

Variabilidad genética de cultivo *in vitro* de aguacate raza mexicana*

Genetic variability of Mexican avocado race using *in vitro* culture

Ivón Montserrat Cerda-Hurtado¹, Ma. Del Carmen Ojeda-Zacarias¹, Leobardo Iracheta-Donjuan², Jesús Martínez-De la Cerda¹, Jorge Ariel Torres-Castillo³ y Adriana Gutiérrez-Diez^{1§}

¹Facultad de Agronomía- Universidad Autónoma de Nuevo León. Francisco Villa S/N. Col. Ex-Hacienda El Canadá. Gral. Escobedo, Nuevo León, México. C. P. 66054. Tel: 1340-4399. (ivocerhu@hotmail.com; ojedacz@yahoo.com.mx; jemarcer@yahoo.com.mx). ²Campo Experimental-INIFAP. Rosario Izapa, C. P. 30870, Tuxtla Chico, Chiapas. México. (lidmont@hotmail.com). ³Instituto de Ecología- Aplicada Universidad Autónoma de Tamaulipas. División del Golfo 346. Col. Libertad. Cd. Victoria, Tamaulipas, México. C. P. 87019. (jorgearieltorres@hotmail.com). [§]Autor para correspondencia: meguidiez@aol.com.

Resumen

Explantos foliares de *Persea americana* Mill. var. *drymifolia*, se establecieron en medio DCR (Gupta y Durzan, 1985) suplementado con vitaminas y reguladores del crecimiento para producir callos, dos sub cultivos se realizaron en intervalos de 30 a 45 días entre ellos. Con el fin de determinar la variabilidad genética se generaron 341 marcadores AFLP (amplified fragment length polymorphism) polimórficos con 10 combinaciones de iniciadores, se analizaron 94 muestras: la planta madre, 31 callos, 31 callos del primer sub cultivo y 31 callos del segundo sub cultivo. Se determinó el contenido de información polimórfica (PIC) por combinación de iniciadores y se calculó la distancia genética entre muestras para hacer el análisis de agrupamiento. Se obtuvo la diversidad genética entre la planta madre, callos y callos de los dos sub cultivos y se realizó el análisis de varianza molecular. Los valores PIC indicaron que las combinaciones de iniciadores fueron adecuadas para estimar la variabilidad genética de los callos. En el análisis de agrupamiento, la planta madre mostró distancias de 0.63 a 0.7 con respecto a sus callos, distancias de 0.78-0.99 se obtuvieron entre los callos y los callos de los dos sub cultivos. La diversidad genética presentó diferencias significativas, el análisis de varianza molecular demostró variabilidad genética entre

Abstract

Leaf explants of *Persea americana* Mill. var. *drymifolia* were established on DCR medium (Gupta and Durzan, 1985) supplemented with vitamins and growth regulators to produce callus, two sub cultures were made in intervals of 30 to 45 days between them. In order to determine the genetic variability 341 AFLP (amplified fragment length polymorphism) polymorphism with 10 primer combinations were generated, 94 samples were analyzed: the mother plant, 31 calluses, 31 calluses from the first sub culture and 31 calluses from the second sub culture. Polymorphic information content (PIC) was determined by primer combination and the genetic distance between samples was calculated for the cluster analysis. Genetic diversity between the mother plant, calluses and calluses of the two sub cultures were obtained and the analysis of molecular variance was performed. The PIC values indicated that the primer combinations were adequate to estimate the genetic variability of calluses. In the cluster analysis, the mother plant showed distances of 0.63 to 0.7 in regard to their calluses, distances of 0.78 - 0.99 were obtained between calluses and calluses of the two sub cultures. Genetic diversity showed significant differences, analysis of molecular variance demonstrated genetic variability between the mother plant, calluses and calluses of the two sub cultures

* Recibido: octubre de 2014
Aceptado: diciembre de 2014

la planta madre, callos y callos de los dos sub cultivos, así como dentro de los callos, callos del primer sub cultivo y callos del segundo sub cultivo. Los resultados indicaron que la variabilidad genética puede ocurrir en cualquier sub cultivo. Debido a la variabilidad genética presentada los callos no se consideraron clones.

Palabras clave: *Persea americana* Mill. var. *drymifolia*, AFLP, cultivo de callo, variación somaclonal.

Introducción

En plantas el cultivo *in vitro* es una alternativa para la conservación *ex situ*, el intercambio y conservación de germoplasma y la propagación clonal; la selección del explante depende de los recursos y objetivos finales de la técnica. Diversos explantes se han utilizado para obtener tipos diferentes de morfogénesis en aguacate (Yasseen, 1993), su capacidad morfogenética bajo condiciones *in vitro* se asocia al empleo de materiales con características juveniles (Pliego-Alfaro y Murashige, 1987). El callo es una masa amorfa de células vegetales poco diferenciadas y de rápida proliferación, sus características *in vitro* están determinadas por los reguladores de crecimiento utilizados, la especie, el explante inicial y las condiciones físicas de incubación (Pérez-Molphe-Balch *et al.*, 1999). Callos obtenidos de cotiledones de aguacate se conservaron por más de 15 años sin presentar condiciones aparentes de diferenciación (Schroeder, 1976). Embriones somáticos de aguacate se han regenerado a partir de cultivo de callo (Skene y Barlass, 1983; Mooney y Van Staden, 1987; Pliego y Murashige, 1988; Efendi y Litz, 2003; Vidales *et al.*, 2003).

