deseen transformar. En este sentido, cabe señalar que a la fecha no se han reportado trabajos de transformación genética en aguacate utilizando tejidos derivados de explantes nodales de plantas *ex vitro*, solamente a partir de explantes derivados de embriones cigóticos ya sea por embriogénesis somática o germinación *in vitro*, lo cual es una desventaja cuando no se trabaja con líneas ya establecidas y se desea mantener la identidad clonal de la planta madre con objetivos de mejoramiento genético; por lo que, considerando lo anterior, el uso de explantes nodales para transformación supondría una ventaja adicional.

VI. CONCLUSIONES

Las especies leñosas tienden a sufrir mayor necrosamiento como resultado del procedimiento de desinfección, por lo que debe emplearse un método eficiente que controle la contaminación pero que al mismo tiempo no presente toxicidad al explante para evitar el necrosamiento de los mismos, ya que estas fueron las principales limitantes para el establecimiento *in vitro* de los explantes derivados de árboles adultos. Los protocolos de desinfección deben ser optimizados de acuerdo con el grado de fenolización al que tienda cada genotipo; en este caso, 'Duke 7' fue la variedad que presentó menor necrosamiento respecto a 'Hass' y la variedad criolla. El uso de pesticidas, alcohol, peróxido de hidrógeno y sales cuaternarias

(Timsen) son igualmente efectivas para controlar la contaminación y el necrosamiento en los explantes evaluados con plantas jóvenes de invernadero con un promedio de viabilidad del 90 %, superior a los porcentajes de viabilidad obtenidos a partir de árboles adultos. Por otro lado, se encontró que la adición de 1 g L⁻¹ carbón activado al medio de cultivo en combinación de ácido ascórbico (100 mg L⁻¹) + ácido cítrico (100 mg L⁻¹) o PVP (70 mg L⁻¹), ayuda a disminuir el necrosamiento de los explantes establecidos *in vitro*.

La formación de callos estuvo presente en todos los experimentos evaluados tanto para brotación como callogénesis con o sin la adición de reguladores de crecimiento, aunque la adición de los mismos mostraba respuestas favorables para la formación de callo, mostrándose siempre superior en el genotipo Duke 7. Los embriones cigóticos obtenidos de frutos inmaduros de las variedades Hass, Thomas y criollo mexicano que fueron sembrados en un medio para inducción y mantenimiento de embriones suplementado con 0.2 mg.L⁻¹ de picloram resultó en una abundante formación de callos compactos aunque no se presentó diferenciación de estructuras embrionarias. En aguacate existe una amplia diversidad de morfologías de callos asociadas a diferentes dosis y concentraciones de reguladores con diferentes tipos de explantes, por lo que se hace necesario estudiar a profundidad las diferentes morfologías de los callos y su efecto en la diferenciación de tejidos para explorar nuevas vías de regeneración en aguacate.

Ha sido ampliamente documentado que la capacidad morfogénica de los explantes está estrechamente relacionada al genotipo del explante utilizado. Esto se corrobora con los experimentos realizados donde la variedad Duke 7 mostró mayor inducción de callos en comparación con la variedad criolla, y caso contrario con la inducción de brotes en donde la variedad criolla demostró ser más efectiva para los tratamientos evaluados. En este sentido, se destaca que el uso de citocininas KIN es superior que las citocininas BA en cuando a la longitud de los brotes, mientras que concentraciones altas de citocininas BA o KIN (3.0 mg L⁻¹) limitan la inducción de brotes.

En cuanto a los ensayos preliminares de transformación, la segunda metodología de transformación empleada en los segmentos nodales de los genotipos ‘Duke 7’ y criollo mexicano (con tratamientos previos de sonicación y vacío) resultó ser cualitativamente más efectiva que la metodología de transformación 1 por agroinmersión convencional. Si bien la obtención de explantes con regiones transformadas fue baja, esta puede aumentar considerando que en el presente trabajo, por cuestiones de tiempo y disponibilidad de material no se evaluaron diferentes tratamientos en cuanto a los tiempos de exposición a vacío y sonicación. Tampoco se realizaron ensayos previos para determinar las dosis adecuadas de acetosiringona que maximizarían la capacidad de infección de las cepas de *Agrobacterium*, además de probar diferentes densidades de las mismas. Por lo que realizar experimentos de transformación con este tipo de explantes resulta un objetivo de estudio factible, considerando además que la transformación genética con este tipo de explantes en aguacate no ha sido reportada con anterioridad.

VII. Literatura Citada

- Acosta-Rangel, A., Li, R., Mauk, P., Santiago, L., & Lovatt, C. J. (2021). Effects of temperature, soil moisture and light intensity on the temporal pattern of floral gene expression and flowering of avocado buds (*Persea americana* cv. Hass). *Scientia Horticulturae*, 280, Article 109940. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2021.109940>
- Acosta-Rangel, A. M., Li, R., Celis, N., Suarez, D. L., Santiago, L. S., Arpaia, M. L., & Mauk, P. A. (2019). The physiological response of ‘Hass’ avocado to salinity as influenced by rootstock. *Scientia Horticulturae*, 256, Article 108629. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2019.108629>
- Ahmed, M. F., Kantharajah, A. S., & Holford, P. (2001). Factors affecting adventitious shoot and root formation from the avocado cultivar “Hass” (*Persea americana*, Mill.) *in vitro*. *Gartenbauwissenschaft*, 66(6), 293–297.
- Ahmed, M. F., Kantharajah, A. S., & Holford, P. (2012). Genetic transformation studies on avocado cultivar “Hass” (*Persea americana*). *American Journal of Plant Sciences*, 3(09), 1225–1231. <https://doi.org/10.4236/ajps.2012.39148>