La variación somaclonal son cambios genéticos en células y tejidos que pueden aparecer durante el cultivo *in vitro*. Estos cambios pueden manifestarse como mutaciones heredables a las progenies de las plantas regeneradas y resultan de las variaciones pre existentes en el genotipo, el nivel de ploidía, las diferencias genéticas que pre-existen en las células del explante, los efectos inducidos por el medio de cultivo, la vía de regeneración, la naturaleza del callo, la edad del cultivo y la alteración al metabolismo celular (Krikorian, 1991; Cardone *et al.*, 2004; Medina *et al.*, 2007; Sánchez-Chiang y Jiménez, 2009; Peredo *et al.*, 2009). Se ha reconocido que los cultivos de callos producen progenies que difieren considerablemente del material inicial (Peredo *et al.*, 2006). En plantas con ciclos de vida largo, la variación

as well as within the calluses, calluses of the first sub culture and calluses of the second sub culture. The results indicated that genetic variability can occur in any sub culture. Due to genetic variability presented in callus clones were not considered.

Keywords: *Persea americana* Mill. var. *drymifolia*, AFLP, callus culture, somaclonal variation.

Introduction

In plants, *in vitro* culture is an alternative to the *ex situ* conservation, the exchange and conservation of germplasm and clonal propagation; explant selection depends on resources and final objective of the technic. Different explants have been used to obtain different types of morphogenesis in avocado (Yasseen, 1993) their morphogenetic capacity under *in vitro* conditions is associated with the use of materials with juvenile characteristics (Pliego-Alfaro and Murashige, 1987). The callus is an amorphous mass of relatively undifferentiated plant cells and rapid proliferation; *in vitro* characteristics are determined by growth regulators used, species, initial explant and physical conditions of incubation (Pérez-Molphe-Balch *et al.*, 1999). Callus obtained from avocado cotyledons were kept for over 15 years, without showing apparent conditions of differentiation (Schroeder, 1976). Avocado somatic embryos have been regenerated from callus culture (Skene and Barlass, 1983; Mooney and Van Staden, 1987; Pliego and Murashige, 1988; Efendi and Litz, 2003; Vidales *et al.*, 2003).

Somaclonal variations are genetic changes in cells and tissues that can occur during the cultivation *in vitro*. These changes can manifest as hereditary mutations in the progeny of regenerated plants and result from preexisting variations in the genotype, the polyploidy level, regeneration pathway, callus nature culture, culture age and altered cellular metabolism (Krikorian, 1991; Cardone *et al.*, 2004; Medina *et al.*, 2007; Sánchez-Chiang and Jiménez, 2009; Peredo *et al.*, 2009). It has been recognized that callus cultures produce progeny that differ considerably from the starting material (Peredo *et al.*, 2006). In plants with long life cycles, somaclonal variation is disadvantageous for micro propagation and mutations can be detected only at a late stage (Fourré *et al.*, 1997).

There are morphological, biochemical and molecular techniques to monitor genetic stability of *in vitro* cultures. Somaclonal variants regenerated from leaf callus have been

somaclonal es una desventaja para la micropropagación ya que las mutaciones sólo pueden ser detectadas en etapa tardía (Fourré *et al.*, 1997).

Existen criterios morfológicos, bioquímicos y moleculares para el monitoreo de la estabilidad genética de los cultivos *in vitro*. Variantes somaclonales regeneradas de callo de hoja se han detectado a través de análisis enzimático en remolacha (Sabir *et al.*, 1992) y papa (Alicchio *et al.*, 1987); este análisis se ve limitado por la disponibilidad, la variación en relación con las condiciones ambientales de crecimiento y la edad del cultivo, ya que afectan su reproducibilidad (Rani *et al.*, 1995; Chen *et al.*, 1998; Cardone *et al.*, 2004). Debido a que las mutaciones también ocurren en regiones de ADN que no expresan proteínas, en regiones espaciadoras y en otras regiones que no traducen y transcriben ADN, es necesario utilizar otro tipo de técnica como marcadores moleculares tipo RAPD, SSR y AFLP. Estos marcadores moleculares no son influenciados por el ambiente ni por los estados fenológicos de la planta, se producen en cantidad ilimitada, tienen amplia cobertura en el genoma, presentan alto nivel de polimorfismo y se detectan en etapas tempranas de los cultivos.

Los AFLP son secuencias de ADN identificadas y caracterizadas que revelan la variabilidad nucleotídica de una o varias regiones del genoma de cada individuo (Vos *et al.*, 1995), se utilizan para caracterizar la variación somaclonal con gran precisión y menos esfuerzo que los análisis fenotípicos y citológicos, siendo un medio para evaluar la estabilidad genética del cultivo *in vitro* (Cloutier y Landry, 1994; Sánchez-Chiang y Jiménez, 2009). Los AFLP se han utilizado para detectar la variación somaclonal de plantas generadas *in vitro* en *Carya illinoensis* (Vendrame *et al.*, 1999), *Arabidopsis thaliana* (Polanco y Ruiz, 2002), *Alnus acuminata* H. B. K. (Gutiérrez, 2002; Marulanda *et al.*, 2006), *Agave fourcroydes* (González *et al.*, 2004), *Hevea brasiliensis* (Medina *et al.*, 2007) y *Manihot esculenta* (Medero *et al.*, 2002). Debido a lo mencionado antes, el objetivo de este trabajo fue evaluar la variabilidad genética en cultivos de callo de *Persea americana* Mill. var. *drymifolia* utilizando AFLP.