- Albert, V. A., Soltis, D. E., Carlson, J. E., Farmerie, W. G., Wall, P. K., Ilut, D. C., Solow, T. M., Mueller, L. A., Landherr, L. L., Hu, Y., Buzgo, M., Kim, S., Yoo, M. J., Frohlich, M. W., Perl-Treves, R., Schlarbaum, S. E., Bliss, B. J., Zhang, X., Tanksley, S. D., ... Leebens-Mack, J. H. (2005). Floral gene resources from basal angiosperms for comparative genomics research. *BMC Plant Biology*, 5. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-5-5>
- Altendorf. (2019). *Major tropical fruits*. Statistical Compendium FAO, 01, 18.
- Álvarez Bravo, A., Salazar García, S., Ruiz Corral, J. A., & Medina García, G. (2017). Escenarios de cómo el cambio climático modificará las zonas productoras de aguacate 'Hass' en Michoacán. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 19, 4035–4048. <https://doi.org/10.29312/remexca.v0i19.671>
- Araújo, R. G., Rodriguez-Jasso, R. M., Ruiz, H. A., Pintado, M. M. E., & Aguilar, C. N. (2018). Avocado by-products: Nutritional and functional properties. *Trends in Food Science and Technology*, 80, 51–60. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.07.027>
- Barceló-Muñoz, A., Encina, C. L., Simón-Pérez, E., & Pliego-Alfaro, F. (1999). Micropropagation of adult avocado. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 58(1), 11–17. <https://doi.org/10.1023/A:1006305716426>
- Bergh, B. (1992). The origin, nature, and genetic improvement of the avocado. *California Avocado Society Yearbook*, 76, 61–75.
- Blumenfeld, A., & Shmuel, G. (2022). Development of seeded and seedless avocado fruits. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 99(5), 442–448. <https://doi.org/10.21273/jashs.99.5.442>
- Chabikwa, T. G., Barbier, F. F., Tanurdzic, M., & Beveridge, C. A. (2020). *De novo* transcriptome assembly and annotation for gene discovery in avocado, macadamia and mango. *Scientific Data*, 7(1), 1–7. <https://doi.org/10.1038/s41597-019-0350-9>
- Chanderbali, A. S., Albert, V. A., Leebens-Mack, J., Altman, N. S., Soltis, D. E., & Soltis, P. S. (2009). Transcriptional signatures of ancient floral developmental genetics in avocado (*Persea americana*; Lauraceae). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(22), 8929–8934. <https://doi.org/10.1073/pnas.0811476106>
- Chaparro-Pulido, C. A., Montiel, M. M., Palomo-Ríos, E., Mercado, J. A., & Pliego-Alfaro, F. (2014). Development of an efficient transient transformation protocol for avocado (*Persea americana* Mill.) embryogenic callus. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, 50(2), 292–298. <https://doi.org/10.1007/s11627-013-9564-2>
- Christenhusz, M. J. M., & Byng, J. W. (2016). The number of known plants species in the world and its annual increase. *Phytotaxa*, 261(3), 201–217. <https://doi.org/10.11646/phytotaxa.261.3.1>
- Cooper, P. (1987). Advances in micropropagation of avocado. *Acta Horticulturae*, 212, 571–576).

- Cortés-Rodríguez, M. A., López-Gómez, R., Martínez-Pacheco, M. M., Suárez-Rodríguez, L. M., Hernández-García, A., Salgado-Garciglia, R., Fernández, I. V., & Palomares, M. E. A. (2011). *In vitro* propagation of mexican race avocado (*Persea americana* Mill. var. *drymifolia*). *Acta Horticulturae*, 923, 47–52.
<https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2011.923.5>
- Cruz-Hernández, A., Litz, W. R. E., & Lim, M. G. (1998). *Agrobacterium tumefaciens* - mediated transformation of embryogenic avocado cultures and regeneration of somatic embryos. *Plant Cell Reports*, 17(6–7), 497–503.
<https://doi.org/10.1007/s002990050431>
- Cruz-López, D. F., Caamal-Cauich, I., Pat-Fernández, V. G., & Reza Salgado, J. (2022). Competitividad de las exportaciones de aguacate Hass de México en el mercado mundial. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 13(2), 355–362.
<https://doi.org/10.29312/remexca.v13i2.2885>
- Dalsaso, Ligia & Guevara, E. (1985). Multiplicación clonal *in vitro* del aguacate (*Persea americana*) variedad Fuerte. *Agronomía Costarricense*, 13(1), 61–71.
- Davenport, T. L. (1986). Avocado flowering. *Horticultural Reviews*, 8, 257–289.
<https://doi.org/10.1002/9781118060810.ch7>
- De la Vega-Rivera, A., & Merino-Pérez, L. (2021). Socio-environmental impacts of the avocado boom in the Meseta Purépecha, Michoacán, Mexico. *Sustainability*, 13(13). <https://doi.org/10.3390/su13137247>
- De la Viña, G., Barceló-Muñoz, A., & Pliego-Alfaro, F. (2000). Effect of culture media and irradiance level on growth and morphology of *Persea americana* Mill. microcutting. *Annals of Operations Research*, 97(1–4), 131–141.
<https://doi.org/10.1023/A>
- Degani, C., Goldring, A., & Gazit, S. (1989). Pollen parent effect on outcrossing rate in ‘Hass’ and ‘Fuerte’ avocado plots during fruit development. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 114(1), 106–111.
<https://doi.org/10.21273/jashs.114.1.106>
- Dymond, K., Celis-Diez, J. L., Potts, S. G., Howlett, B. G., Willcox, B. K., & Garratt, M. P. D. (2021). The role of insect pollinators in avocado production: A global review. *Journal of Applied Entomology*, 145(5), 369–383. <https://doi.org/10.1111/jen.12869>
- Fehér, A. (2019). Callus, dedifferentiation, totipotency, somatic embryogenesis: What these terms mean in the era of molecular plant biology? *Frontiers in Plant Science*, 10. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00536>
- Frolich, E. F., & Platt, R. G. (1971). Use of the etiolation technique in rooting avocado cuttings. *California Avocado Society Yearbook*, 9, 97–109.
- Galindo-Tovar, M. E., Ogata-Aguilar, N., & Arzate-Fernández, A. M. (2008). Some aspects of avocado (*Persea americana* Mill.) diversity and domestication in Mesoamerica. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 55(3), 441–450.
<https://doi.org/10.1007/s10722-007-9250-5>

- Gálvez Tuesta, O., & Chico-Ruiz, J. (2016). Callos embriogénicos inducidos en tallos de *Persea americana* Mill. "Palto" con diferentes concentraciones de reguladores del crecimiento. *Sagasteguiana*, 4(2), 39–50.
- Gullino, M., Albajes, R., Al-Jboory, I., Angelotti, F., Chakraborti, S., Garret, K., Hurley, B. P., Juroszek, P., Makkouk, K., Pan, X., & Stephenson, T. (2021). Scientific review of the impact of climate change on plant pests. In *Scientific review of the impact of climate change on plant pests*. FAO. <https://doi.org/10.4060/cb4769en>
- Gutiérrez-Contreras, M., Blanca Nieves Lara-Chávez Doctora en Ciencias Agrícolas, M., Profesora, M., Héctor Guillén-Andrade Doctor, M., Tztzqui Chávez-Bárcenas, A., GUTIÉRREZ-CONTRERAS, M., BLANCA NIEVES LARA-CHÁVEZ, M., & GUILLÉN-ANDRADE ANA CHÁVEZ-BÁRCENAS, H. T. (2010). Agroecología de la franja aguacatera en Michoacán, México. *Interciencia*, 35(9).
- Hernández, I., Fuentealba, C., Olaeta, J. A., Lurie, S., Defilippi, B. G., Campos-Vargas, R., & Pedreschi, R. (2016). Factors associated with postharvest ripening heterogeneity of "Hass" avocados (*Persea americana* Mill). *Fruits*, 71(5), 259–268. <https://doi.org/10.1051/fruits/2016016>
- Hiti-bandaralage, J. C. A., & Hayward, A. (2017). *Micropropagation of Avocado (Persea americana Mill .)*. 2898–2921. <https://doi.org/10.4236/ajps.2017.811197>
- Hong, S., Lim, Y. P., Kwon, S. Y., Shin, A. Y., & Kim, Y. M. (2021). Genome-Wide Comparative Analysis of Flowering-Time Genes; Insights on the Gene Family Expansion and Evolutionary Perspective. *Frontiers in Plant Science*, 12(July), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.702243>
- Ibarra-Laclette, E., Méndez-Bravo, A., Pérez-Torres, C. A., Albert, V. A., Mockaitis, K., Kilaru, A., López-Gómez, R., Cervantes-Luevano, J. I., & Herrera-Estrella, L. (2015). Deep sequencing of the Mexican avocado transcriptome, an ancient angiosperm with a high content of fatty acids. *BMC Genomics*, 16(1), 1–18. <https://doi.org/10.1186/s12864-015-1775-y>
- Ibarra-López, A., Ojeda-Zacarías, Ma. del C., García-Zambrano, E. A., & Gutiérrez-Diez, A. (2017). Inducción in vitro de brotes de dos cultivares de aguacate raza Mexicana *Persea americana* var. *drymifolia* Schldl. & Cham. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 7(2), 337–347. <https://doi.org/10.29312/remexca.v7i2.348>
- James, D. J. (1987). Cell and tissue culture technology for the genetic manipulation of temperate fruit trees. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, 5(1), 33–79. <https://doi.org/10.1080/02648725.1987.10647834>
- Knight, R. J. (1999, October). Genetic Diversity in Avocado. *Plant Breeding and Genetics*, 16–18.
- Limera, C., Sabbadini, S., Sweet, J. B., & Mezzetti, B. (2017). New biotechnological tools for the genetic improvement of major woody fruit species. *Frontiers in Plant Science*, 8(August), 1–16. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01418>