Explantos de 1 cm² de hojas jóvenes desarrolladas y sanas de un árbol de *P. americana* var. *drymifolia* de seis años de edad, se establecieron en medio DCR (Gupta y Durzan, 1985), pH 7.5 y 4.5 g L⁻¹ de Phytigel®, adicionado con vitaminas y reguladores de crecimiento: 200 mg L⁻¹ de inositol, 50 mg L⁻¹ de glutamina, 500 mg L⁻¹ de caseína hidrolizada, 0.3 mg L⁻¹ de 6-bencilaminopurina, 0.01 mg L⁻¹ de ácido naftalenacético, 0.1 mg L⁻¹ de tiamina, 0.5 mg L⁻¹ de ácido nicotínico, 0.5 mg

detectado through enzymatic analysis in beet (Sabir *et al.*, 1992) and potato (Alicchio *et al.*, 1987); this analysis is limited by the availability, the variation in relation to environmental growth conditions and culture age, affect reproducibility (Rani *et al.*, 1995; Chen *et al.*, 1998; Cardone *et al.*, 2004). Because mutations also occur in DNA regions that do not express proteins, in spacer regions and other regions that do not translate and transcribe DNA, it is necessary to use another type of technique as molecular markers RAPD, SSR and AFLP type. These molecular markers are not influenced by the environment or by the phenological stages of the plant, are produced in unlimited quantities, have extensive coverage in the genome, show high level of polymorphism and are detected at early stages of crop.

AFLP are identified and characterized DNA sequences that reveal the nucleotide variation of one or more regions of the genome of each individual (Vos *et al.*, 1995), are used to characterize somaclonal variation with high accuracy and less effort than the phenotypic and karyological analysis, being a form to assess the genetic stability of *in vitro* culture (Cloutier and Landry, 1994, Sanchez-Chiang and Jiménez, 2009). AFLP have been used to detect somaclonal variation in plants generated *in vitro* in *Carya illinoensis* (Vendrame *et al.*, 1999), *Arabidopsis thaliana* (Polanco and Ruiz, 2002), *Alnus acuminata* H.B.K. (Gutiérrez, 2002; Marulanda *et al.*, 2006), *Agave fourcroydes* (González *et al.*, 2004), *Hevea brasiliensis* (Medina *et al.*, 2007) and *Manihot esculenta* (Medero *et al.*, 2002). As mentioned before, the aim of this study was to evaluate the genetic variability in callus cultures of *Persea americana* Mill. var. *drymifolia* using AFLP.

Developed and a healthy explants of 1 cm² of young leaves from young tree of *P. americana* var. *drymifolia*, six years old, established in DCR medium (Gupta and Durzan, 1985), pH 7.5 and 4.5 g L⁻¹ Phytigel®, supplemented with vitamins and growth regulators: 200 mg L⁻¹ of inositol, 50 mg L⁻¹ glutamine, 500 mg L⁻¹ casein hydrolyzate, 0.3 mg L⁻¹ 6-benzylaminopurine, 0.01 mg L⁻¹ naphthaleneacetic acid, 0.1 mg L⁻¹ thiamine, 0.5 mg L⁻¹ nicotinic acid, 0.5 mg L⁻¹ pyridoxine, 2 mg L⁻¹ glycine, 10 mg L⁻¹ ascorbic acid, 10 mg L⁻¹ citric acid, 1.5 mg L⁻¹ 2,4-D, 0.3 mg L⁻¹ kinetin, 20 g L⁻¹ sucrose. The explants were placed at 20 ± 2 °C in darkness until callus formation. Two sub-cultures of callus were performed in the same medium.

For the analysis of genetic variability 94 samples were generated in AFLP: mother plant (A), 31 calluses of the mother plant (A1, A2..... A31), 31 calluses of the first

L⁻¹ de piridoxina, 2 mg L⁻¹ de glicina, 10 mg L⁻¹ de ácido ascórbico, 10 mg L⁻¹ de ácido cítrico, 1.5 mg L⁻¹ de 2,4-D, 0.3 mg L⁻¹ de kinetina, 20 g L⁻¹ de sacarosa. Los explantes se colocaron a 20 °C ± 2 °C en oscuridad hasta la formación de callo. Dos sub-cultivos de los callos se realizaron en el mismo medio de cultivo.

Para el análisis de la variabilidad genética se generaron AFLP en 94 muestras: planta madre (A), 31 callos de la planta madre (A1, A2...A31), 31 callos del primer sub-cultivo (A1-1, A2-1...A31-1) y 31 callos del segundo sub-cultivo (A1-2, A2-2...A31-2). La generación de AFLP se llevó a cabo de acuerdo con lo propuesto por Vos *et al.* (1995) con el estuche comercial IRDyeTM fluorescent AFLP[®] kit for large plant genome analysis (Li-Cor Inc, Lincoln, NE, USA). Se utilizaron 10 combinaciones de iniciadores formadas por cuatro iniciadores *Mse*I: M-CAA, M-CTC, M-CTC, M-CAT (GATGAGTCCTGAGTAA-XXX) y seis iniciadores *Eco*RI: E-ACC, E-ACA, E-AAG, E -ACT, E-AGC, E-AGG (GACTGCGTACCAATTC-XXX).

La visualización y análisis de los fragmentos amplificados se realizó por electroforesis en poliacrilamida a 6.5% en un secuenciador LI-COR IR² 4200 (Li-Cor Inc, Lincoln, NE, USA), con el programa SAGA^{MX} (Li-Cor Inc, Lincoln, NE, USA); se generó una matriz de datos binarios asignando el valor de 1 a la presencia de banda y 0 a la ausencia. El análisis de datos se realizó por medio del programa Info-Gen (Balzarini y Di Renzo, 2013), para la descripción de los AFLP se calculó el contenido de información polimórfica (PIC), el porcentaje de amplificación, y la probabilidad de que dos individuos compartan el mismo alelo. Para la planta madre, callos, callos del primer sub-cultivo y callos del segundo sub-cultivo se calculó la diversidad genética (prueba de Friedman) y se realizó el análisis de varianza molecular (Balzarini *et al.*, 2010). Las distancias genéticas se calcularon por medio del índice de Nei estándar, el dendrograma se construyó utilizando el algoritmo UPGMA (Balzarini *et al.*, 2010).

La formación de callo ocurrió a los 30 días después del establecimiento *in vitro*, la de los callos de los dos sub-cultivos ocurrió de 30 a 45 días después del establecimiento en medio fresco. Los AFLP generados estuvieron en el rango de 70 a 460 bp. Se produjeron en total 341 marcadores AFLP polimórficos. El promedio de AFLP por combinación de iniciadores fue de 34.1; en estudios de estabilidad genética en plantas de yuca *Manihot esculenta* Crantz. propagadas por embriogénesis somática y organogénesis, Medero *et al.* (2002) identificaron de 36 a 38 marcadores AFLP por combinación

sub-culture (A1-1, A2-1... A31-1) and 31 calluses of the second subculture (A1-2, A2-2... A31-2). The generation of AFLP was performed according to the proposal by Vos *et al.* (1995) with a commercial kit IRDyeTM fluorescent AFLP[®] kit for large plant genome analysis (Li-Cor Inc, Lincoln, NE, USA). 10 primer combinations consisting of four *Mse*I primers: M-CAA, M-CTC, M-CTC, M-CAT (GATGAGTCCTGAGTAA-XXX) and six *Eco*RI primers: E-ACC, E-ACA, E-AAG, E -ACT, E-AGC, E-AGG (GACTGCGTACCAATTC-XXX) were used.

The visualization and analysis of the amplified fragments was performed by electrophoresis on polyacrylamide at 6.5% in a LI-COR IR2 4200 sequencer (Li-Cor Inc, Lincoln, NE, USA) with Saga^{MX} (Li-Cor Inc, Lincoln, NE, USA); a matrix of binary data was generated assigning the value 1 to the presence of band and 0 to the absence. Data analysis was performed using the program Info-Gen (Balzarini and Di Renzo, 2013), for a description of AFLP calculated the polymorphism information content (PIC), the percentage of amplification and the probability that two individuals share the same allele. For mother plant, calluses, calluses of the first subculture and calluses of the second subculture calculated the genetic diversity (Friedman test) and performed an analysis of molecular variance (Balzarini *et al.*, 2010). Genetic distances were calculated using Nei standard, the dendrogram was constructed using the UPGMA algorithm (Balzarini *et al.*, 2010).

Callus formation occurred at 30 days after the *in vitro* establishment, callus of the two sub-cultures occurred from 30 to 45 days after the establishment in fresh medium. The AFLP generated ranged from 70 to 460 bp. There were a total of 341 AFLP polymorphic markers. The average of AFLP per primer combination was 34.1; in studies of genetic stability in cassava *Manihot esculenta* Crantz plants propagated by somatic embryogenesis and organogenesis, Medero *et al.* (2002) identified 36 to 38 AFLP markers per primer combination M- + E- with three and two selective nucleotides, and between 20 to 26 markers per primer combination with three selective nucleotides, these markers have revealed that the clones were genetically identical to their mother plants. In organogenic calluses of hop *Humulus lupulus* L., Peredo *et al.* (2006) identified 54 AFLP markers per primer combination, the identified patterns in the markers were identical between the mother plant and calluses. In the study of somaclonal variation among embryogenic callus and donor plants in *Hevea brasiliensis*, Medina *et al.* (2007) identified 62.5 AFLP polymorphic markers by primer combination.

de iniciadores M- + E- con tres y dos nucleótidos selectivos, y entre 20 y 26 marcadores por combinación de iniciadores con tres nucleótidos selectivos, estos marcadores permitieron determinar que los clones fueron genéticamente idénticos a sus plantas madres. En callos organogénicos de lúpulo *Humulus lupulus* L., Peredo *et al.* (2006) identificaron 54 marcadores AFLP por combinación de iniciadores, los patrones de los marcadores identificados fueron idénticos entre la planta madre y los callos. En el estudio de variación somaclonal entre callos embriogénicos y plantas donadoras en *Hevea brasiliensis*, Medina *et al.* (2007) identificaron 62.5 marcadores AFLP polimórficos por combinación de iniciadores.