- Litz, R. E., Raharjo, S. H. T., & Gómez-Lim, M. A. (2007). Plant recovery following transformation of avocado with anti-fungal protein and sam hydrolase genes. *Acta Horticulturae*, 738, 447–450. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2007.738.55>
- Lobo Arias, M. (1977). *Dicogamia en flores de aguacate* (pp. 37–44). Instituto Colombiano Agropecuario.
- Ma, Q. H., & Liu, Y. C. (2009). Expression of isopentenyl transferase gene (ipt) in leaf and stem delayed leaf senescence without affecting root growth. *Plant Cell Reports*, 28(11), 1759–1765. <https://doi.org/10.1007/s00299-009-0776-1>
- Márquez-Martín, B., Barceló-Muñoz, A., Pliego-Alfaro, F., & Sánchez-Romero, C. (2012). Somatic embryogenesis and plant regeneration in avocado (*Persea americana* Mill.): Influence of embryogenic culture type. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*, 21(2), 180–188. <https://doi.org/10.1007/s13562-011-0091-0>
- Marutani-Hert, M., Bowman, K. D., McCollum, G. T., Mirkov, T. E., Evens, T. J., & Niedz, R. P. (2012). A Dark Incubation Period Is Important for Agrobacterium-Mediated Transformation of Mature Internode Explants of Sweet Orange, Grapefruit, Citron, and a Citrange Rootstock. *PLoS ONE*, 7(10), 1–11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0047426>
- Matsuo, N., & Banno, H. (2008). The Arabidopsis transcription factor ESR1 induces in vitro shoot regeneration through transcriptional activation. *Plant Physiology and Biochemistry*, 46(12), 1045–1050. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2008.07.007>
- Mohamed-Yasseen, Y. (1993). Morphogenesis of Avocado in Vitro. A Review. *California Avocado Society*, 77, 101–105.
- Molinier, J., Thomas, C., Brignou, M., & Hahne, G. (2002). Transient expression of ipt gene enhances regeneration and transformation rates of sunflower shoot apices (*Helianthus annuus* L.). *Plant Cell Reports*, 21(3), 251–256. <https://doi.org/10.1007/s00299-002-0504-6>
- Nhut, D. T., Thi, N. N., Khiet, B. L. T., & Luan, V. Q. (2008). Peptone stimulates in vitro shoot and root regeneration of avocado (*Persea americana* Mill.). *Scientia Horticulturae*, 115(2), 124–128. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2007.08.011>
- Niedz, R. P., & Bausher, M. G. (2002). Control of in vitro contamination of explants from greenhouse- and field-grown trees. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, 38(5), 468–471. <https://doi.org/10.1079/IVP2002316>
- Oláh, R. (2017). The use of activated charcoal in grapevine tissue culture. *Vitis - Journal of Grapevine Research*, 56(4), 161–171. <https://doi.org/10.5073/vitis.2017.56.161-171>
- Osorio, C. R., Velásquez, F. A. G., Correal, A. G., Bonilla, J. M. T., & Trujillo, A. I. U. (2018). In vitro propagation of avocado (*Persea americana* Mill. cv. Hass) through morphogenesis. *Acta Agronomica*, 67(1), 1–24. <https://doi.org/10.15446/acag.v67n1.61474>

- Oster, J. D., Stottlmyer, D. E., & Arpaia, M. L. (2007). Salinity and water effects on “Hass” avocado yields. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 132(2), 253–261. <https://doi.org/10.21273/jashs.132.2.253>
- Palomo-Ríos, E., Barceló-Muñoz, A., Mercado, J. A., & Pliego-Alfaro, F. (2012). Evaluation of key factors influencing Agrobacterium-mediated transformation of somatic embryos of avocado (*Persea americana* Mill.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 109(2), 201–211. <https://doi.org/10.1007/s11240-011-0086-5>
- Palomo-Ríos, E., Cerezo, S., Mercado, J. A., & Pliego-Alfaro, F. (2017). Agrobacterium-mediated transformation of avocado (*Persea americana* Mill.) somatic embryos with fluorescent marker genes and optimization of transgenic plant recovery. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 128(2), 447–455. <https://doi.org/10.1007/s11240-016-1122-2>
- Peterson, P. A. (1955). *Dual Cycle of Avocado Flowers Study of the continuous dual opening cycle of the avocado flower shows need of large flying insects for pollination*. 9(10), 6–7.
- Petri, C., & Burgos, L. (2005). Transformation of fruit trees. Useful breeding tool or continued future prospect? *Transgenic Research*, 14(1), 15–26. <https://doi.org/10.1007/s11248-004-2770-2>
- Pliego-Alfaro, F., & Litz, R. E. (2007). Biotechnology and avocado improvement. *California Avocado Society Yearbook*, 90, 149-167.
- Pliego-Alfaro, F., & Murashige, T. (1988). Somatic embryogenesis in avocado (*Persea americana* Mill.) in vitro. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 12(1), 61–66. <https://doi.org/10.1007/BF00043108>
- Pliego-Alfaro, F., Palomo-Ríos, E., Mercado, J. A., Pliego, C., Barceló-Muñoz, A., López-Gómez, R., Hormaza, J. I., & Litz, R. E. (2020). *Persea americana* avocado. In R. E. Litz, F. Pliego-Alfaro, & J. I. Hormaza (Eds.). *Biotechnology of fruit and nut crops* (2nd ed., pp. 258–281). CABI.
- Prabhu, S. A., Ndlovu, B., Engelbrecht, J., & Van Den Berg, N. (2017). Generation of composite *Persea americana* (Mill.) (avocado) plants: A proof-of-concept-study. *PLoS ONE*, 12(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0185896>
- Quintero-Jiménez, A., Heredia-García, E., Aguirre-Mancilla, C. L., Raya-Pérez, J. C., Ramírez-Pimentel, J. G., & Iturriaga, G. (2020). Embriogénesis y organogénesis de aguacate criollo mexicano. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 11(7), 1525–1536. <https://doi.org/10.29312/remexca.v11i7.2274>
- Raharjo, S. H. T., & Litz, R. E. (2005). Micrografting and *ex vitro* grafting for somatic embryo rescue and plant recovery in avocado (*Persea americana*). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 82(1), 1–9. <https://doi.org/10.1007/s11240-004-5486-3>
- Raharjo, S. H. T., Witjaksono, N. F. N., Gomez-Lim, M. A., Padilla, G., & Litz, R. E. (2008). Recovery of avocado (*Persea americana* Mill.) plants transformed with the antifungal plant defensin gene PDF1.2. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, 44(4), 254–262. <https://doi.org/10.1007/s11627-008-9117-2>