El promedio de bandas amplificadas por iniciador con otros marcadores ha sido menor, con ISSR utilizados para medir la estabilidad genética en plantas regeneradas de *Evolvulus glomeratus* se identificaron 11.25 bandas por iniciador, 95.5% fueron monomórficas (Maritano *et al.*, 2010). Con RAPD Villaça *et al.* (2008) identificaron 2.7 bandas polimórficas por iniciador en plantas de *Zea mays* regeneradas de callo, en *Humulus lupulus* con RAPD se identificaron 7.3 bandas por iniciador (Peredo *et al.*, 2009). Estos resultados confirman la ventaja de utilizar AFLP en estudios de estabilidad genética de cultivos *in vitro* ya que proporcionan mayor información debido a la mayor cantidad de bandas polimórficas.

Los valores PIC de las combinaciones de iniciadores oscilaron entre 0.27 y 0.36, lo que indicó que las combinaciones utilizadas fueron útiles para estimar la variabilidad genética de los callos. Los valores bajos de probabilidad de que dos muestras compartan el mismo alelo, indicó un alto grado de confianza para la identificación de los callos (Cuadro 1) (Balzarini *et al.*, 2010).

The average of amplified bands per primer with other markers was lower, with ISSR used to measure genetic stability of regenerated plants in *Evolvulus glomeratus*, identified 11.25 bands per primer, 95.5% were monomorphic (Maritano *et al.*, 2010). With RAPD Villaça *et al.* (2008) identified 2.7 polymorphic bands per primer in *Zea mays* plants regenerated from callus; in *Humulus lupulus* with RAPD 7.3 bands per primer (Peredo *et al.*, 2009) were identified. These results confirm the advantage of using AFLP in studies of genetic stability *in vitro* cultures as they provide more information due to the higher number of polymorphic bands.

PIC values from primer combinations ranged from 0.27 and 0.36, indicating that the combinations used were useful to estimate the genetic variability of calluses. The low values of probability, that two samples share the same allele, indicate a high degree of confidence for the identification of callus (Table 1) (Balzarini *et al.*, 2010).

There were significant differences in multiple comparisons for Friedman test for genetic diversity and proportion of polymorphic loci between mother plant, calluses, calluses of the first sub-culture and calluses of the second sub-culture; in both cases calluses from the first sub-culture were statistically different and showed higher genetic variability (higher values of genetic diversity and proportion of polymorphic loci), calluses and calluses of the second sub-culture were statistically the same, as the mother plant did not show genetic variability. Analysis of molecular variance showed that there is a genetic variability between the mother plant, calluses, calluses of the first sub-culture and calluses of the second sub-culture (12%) ($p < 0.0001$); thus within calluses, calluses of the first subculture and calluses of the second sub-culture (88%), ($p < 0.0001$).

Cuadro 1. Descripción de los AFLP por combinación de iniciadores.

Table 1. Description of the AFLP per primer in combination.

Combinación de iniciadores	Total de bandas amplificadas	PIC	Porcentaje de amplificación	Probabilidad de que dos individuos compartan el mismo alelo
M-CAA+E-ACC	44	0.36	57.91	3.1E-21
M-CAA+E-AGC	50	0.33	66.65	2.4E-16
M-CAA+E-ACA	37	0.36	42.98	2.4E-24
M-CAA+E-AGG	37	0.34	39.96	1.1E-18
M-CTC+EAAG	35	0.36	54.31	2.7E-21
M-CTC+E-ACT	36	0.35	57	5.5E-19
M-CTT+E-AAG	29	0.36	50.34	3.5E-22
M-CTT+E-AGC	34	0.34	52.05	8.9E-20
M-CAT+E-ACA	19	0.27	20.54	1.2E-26
M-CAT+E-AGG	20	0.28	22.65	4.3E-26

Se obtuvieron diferencias significativas en las comparaciones múltiples para la prueba de Friedman de diversidad genética y proporción de loci polimórficos entre la planta madre, callos, callos del primer sub-cultivo y callos del segundo sub-cultivo; en ambos casos los callos del primer sub-cultivo fueron estadísticamente diferentes y presentaron mayor variabilidad genética (valores más altos de diversidad genética y proporción de loci polimórficos), los callos y callos del segundo sub-cultivo fueron estadísticamente iguales mientras que la planta madre no presentó variabilidad genética. El análisis de varianza molecular demostró que existe variabilidad genética entre la planta madre, callos, callos del primer sub-cultivo y callos del segundo sub-cultivo (12%) ($p < 0.0001$); así como dentro de los callos, callos del primer sub-cultivo y callos del segundo sub-cultivo (88%) ($p < 0.0001$).

El dendrograma del análisis de agrupamiento (Figura 1) tuvo una correlación cofenética de 0.96 lo que indicó poca distorsión entre las distancias genéticas y la de agrupamiento. Distancias de 0.63 a 0.7 de la planta madre con respecto a los callos se presentaron en 45.6% de los callos, 29.8% de los callos del primer sub-cultivo, y 19.3% de los callos del segundo sub-cultivo. Distancias de 0.78 a 0.99 con respecto a la planta madre se presentaron en 8.5% de los callos, 34.3% de los callos del primer sub-cultivo y 48.6% de los callos del segundo sub-cultivo; la menor variabilidad somaclonal se presentó entre los callos y los callos del primer sub-cultivo.

En los callos del segundo sub-cultivo la distancia genética aumentó con respecto a la planta madre, en algunos callos que se continuaron con tercer y cuarto sub-cultivo las distancias genéticas con respecto al segundo sub-cultivo fueron de 0.08 y 0.32, respectivamente; las distancias genéticas con respecto a la planta madre fueron de 0.72 y 0.85, respectivamente. Maritano *et al.* (2010) sugieren un valor de distancia de 0.05 para considerar que los clones obtenidos por cultivo *in vitro* son genéticamente idénticos, por lo que de acuerdo con los resultados, los callos obtenidos no son clones ya que presentaron variabilidad genética.

Zucchi *et al.* (2002) reportaron intervalos de polimorfismo de 3.06% a 5.1% entre la planta madre y los explantes derivados de los sub-cultivos en caña de azúcar, los polimorfismos se presentaron en todos los sub-cultivos y no se incrementaron con el número de los mismos; al igual que en nuestro trabajo se mostró mayor nivel de variación entre la planta madre y los explantes establecidos *in vitro*. El proceso de cultivo *in vitro* es un factor estresante para el genoma de la planta, durante el cultivo *in vitro* la planta sufre des-diferenciación celular

The dendrogram of the cluster analysis (Figure 1) had a cophenetic correlation of 0.96 which indicated little distortion between genetic distances and grouping. Distances from 0.63 to 0.7 of the mother plant with respect to callus occurred in 45.6% of calluses, 29.8% from the calluses of the first sub-culture, and 19.3% of the calluses from the second sub-culture. Distances from 0.78 to 0.99 with respect to the mother plant occurred in 8.5% of calluses, 34.3% from the calluses of the first sub-culture and 48.6% from the calluses of the second sub-culture; the lowest somaclonal variation occurred between calluses and calluses of the first sub-culture.

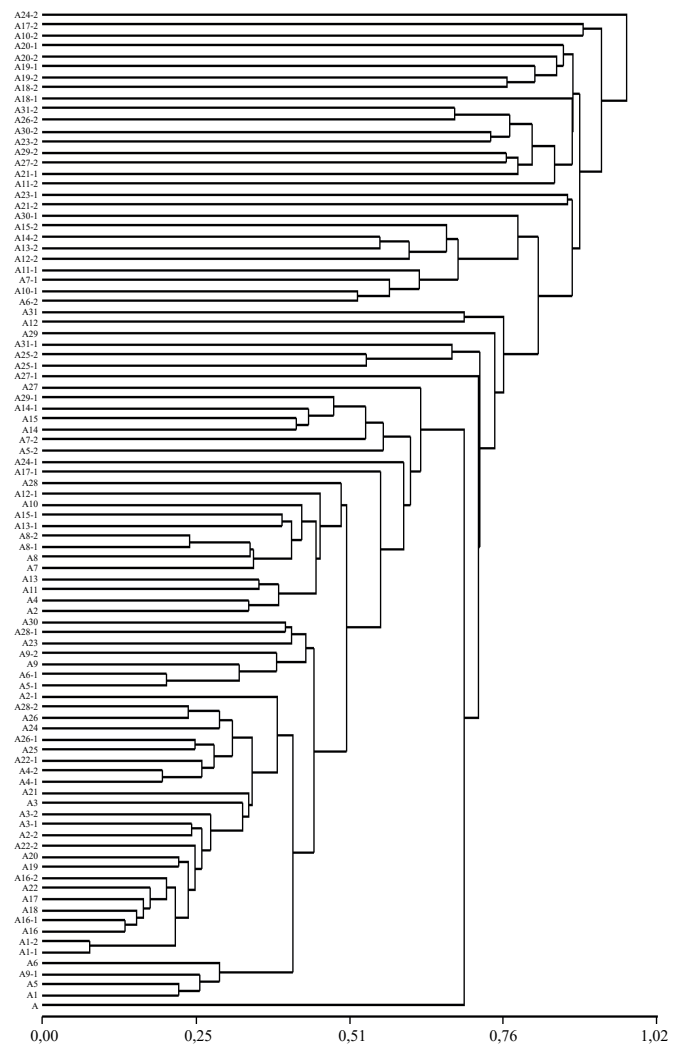


Figura 1. Dendrograma del análisis de agrupamiento entre la planta madre, callos y callos de los dos sub-cultivos de hojas de aguacate; método UPGMA y distancia genética de Dice.

Figure 1. Dendrogram from cluster analysis between mother plant, calluses and calluses of the two sub-cultures of avocado leaves; UPGMA method and Dice genetic distance.

principalmente en la primera generación, en las siguientes generaciones o sub-cultivos el nivel de polimorfismo decrece debido a procesos no predecibles (Zucchi *et al.*, 2002). Existen reportes que difieren con los resultados obtenidos en este trabajo, estudios de variación genética y epigenética por medio de AFLP en lúpulo indicaron que no se produjeron re-arreglos genéticos durante el cultivo *in vitro* de callo y sus plantas derivadas, siendo posible producir plantas sin variación por organogénesis indirecta (Peredo *et al.*, 2006), estos resultados permitieron sustentar que la variación genética producida por el cultivo *in vitro* depende entre otros factores del género y especie y del genotipo de la planta madre.