- Raharjo, S., Witjaksono, E. D., Gomez-Lim, M., Suarez, I., & Litz, R. (2003). Genetic transformation of avocado. *Acta Horticulturae*, 692, 115-118.
- Rendón-Anaya, M., Ibarra-Laclette, E., Méndez-Bravo, A., Lan, T., Zheng, C., Carretero-Paulet, L., Perez-Torres, C. A., Chacón-López, A., Hernandez-Guzmán, G., Chang, T. H., Farr, K. M., Brad Barbazuk, W., Chamala, S., Mutwil, M., Shivhare, D., Alvarez-Ponce, D., Mitter, N., Hayward, A., Fletcher, S., ... Herrera-Estrella, L. (2019). The avocado genome informs deep angiosperm phylogeny, highlights introgressive hybridization, and reveals pathogen-influenced gene space adaptation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 116(34), 17081–17089. <https://doi.org/10.1073/pnas.1822129116>
- Rodríguez, N., Capote, M., & Zamora, V. (1999). Cultivo *in vitro* del aguacatero (*Persea americana* Mill.). *Revista Chapingo Serie Horticultura*, 5, 231–237.
- Rohwer, J. G. (1993). Lauraceae. *Flowering Plants · Dicotyledons*, 89(1789), 366–391. https://doi.org/10.1007/978-3-662-02899-5_46
- Salazar-García, S., & C. J. Lovatt. (2002). Flowering of avocado (*Persea americana* Mill.). I. Inflorescence and flower development. *Revista Chapingo Serie Horticultura*, 8(1), 71–75..
- Salazar-Gonzalez, J. A., Castro-Medina, M., Bernardino-Rivera, L. E., Martínez-Terrazas, E., Casson, S. A., & Urrea-López, R. (2023). In - planta transient transformation of avocado (*Persea americana*) by vacuum agroinfiltration of aerial plant parts. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 152, 635–646. <https://doi.org/10.1007/s11240-022-02436-9>
- Salazar-González, J., Martínez-Terrazas, E., Casson, S. A., & Urrea-lopez, R. (2022). Leaf wounding and jasmonic acid act synergistically to enable efficient *Agrobacterium*-mediated transient transformation of *Persea americana*. *Research Square*. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-1631178/v1>
- Sánchez-González, E. I., Gutiérrez-Díez, A., & Mayek-Pérez, N. (2020). Outcrossing rate and genetic variability in Mexican race avocado. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 145(1), 53–59. <https://doi.org/10.21273/JASHS04785-19>
- Scora, R. W., & Bergh, B. (1990). the origins and taxonomy of avocado (*Persea americana* Mill., Lauraceae). *Acta Horticulturae*, 275, 387–394. <https://doi.org/10.17660/actahortic.1990.275.47>
- Seijo, M. F., Patricia, A., Fiquitiva, B., Kosky, R. G., Ramírez, Y. G., & Autor, C. (2004). Formación de callos de *Persea americana* Mill. cultivar Catalina a partir de segmentos de hojas de plantas *in vitro*. *Bioteconología Vegetal*, 4(2), 85–90.
- Sharma, R., Liang, Y., Lee, M. Y., Pidatala, V. R., Mortimer, J. C., & Scheller, H. V. (2020). *Agrobacterium*-mediated transient transformation of sorghum leaves for accelerating functional genomics and genome editing studies. *BMC Research Notes*, 13(1), 1–7. <https://doi.org/10.1186/s13104-020-04968-9>

- Skalák, J., Cerný, M., Jedelský, P., Dobrá, J., Ge, E., Novák, J., Hronková, M., Dobrev, P., Vanková, R., & Brzobohatý, B. (2016). Stimulation of ipt overexpression as a tool to elucidate the role of cytokinins in high temperature responses of *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany*, *67*(9), 2861–2873.
<https://doi.org/10.1093/jxb/erw129>
- Smith, C. E. (1966). Archeological evidence for selection in avocado. *Economic Botany*, *20*(2), 169–175. <https://doi.org/10.1007/BF02904012>
- Song, G. Q., Prieto, H., & Orbovic, V. (2019). *Agrobacterium*-mediated transformation of tree fruit crops: Methods, progress, and challenges. *Frontiers in Plant Science*, *10*, Article 226. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00226>
- Stamp, J. A., & Meredith, C. P. (1988). Proliferative somatic embryogenesis from zygotic embryos of grapevine. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, *113*(6), 941–945. <https://doi.org/10.21273/jashs.113.6.941>
- Storey, W. B., Bergh, B., & Zentmyer, G. A. (1986). The origin, indigenous range, and dissemination of the avocado. *California Avocado Society Yearbook*, *70*, 127–133.
- Suarez, I. E., Schnell, R. A., Kuhn, D. N., & Litz, R. E. (2006). Recovery and indexing of avocado plants (*Persea americana*) from embryogenic nucellar cultures of an avocado sunblotch viroid-infected tree. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, *84*(1), 27–37. <https://doi.org/10.1007/s11240-005-7532-1>
- Sugiyama, M. (2002). Organogenesis *in vitro*. *Tanpakushitsu Kakusan Koso. Protein, Nucleic Acid, Enzyme*, *47*(12), 1587–1592.
- Tamayo-Ramos, D. I., Salazar-González, J. A., Casson, S. A., & Urrea-López, R. (2022). Old and new horizons on *Persea americana* transformation techniques and applications. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, *150*(2), 253-266.
<https://doi.org/10.1007/s11240-022-02268-7>
- Tyurin, A. A., Suhorukova, A. V., Kabardaeva, K. V., & Goldenkova-Pavlova, I. V. (2020). Transient gene expression is an effective experimental tool for the research into the fine mechanisms of plant gene function: Advantages, limitations, and solutions. *Plants*, *9*(9), 1–19. <https://doi.org/10.3390/plants9091187>
- Vaghchhipawala, Z., Rojas, C., Senthil-Kumar, M., & Myrose, K. (2011). Agroinoculation and agroinfiltration: Simple tools for complex gene function analyses. *Methods in Molecular Biology*, *678*(1), 211–227.
<https://doi.org/10.1007/978-1-60761-682-5>
- Vancanneyt, G., Schmidt, R., O'Connor-Sanchez, A., Willmitzer, L., & Rocha-Sosa, M. (1990). Construction of an intron-containing marker gene: Splicing of the intron in transgenic plants and its use in monitoring early events in *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *MGG Molecular & General Genetics*, *220*(2), 245–250.
<https://doi.org/10.1007/BF00260489>
- Vergara-Pulgar, C., Rothkegel, K., González-Agüero, M., Pedreschi, R., Campos-Vargas, R., Defilippi, B. G., & Meneses, C. (2019). *De novo* assembly of *Persea*