Conclusión

Los marcadores AFLP permitieron estimar la variabilidad genética entre y dentro la planta madre, sus callos y callos sub-cultivados. Los callos y sus sub-cultivos no son clones ya que presentaron variabilidad genética. De acuerdo con el propósito de la aplicación de las técnicas de cultivo *in vitro*, es necesario, que se consideren los factores que influyen en el tipo y frecuencia de la variación somaclonal (explante, edad de la planta madre, edad del tejido, genotipos, condiciones de incubación). Si el objetivo de la técnica *in vitro* en cultivos como el aguacatero y otras plantas perennes es la propagación clonal, conservación de germoplasma o transporte del mismo para programas de mejoramiento, se recomienda integrar otro tipo de marcadores moleculares que detecten regiones de expresión debido a que los AFLP detectan variación sin consecuencia fenotípica.

Literatura citada

- Alicchio, R.; Antonioli, C.; Graziani, L.; Roncarati, R. and Vannini, C. 1987. Isozyme variation of leaf callus regenerated plants of *Solanum tuberosum*. Ireland. Plant Sci. 53:81-86.
- Balzarini, M. G. y Di Rienzo, J. A. 2013. InfoGen versión 2013. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad Nacional de Córdoba. Argentina. <http://www.info-gen.com.ar>.
- Balzarini, M.; Bruno, C.; Peña, A.; Teich, I. y Di Rienzo J. A. 2010. Estadística en biotecnología. aplicaciones en InfoGen. Encuentro Grupo Editor. Córdoba, Argentina. 41-46 pp.
- Cardone, S.; Olmos, S. y Echenique, V. 2004. Variación somaclonal. In: Biotecnología y mejoramiento vegetal. Echenique, V.; Rubinstein, C. y Mroginski, L. (Eds.). Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Argentina. 83-96 pp.

In calluses of the second subculture, the genetic distance increased compared to the mother plant, in some calluses that continued with third and fourth sub-culture, the genetic distances regarding the second sub-culture were 0.08 and 0.32, respectively; the genetic distances regarding to mother plant were 0.72 and 0.85, respectively. Maritano *et al.* (2010) suggest a distance value of 0.05 to consider that the clones obtained by *in vitro* culture are genetically identical, so according to the results, obtained calluses are not clones since they showed genetic variability.

Zucchi *et al.* (2002) reported polymorphism ranges of 3.06% to 5.1% between the mother plant and explants derived from sub-crops in sugarcane, polymorphism occurred in all sub-cultures and did not increase with the number thereof; as in our work, higher level of variation between the mother plant and established explants *in vitro* was shown. The process of *in vitro* culture is a stressing factor for the genome of the plant; during the cultivation *in vitro*, the plant suffers cell dedifferentiation, mainly in the first generation, in the next generations or sub-cultures, the level of polymorphism decreases, due to non-predictable processes (Zucchi *et al.* 2002). There are reports that differ with the results obtained in this work, studies of genetic and epigenetic variation through AFLP in hop, indicated that genetic rearrangements have not occurred during the cultivation *in vitro* of callus and its derivative plants, being possible to produce plants without variation by indirect organogenesis (Peredo *et al.*, 2006), these results allowed to support the genetic variation produced *in vitro*, depending, among other factors of the genus and species and the genotype of the mother plant.

Conclusion

The AFLP markers allowed estimating the genetic variability between and within the mother plant, their calluses and sub-cultured calluses. Calluses and their sub-cultures are not clones since they showed genetic variability. According to the purpose of the application of *in vitro* culture techniques, it is necessary, to consider the factors that influence the type and frequency of somaclonal variation (explant, age of the mother plant, tissue age, genotypes, incubation conditions). If the purpose of the *in vitro* technique in crops such as avocado and other perennial plants is clonal propagation, germplasm conservation or transport thereof to breeding programs, it is recommended