- americana* cv. “Hass” transcriptome during fruit development. *BMC Genomics*, 20(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/s12864-019-5486-7>
- Witjaksono. (1997). *Development of protocols for Avocado tissue culture: somatic embryogenesis, protoplast culture, shoot proliferation and protoplast fusion* (Doctoral dissertation, University of Florida).
- Witjaksono, & Litz, R. E. (1999). Induction and growth characteristics of embryogenic avocado cultures. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 58(1), 19–29. <https://doi.org/10.1023/A:1006370912755>
- Witjaksono, Litz, R. E., & Pliego-Alfaro, F. (1999). Somatic embryogenesis of avocado (*Persea americana* Mill.). In S. M. Jain, P. K. Gupta, & R. J. Newton (Eds.), *Somatic embryogenesis in woody plants* (Vol. 5, pp. 197-214). Springer. https://doi.org/10.1007/978-94-011-4774-3_13
- Witney, G. W., Arpaia, M. L., Clegg, M. T., & Douhan, G. W. (2005). *Avocado germplasm preservation and breeding program in California*. New Zealand and Australia Avocado Grower’s Conference, September, 8.
- Young, M. J. (1983). Avocado callus and bud culture. *Proceedings of the Florida State Horticulture Society*, 96(1), 181–182.
- Zafar, T., & Sidhu, J. S. (2011). Avocado: Production, quality, and major processed products. *Handbook of Vegetables and Vegetable Processing, 1871*, 525–543. <https://doi.org/10.1002/9780470958346.ch26>
- Acosta-Rangel, A., Li, R., Mauk, P., Santiago, L., & Lovatt, C. J. (2021). Effects of temperature, soil moisture and light intensity on the temporal pattern of floral gene expression and flowering of avocado buds (*Persea americana* cv. Hass). *Scientia Horticulturae*, 280, 109940. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2021.109940>
- Acosta-Rangel, A. M., Li, R., Celis, N., Suarez, D. L., Santiago, L. S., Arpaia, M. L., & Mauk, P. A. (2019). The physiological response of ‘Hass’ avocado to salinity as influenced by rootstock. *Scientia Horticulturae*, 256. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2019.108629>
- Ahmed, M. F., Kantharajah, A. S., & Holford, P. (2001). Factors affecting adventitious shoot and root formation from the avocado cultivar “Hass” (*Persea americana*, Mill.) in vitro. *Gartenbauwissenschaft*, 66(6), 293–297.
- Ahmed, M. F., Kantharajah, A. S., & Holford, P. (2012). Genetic transformation studies on avocado cultivar “Hass” (*Persea americana*). *American Journal of Plant Sciences*, 3(09), 1225–1231. <https://doi.org/10.4236/ajps.2012.39148>
- Albert, V. A., Soltis, D. E., Carlson, J. E., Farmerie, W. G., Wall, P. K., Ilut, D. C., Solow, T. M., Mueller, L. A., Landherr, L. L., Hu, Y., Buzgo, M., Kim, S., Yoo, M. J., Frohlich, M. W., Perl-Treves, R., Schlarbaum, S. E., Bliss, B. J., Zhang, X., Tanksley, S. D., ... Leebens-Mack, J. H. (2005). Floral gene resources from basal angiosperms for comparative genomics research. *BMC Plant Biology*, 5. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-5-5>
- Altendorf. (2019). Major tropical fruits. *Statistical Compendium, FAO*, 01, 18.

- Álvarez Bravo, A., Salazar García, S., Ruiz Corral, J. A., & Medina García, G. (2017). Escenarios de cómo el cambio climático modificará las zonas productoras de aguacate 'Hass' en Michoacán. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 19, 4035–4048. <https://doi.org/10.29312/remexca.v0i19.671>
- Araújo, R. G., Rodríguez-Jasso, R. M., Ruiz, H. A., Pintado, M. M. E., & Aguilar, C. N. (2018). Avocado by-products: Nutritional and functional properties. *Trends in Food Science and Technology*, 80, 51–60. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.07.027>
- Barceló-Muñoz, A., Encina, C. L., Simón-Pérez, E., & Pliego-Alfaro, F. (1999). Micropropagation of adult avocado. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 58(1), 11–17. <https://doi.org/10.1023/A:1006305716426>
- Bergh, B. (1992). The origin, nature, and genetic improvement of the avocado. *California Avocado Society*, 76, 61–75.
- Blumenfeld, A., & Shmuel, G. (2022). Development of seeded and seedless avocado fruits. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 99(5), 442–448. <https://doi.org/10.21273/jashs.99.5.442>
- Chabikwa, T. G., Barbier, F. F., Tanurdzic, M., & Beveridge, C. A. (2020). De novo transcriptome assembly and annotation for gene discovery in avocado, macadamia and mango. *Scientific Data*, 7(1), 1–7. <https://doi.org/10.1038/s41597-019-0350-9>
- Chanderbali, A. S., Albert, V. A., Leebens-Mack, J., Altman, N. S., Soltis, D. E., & Soltis, P. S. (2009). Transcriptional signatures of ancient floral developmental genetics in avocado (*Persea americana*; Lauraceae). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(22), 8929–8934. <https://doi.org/10.1073/pnas.0811476106>
- Chaparro-Pulido, C. A., Montiel, M. M., Palomo-Ríos, E., Mercado, J. A., & Pliego-Alfaro, F. (2014). Development of an efficient transient transformation protocol for avocado (*Persea americana* Mill.) embryogenic callus. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, 50(2), 292–298. <https://doi.org/10.1007/s11627-013-9564-2>
- Christenhusz, M. J. M., & Byng, J. W. (2016). The number of known plants species in the world and its annual increase. *Phytotaxa*, 261(3), 201–217. <https://doi.org/10.11646/phytotaxa.261.3.1>
- Cooper, P. (1987). Advances in micropropagation of avocado. *Acta Horticulturae*, 212, 571–576.
- Cortés-Rodríguez, M. A., López-Gómez, R., Martínez-Pacheco, M. M., Suárez-Rodríguez, L. M., Hernández-García, A., Salgado-Garciglia, R., Fernández, I. V., & Palomares, M. E. A. (2011). In vitro propagation of mexican race avocado (*Persea americana* Mill. var. *drymifolia*). *Acta Horticulturae*, 923, 47–52. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2011.923.5>
- Cruz-Hernández, A., Litz, W. R. E., & Lim, M. G. (1998). *Agrobacterium tumefaciens* - Mediated transformation of embryogenic avocado cultures and regeneration of

- somatic embryos. *Plant Cell Reports*, 17(6–7), 497–503.
<https://doi.org/10.1007/s002990050431>
- Cruz-López, D. F., Caamal-Cauich, I., Pat-Fernández, V. G., & Reza Salgado, J. (2022). Competitividad de las exportaciones de aguacate Hass de México en el mercado mundial. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 13(2), 355–362.
<https://doi.org/10.29312/remexca.v13i2.2885>
- Dalsaso, Ligia & Guevara, E. (1985). Multiplicación clonal in vitro del aguacate (*Persea americana*) variedad Fuerte. *Agronomía Costarricense*, 13(1), 61–71.
- Davenport, T. L. (1986). Avocado Flowering. *Horticultural Reviews*, 8, 257–289.
<https://doi.org/10.1002/9781118060810.ch7>
- De la Vega-Rivera, A., & Merino-Pérez, L. (2021). Socio-environmental impacts of the avocado boom in the Meseta Purépecha, Michoacán, Mexico. *Sustainability*, 13(13). <https://doi.org/10.3390/su13137247>
- De la Viña, G., Barceló-Muñoz, A., & Pliego-Alfaro, F. (2000). Effect of culture media and irradiance level on growth and morphology of *Persea americana* Mill microcutting. *Annals of Operations Research*, 97(1–4), 131–141.
<https://doi.org/10.1023/A>
- Degani, C., Goldring, A., & Gazit, S. (1989). Pollen parent effect on outcrossing rate in ‘Hass’ and ‘Fuerte’ avocado plots during fruit development. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 114(1), 106–111.
<https://doi.org/10.21273/jashs.114.1.106>
- Dymond, K., Celis-Diez, J. L., Potts, S. G., Howlett, B. G., Willcox, B. K., & Garratt, M. P. D. (2021). The role of insect pollinators in avocado production: A global review. *Journal of Applied Entomology*, 145(5), 369–383. <https://doi.org/10.1111/jen.12869>
- Fehér, A. (2019). Callus, dedifferentiation, totipotency, somatic embryogenesis: What these terms mean in the era of molecular plant biology? *Frontiers in Plant Science*, 10. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00536>
- Frolich, E. F., & Platt, R. G. (1971). Use of the etiolation technique in rooting avocado Cuttings. *California Avocado Society Yearbook*, 9, 97–109.
- Galindo-Tovar, M. E., Ogata-Aguilar, N., & Arzate-Fernández, A. M. (2008). Some aspects of avocado (*Persea americana* Mill.) diversity and domestication in Mesoamerica. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 55(3), 441–450.
<https://doi.org/10.1007/s10722-007-9250-5>
- Gálvez Tuesta, O., & Chico-Ruiz, J. (2016). Callos embriogénicos inducidos en tallos de *Persea americana* Mill. “Palto” con diferentes concentraciones de reguladores del crecimiento. *Sagasteguiana*, 4(2), 39–50.
- Gullino, M., Albajes, R., Al-Jboory, I., Angelotti, F., Chakraborti, S., Garret, K., Hurley, B. P., Juroszek, P., Makkouk, K., Pan, X., & Stephenson, T. (2021). Scientific review of the impact of climate change on plant pests. *Scientific review of the impact of climate change on plant pests*. FAO. <https://doi.org/10.4060/cb4769en>

- Gutiérrez-Contreras, M., Lara-Chávez, B. N., Guillén-Andrade, H., & Chávez-Bárceñas, A.T. (2010). Agroecología de la franja aguacatera en Michoacán, México. *Interciencia*, 35(9), 47-653.
- Hernández, I., Fuentealba, C., Olaeta, J. A., Lurie, S., Defilippi, B. G., Campos-Vargas, R., & Pedreschi, R. (2016). Factors associated with postharvest ripening heterogeneity of 'Hass' avocados (*Persea americana* Mill.). *Fruits*, 71(5), 259–268. <https://doi.org/10.1051/fruits/2016016>
- Hiti-Bandaralage, J. C., Hayward, A., & Mitter, N. (2017). Micropropagation of avocado (*Persea americana* Mill.). *American Journal of Plant Sciences*, 8(11), 2898. <https://doi.org/10.4236/ajps.2017.811197>
- Hong, S., Lim, Y. P., Kwon, S. Y., Shin, A. Y., & Kim, Y. M. (2021). Genome-wide comparative analysis of flowering-time genes; insights on the gene family expansion and evolutionary perspective. *Frontiers in Plant Science*, 12, 1–13. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.702243>
- Ibarra-Laclette, E., Méndez-Bravo, A., Pérez-Torres, C. A., Albert, V. A., Mockaitis, K., Kilaru, A., López-Gómez, R., Cervantes-Luevano, J. I., & Herrera-Estrella, L. (2015). Deep sequencing of the Mexican avocado transcriptome, an ancient angiosperm with a high content of fatty acids. *BMC Genomics*, 16(1), 1–18. <https://doi.org/10.1186/s12864-015-1775-y>
- Ibarra-López, A., Ojeda-Zacarías, Ma. del C., García-Zambrano, E. A., & Gutiérrez-Díez, A. (2017). Inducción in vitro de brotes de dos cultivares de aguacate raza Mexicana *Persea americana* var. *drymifolia* Schltdl. & Cham. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 7(2), 337–347. <https://doi.org/10.29312/remexca.v7i2.348>
- James, D. J. (1987). Cell and tissue culture technology for the genetic manipulation of temperate fruit trees. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, 5(1), 33–79. <https://doi.org/10.1080/02648725.1987.10647834>
- Jefferson, R.A. Kavanagh, T. A., & Bevan, M. W. (1987). GUS fusions: beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *The EMBO Journal*, 6(13), 3901-3907. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1987.tb02730.x>
- Knight Jr, R. J. (1999). Genetic diversity in avocado In M. L. Arpaia & R. Hofshi (Eds.), *Avocado Brainstorming. Session I. Plant Breeding and Genetics* (pp. 16–18). University California Riverside.
- Limera, C., Sabbadini, S., Sweet, J. B., & Mezzetti, B. (2017). New biotechnological tools for the genetic improvement of major woody fruit species. *Frontiers in Plant Science*, 8, 1–16. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01418>
- Litz, R. E., Raharjo, S. H. T., & Gómez-Lim, M. A. (2007). Plant recovery following transformation of avocado with anti-fungal protein and sam hydrolase genes. *Acta Horticulturae*, 738, 447–450. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2007.738.55>
- Lobo Arias, M. (1977). Dicogamia en flores de aguacate (pp. 37–44). Instituto Colombiano Agropecuario.