- Chen, W. H.; Chen, T. M.; Fu, Y. M.; Hsieh, R. M. and Chen, W. S. 1998. Studies on somaclonal variation in *Phalaenopsis*. Germany. Plant Cell Reports. 18:7-13.
- Cloutier, S and Landry, B. S. 1994. Molecular markers applied to plant tissue culture. United States of America. *In vitro* Cel. Development Biol. Plant. 30:32-39.
- Efendi, D. and Litz, R. E. 2003. Cryopreservation of avocado. In: V Congreso Mundial del Aguacate, Actas: Consejería de Agricultura y Pesca, Junta de Andalucía. Sevilla, España. 1:111-114.
- Fourré, J. L.; Berger, P.; Niquet, L. and André, P. 1997. Somatic embryogenesis and somaclonal variation in Norway spruce: morphogenetic, cytogenetic and molecular approaches. Germany. Theoretical Appl. Genetics. 94:159-169.
- González, G.; Alemán, S.; Trujillo, R.; Keb, M.; Abreu, E.; Barredo, F.; Robert, M. L.; Ortiz, R. y Cornides, M.T. 2004. El cultivo *in vitro* como alternativa de la recuperación henequera (*Agave fourcroydes*). Cuba. Biotecnología Aplicada. 21(1):44-48.
- Gupta, P. K. and Durzan, D. J. 1985. Shoot multiplication from mature trees of Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*) and sugar pine (*Pinus lambertiana*). Germany. Plant Cell Reports. 4:177-179.
- Krikorian, A. D. 1991. Estabilidad genotípica en células, tejidos y plantas derivadas de cultivos *in vitro*. In: cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones. Roca, W. M. y Mroginski, L. A. (Eds). Primera edición. Centro Internacional de Agricultura Tropical. Cali, Colombia. 313-338 pp.
- Maritano, P. F.; Alderete, L. M.; Pérez, M. C. and Escandón, A. S. 2010. *In vitro* propagation and genetic stability analysis of *Evolvulus* spp. biotechnological tools for the exploration of native germplasm with ornamental potential. United States of America. *In vitro* Cellular Development Biology Plant. 46:64-70.
- Marulanda, M. L.; Claroz, J. L. y López, A. M. 2006. Caracterización molecular de progenies de aliso *Alnus acuminata* H. B. K. spp. *acuminata*, mediante marcadores AFLP. Colombia. Scientia et Technica. 12(32):463-468.
- Medero, V. R.; Escobar, R.; Gallego, G.; Tohme, J.; Beovidez, Y.; Rodríguez, S. y Gómez, R. 2002. Determinación por AFLP de la estabilidad genética de plantas de yuca obtenidas por embriogénesis somática y organogénesis. Cuba. Biotecnología Vegetal. 2(4):245-247.
- Medina, C.; García, I.; Caro, M. y Aristizábal, F. A. 2007. Análisis AFLP de variación somaclonal en embriones somáticos de *Hevea brasiliensis*. Colombia. Revista Colombiana de Ciencias Químico Farmacéuticas. 36(1):70-80.
- Mooney, P. A. and Van Staden, J. 1987. Induction of embryogenesis in callus from immature embryos of *Persea Americana*. Canada. Can. J. Bot. 65:622-626.
- Peredo, E. L.; Arroyo-García, R. and Revilla, M. A. 2009. Epigenetic changes detected in micropropagated hop plants. Germany. J. Plant Physiol. 166:1101-1111.
- Peredo, E. L.; Revilla, M. A. and Arroyo-García, R. 2006. Assessment of genetic and epigenetic variation in hop plants regenerated from sequential subcultures of organogenic calli. Germany. J. Plant Physiol. 163:1071-1079.
- Pérez-Molphe-Balch, E.; Ramírez, R.; Núñez, H. G. y Ochoa, N. 1999. Introducción al cultivo de tejidos vegetales. Universidad Autónoma de Aguascalientes. Aguascalientes, Aguascalientes, México. 179 p.

to integrate other types of molecular markers that detect expression regions due to AFLP detect variation without phenotypic consequences.

End of the English version



- Pliego, F. and Murashige, T. 1988. Somatic embryogenesis in avocado (*Persea americana* Mill.) *in vitro*. Netherlands. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 12:61-66.
- Pliego-Alfaro, F. and Murashige, T. 1987. Possible rejuvenation of adult avocado by graftage onto juvenile rootstocks *in vitro*. United States of America. HortSci. 22(6):1321-1324.
- Polanco, C. and Ruiz, M. L. 2002. AFLP analysis of somaclonal variation in *Arabidopsis thaliana* regenerate plants. Ireland. Plant Sci. 162(5):817-824.
- Rani, V.; Parida, A. and Raina, S. N. 1995. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers for genetic analysis in micropropagated plants of *Populus deltoids* Marsh. Germany. Plant Cell Reports. 14:459-462.
- Sabir, A.; Newbury, H. J.; Todd, G.; Catty, J. and Ford-Lloyd, B. V. 1992. Determination of genetic stability using isoenzymes and RFLPs in beet plants regenerated *in vitro*. Germany. Theoretical Appl. Gen. 1-2(84):113-117.
- Sánchez-Chiang, N. y Jiménez, V. M. 2009. Técnicas moleculares para la detección de variantes somaclonales. Costa Rica. Agron. Mesoam. 20(1):135-151.
- Schroeder, C. A. 1976. Responses of avocado stem pieces in tissue culture. California Avocado Society Yearbook. United States of America. 60:160-163.
- Skene, K. G. and Barlass, M. 1983. *In vitro* culture of abscised immature avocado embryos. United Kingdom. Ann. Bot. 52(5):667-672.
- Vendrame, W. A.; Kochert, G. and Wetzstein, H. Y. 1999. AFLP analysis of variation in pecan somatic embryos. Germany. Plant Cell Report. 18:853-857.
- Vidales, F. I.; Salgado, R.; Gómez, M. A.; Ángel, E. y Guillén, H. 2003. Embriogénesis somática de aguacate (*Persea americana* Mill. cv. Hass). In: V Congreso Mundial del Aguacate, Actas: Volumen I. Consejería de Agricultura y Pesca, Junta de Andalucía. Sevilla, España. 111-114 pp.
- Villaça, D.; Schusterschitz, M. J.; Marque, S. and Siqueira, C. H. 2008. RAPD analysis of callus regenerated and seed brown plants or maize (*Zea mays* L.). Brasil. Revista Brasileira de Milho e Sorgo. 7(2):93-104.
- Vos, P.; Hogers, R.; Bleeker, M.; Reijans, M.; Van de Lee, T.; Hornes, M.; Frijters, A.; Pot, J.; Peleman, J.; Kuiper M. and Zabeau, M. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. United Kingdom. Nucleic Acids Res. 23(21):4407-4414.
- Yasseen, M. Y. 1993. Morphogenesis of avocado *in vitro*. A review. California Avocado Society Yearbook. United States of America. 77:101-105.
- Zucchi, M. I.; Arizono, H.; Morais, V. A.; Pelegrinelli Fungaro, M. H. and Carneiro Vieira, M. L. 2002. Genetic instability of sugarcane plants derived from meristem cultures. Brazil. Genetics Mol. Biol. 25(1):91-96.