- Ma, Q. H., & Liu, Y. C. (2009). Expression of isopentenyl transferase gene (*ipt*) in leaf and stem delayed leaf senescence without affecting root growth. *Plant Cell Reports*, 28(11), 1759–1765. <https://doi.org/10.1007/s00299-009-0776-1>
- Márquez-Martín, B., Barceló-Muñoz, A., Pliego-Alfaro, F., & Sánchez-Romero, C. (2012). Somatic embryogenesis and plant regeneration in avocado (*Persea americana* Mill.): Influence of embryogenic culture type. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*, 21(2), 180–188. <https://doi.org/10.1007/s13562-011-0091-0>
- Marutani-Hert, M., Bowman, K. D., McCollum, G. T., Mirkov, T. E., Evens, T. J., & Niedz, R. P. (2012). A dark incubation period is important for *Agrobacterium*-mediated transformation of mature internode explants of sweet orange, grapefruit, citron, and a citrange rootstock. *PLoS ONE*, 7(10), 1–11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0047426>
- Matsuo, N., & Banno, H. (2008). The *Arabidopsis* transcription factor *ESR1* induces in vitro shoot regeneration through transcriptional activation. *Plant Physiology and Biochemistry*, 46(12), 1045–1050. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2008.07.007>
- Mohamed-Yasseen, Y. (1993). Morphogenesis of avocado in vitro. A Review. *California Avocado Society yearbook*, 77, 101–105.
- Molinier, J., Thomas, C., Brignou, M., & Hahne, G. (2002). Transient expression of *ipt* gene enhances regeneration and transformation rates of sunflower shoot apices (*Helianthus annuus* L.). *Plant Cell Reports*, 21(3), 251–256. <https://doi.org/10.1007/s00299-002-0504-6>
- Nhut, D. T., Thi, N. N., Khiet, B. L. T., & Luan, V. Q. (2008). Peptone stimulates in vitro shoot and root regeneration of avocado (*Persea americana* Mill.). *Scientia Horticulturae*, 115(2), 124–128. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2007.08.011>
- Niedz, R. P., & Bausher, M. G. (2002). Control of in vitro contamination of explants from greenhouse- and field-grown trees. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, 38(5), 468–471. <https://doi.org/10.1079/IVP2002316>
- Oláh, R. (2017). The use of activated charcoal in grapevine tissue culture. *Vitis - Journal of Grapevine Research*, 56(4), 161–171. <https://doi.org/10.5073/vitis.2017.56.161-171>
- Osorio, C. R., Velásquez, F. A. G., Correal, A. G., Bonilla, J. M. T., & Trujillo, A. I. U. (2018). In vitro propagation of avocado (*Persea americana* Mill. cv. Hass) through morphogenesis. *Acta Agronomica*, 67(1), 1–24. <https://doi.org/10.15446/acag.v67n1.61474>
- Oster, J. D., Stottlmyer, D. E., & Arpaia, M. L. (2007). Salinity and water effects on ‘Hass’ avocado yields. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 132(2), 253–261. <https://doi.org/10.21273/jashs.132.2.253>
- Palomo-Ríos, E., Barceló-Muñoz, A., Mercado, J. A., & Pliego-Alfaro, F. (2012). Evaluation of key factors influencing *Agrobacterium*-mediated transformation of

- somatic embryos of avocado (*Persea americana* Mill.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 109(2), 201–211. <https://doi.org/10.1007/s11240-011-0086-5>
- Palomo-Ríos, E., Cerezo, S., Mercado, J. A., & Pliego-Alfaro, F. (2017). Agrobacterium-mediated transformation of avocado (*Persea americana* Mill.) somatic embryos with fluorescent marker genes and optimization of transgenic plant recovery. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 128(2), 447–455. <https://doi.org/10.1007/s11240-016-1122-2>
- Peterson, P. A. (1955). Dual cycle of avocado flowers study of the continuous dual opening cycle of the avocado flower shows need of large flying insects for pollination. *California Agriculture*, 9(10), 6–7.
- Petri, C., & Burgos, L. (2005). Transformation of fruit trees. Useful breeding tool or continued future prospect? *Transgenic Research*, 14(1), 15–26. <https://doi.org/10.1007/s11248-004-2770-2>
- Pliego-Alfaro, F., & Litz, R. E. (2007). Biotechnology and avocado improvement. *California Avocado Society Yearbook*, 90, 149-167.
- Pliego-Alfaro, F., & Murashige, T. (1988). Somatic embryogenesis in avocado (*Persea americana* Mill.) in vitro. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 12(1), 61–66. <https://doi.org/10.1007/BF00043108>
- Pliego-Alfaro, F., Palomo-Ríos, E., Mercado, J. A., Pliego, C., Barceló-Muñoz, A., López-Gómez, R., Hormaza, J. I., & Litz, R. E. (2020). *Persea americana* avocado. In R. E. Litz, F. Pliego-Alfaro, & J. I. Hormaza (Eds.). *Biotechnology of fruit and nut crops* (2nd ed., pp. 258–281). CABI.
- Prabhu, S. A., Ndlovu, B., Engelbrecht, J., & Van Den Berg, N. (2017). Generation of composite *Persea americana* (Mill.) (avocado) plants: A proof-of-concept-study. *PLoS ONE*, 12(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0185896>
- Quintero-Jiménez, A., Heredia-García, E., Aguirre-Mancilla, C. L., Raya-Pérez, J. C., Ramírez-Pimentel, J. G., & Iturriaga, G. (2020). Embriogénesis y organogénesis de aguacate criollo mexicano. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 11(7), 1525–1536. <https://doi.org/10.29312/remexca.v11i7.2274>
- Raharjo, S. H. T., & Litz, R. E. (2005). Micrografting and ex vitro grafting for somatic embryo rescue and plant recovery in avocado (*Persea americana*). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 82(1), 1–9. <https://doi.org/10.1007/s11240-004-5486-3>
- Raharjo, S. H. T., Witjaksono, N. F. N., Gomez-Lim, M. A., Padilla, G., & Litz, R. E. (2008). Recovery of avocado (*Persea americana* Mill.) plants transformed with the antifungal plant defensin gene PDF1.2. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, 44(4), 254–262. <https://doi.org/10.1007/s11627-008-9117-2>
- Raharjo, S., Witjaksono, E. D., Gomez-Lim, M., Suarez, I., & Litz, R. (2003). Genetic transformation of avocado. *Acta Horticulturae*, 692, 115-118.
- Rendón-Anaya, M., Ibarra-Laclette, E., Méndez-Bravo, A., Lan, T., Zheng, C., Carretero-Paulet, L., Perez-Torres, C. A., Chacón-López, A., Hernandez-Guzmán, G., Chang, T. H., Farr, K. M., Brad Barbazuk, W., Chamala, S., Mutwil, M.,

- Shivhare, D., Alvarez-Ponce, D., Mitter, N., Hayward, A., Fletcher, S., ... Herrera-Estrella, L. (2019). The avocado genome informs deep angiosperm phylogeny, highlights introgressive hybridization, and reveals pathogen-influenced gene space adaptation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 116(34), 17081–17089. <https://doi.org/10.1073/pnas.1822129116>
- Rodríguez, N., Capote, M., & Zamora, V. (1999). Cultivo in vitro del aguacatero (*Persea americana* Mill.). *Revista Chapingo Serie Horticultura*, 5, 231–237.
- Rohwer, J. G. (1993). Lauraceae. *Flowering Plants · Dicotyledons*, 89(1789), 366–391. https://doi.org/10.1007/978-3-662-02899-5_46
- Salazar-García, S., & C. J. Lovatt. (2002). Flowering of avocado (*Persea americana* Mill.). I. Inflorescence and flower development. *Revista Chapingo Serie Horticultura*, 8(1), 71–75.
- Salazar-Gonzalez, J. A., Castro-Medina, M., Bernardino-Rivera, L. E., Martínez-Terrazas, E., Casson, S. A., & Urrea-López, R. (2023). In planta transient transformation of avocado (*Persea americana*) by vacuum agroinfiltration of aerial plant parts. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 152, 635–646. <https://doi.org/10.1007/s11240-022-02436-9>
- Salazar-González, J., Martínez-terrazas, E., Casson, S. A., & Urrea-lopez, R. (2022). Leaf wounding and jasmonic acid act synergistically to enable efficient *Agrobacterium*-mediated transient transformation of *Persea americana*. *Research Square*. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-1631178/v1>
- Sánchez-González, E. I., Gutiérrez-Díez, A., & Mayek-Pérez, N. (2020). Outcrossing rate and genetic variability in Mexican race avocado. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 145(1), 53–59. <https://doi.org/10.21273/JASHS04785-19>
- Scora, R. W., & Bergh, B. (1990). the origins and taxonomy of avocado (*Persea americana*) Mill. Lauraceae. *Acta Horticulturae*, 275, 387–394. <https://doi.org/10.17660/actahortic.1990.275.47>
- Seijo, M. F., Patricia, A., Fiquitiva, B., Kosky, R. G., Ramírez, Y. G., & Autor, C. (2004). Formación de callos de *Persea americana* Mill. cultivar Catalina a partir de segmentos de hojas de plantas in vitro. *Biotecnología Vegetal*, 4(2), 85–90.
- Sharma, R., Liang, Y., Lee, M. Y., Pidatala, V. R., Mortimer, J. C., & Scheller, H. V. (2020). *Agrobacterium*-mediated transient transformation of sorghum leaves for accelerating functional genomics and genome editing studies. *BMC Research Notes*, 13(1), 1–7. <https://doi.org/10.1186/s13104-020-04968-9>
- Skalák, J., Cerný, M., Jedelský, P., Dobrá, J., Ge, E., Novák, J., Hronková, M., Dobrev, P., Vanková, R., & Brzobohatý, B. (2016). Stimulation of *ipt* overexpression as a tool to elucidate the role of cytokinins in high temperature responses of *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany*, 67(9), 2861–2873. <https://doi.org/10.1093/jxb/erw129>

- Smith, C. E. (1966). Archeological evidence for selection in avocado. *Economic Botany*, 20(2), 169–175. <https://doi.org/10.1007/BF02904012>
- Song, G. Q., Prieto, H., & Orbovic, V. (2019). Agrobacterium-mediated transformation of tree fruit crops: Methods, progress, and challenges. *Frontiers in Plant Science*, 10, Article 226. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00226>
- Stamp, J. A., & Meredith, C. P. (1988). Proliferative somatic embryogenesis from zygotic embryos of grapevine. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 113(6), 941–945. <https://doi.org/10.21273/jashs.113.6.941>
- Storey, W. B., Bergh, B., & Zentmyer, G. A. (1986). The origin, indigenous range, and dissemination of the avocado. *California Avocado Society Yearbook*, 70, 127–133.
- Suarez, I. E., Schnell, R. A., Kuhn, D. N., & Litz, R. E. (2006). Recovery and indexing of avocado plants (*Persea americana*) from embryogenic nucellar cultures of an avocado sunblotch viroid-infected tree. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 84(1), 27–37. <https://doi.org/10.1007/s11240-005-7532-1>
- Sugiyama, M. (2002). Organogenesis in vitro. *Tanpakushitsu Kakusan Koso. Protein, Nucleic Acid, Enzyme*, 47(12), 1587–1592.
- Tamayo-Ramos, D. I., Salazar-González, J. A., Casson, S. A., & Urrea-López, R. (2022). Old and new horizons on *Persea americana* transformation techniques and applications. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 150(2), 253-266. <https://doi.org/10.1007/s11240-022-02268-7>
- Tyurin, A. A., Suhorukova, A. V., Kabardaeva, K. V., & Goldenkova-Pavlova, I. V. (2020). Transient gene expression is an effective experimental tool for the research into the fine mechanisms of plant gene function: Advantages, limitations, and solutions. *Plants*, 9(9), 1–19. <https://doi.org/10.3390/plants9091187>
- Vaghchhipawala, Z., Rojas, C.M., Senthil-Kumar, M., Mysore, K.S. (2011). Agroinoculation and agroinfiltration: Simple tools for complex gene function analyses. In A. Pereira (Ed.) *Plant reverse genetics. Methods in molecular biology* (Vol. 678, pp. 65-76). Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-60761-682-5_6
- Vancanneyt, G., Schmidt, R., O'Connor-Sanchez, A., Willmitzer, L., & Rocha-Sosa, M. (1990). Construction of an intron-containing marker gene: Splicing of the intron in transgenic plants and its use in monitoring early events in Agrobacterium-mediated plant transformation. *MGG Molecular & General Genetics*, 220(2), 245–250. <https://doi.org/10.1007/BF00260489>
- Vergara-Pulgar, C., Rothkegel, K., González-Agüero, M., Pedreschi, R., Campos-Vargas, R., Defilippi, B. G., & Meneses, C. (2019). De novo assembly of *Persea americana* cv. “Hass” transcriptome during fruit development. *BMC Genomics*, 20(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/s12864-019-5486-7>
- Witjaksono. (1997). Development of protocols for Avocado tissue culture: somatic embryogenesis, protoplast culture, shoot proliferation and protoplast fusion (Doctoral dissertation, University of Florida).

- Witjaksono, & Litz, R. E. (1999). Induction and growth characteristics of embryogenic avocado cultures. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 58(1), 19–29.
<https://doi.org/10.1023/A:1006370912755>
- Witjaksono, Litz, R. E., & Pliego-Alfaro, F. (1999). Somatic embryogenesis of avocado (*Persea americana* Mill.). In S. M. Jain, P. K. Gupta, & R. J. Newton (Eds.), *Somatic embryogenesis in woody plants* (Vol. 5, pp. 197-214). Springer.
https://doi.org/10.1007/978-94-011-4774-3_13
- Witney, G. W., Arpaia, M. L., Clegg, M. T., & Douhan, G. W. (2005). Avocado germplasm preservation and breeding program in California. New Zealand and Australia Avocado Grower's Conference, September, 8.
- Young, M. J. (1983). Avocado callus and bud culture. *Proceedings of the Florida State Horticulture Society*, 96(1), 181–182.
- Zafar, T., & Sidhu, J. S. (2011). Avocado: Production, quality, and major processed products. *Handbook of Vegetables and Vegetable Processing*, 1871, 525–543.
<https://doi.org/10.1002/9780470958346.ch26>
- Zirari, A., & Lionakis, S. M. (1994). Effect of cultivar, explant type, etiolation pretreatment and the age of plant material on the *in vitro* regeneration ability of avocado (*Persea americana*). *Acta Horticulturae*, 365, 69–76.
<https://doi.org/10.17660/actahortic.1994.365.6>
- Ziv, D., Zviran, T., Zezak, O., Samach, A., & Irihimovitch, V. (2014). Expression profiling of FLOWERING LOCUS T-like gene in alternate bearing 'Hass' avocado trees suggests a role for PaFT in avocado flower induction. *PLoS ONE*, 9(10), Article e110613. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0110613>
- Zulfiqar, B., Abbasi, N. A., Ahmad, T., & Hafiz, I. A. (2009). Effect of explant sources and different concentrations of plant growth regulators on *in vitro* shoot proliferation and rooting of avocado (*Persea americana* Mill.) cv. Fuerte. *Pakistan Journal of Botany*, 41(5), 2333–2346.