

Germinación de embriones somáticos de *Psidium guajava* L. cv. Enana Roja Cubana EEA 18-40 en sistemas de inmersión temporal

Jorge Vilchez Perozo¹, Nilca Albany Valero¹, Rafael Gómez Kosky², Leyanis García Aguila^{2*} y Daniel Agramonte Peñalver². *Autor para correspondencia

¹Fundación Gran Mariscal de Ayacucho. Caracas, República Bolivariana de Venezuela. e-mail: jvilchez@cantv.net

²Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas. Carretera a Camajuní Km 5 ½ Santa Clara, Villa Clara, Cuba. e-mail: legarcia@uclv.edu.cu

RESUMEN

Con la finalidad de estudiar la germinación de embriones somáticos de *Psidium guajava* cv. Enana Roja Cubana EEA 18-40 en sistemas de inmersión temporal (SIT), se cultivaron embriones somáticos en etapa corazón-torpedo en medio MS al 50% de las sales mayores suplementado con: 0.25 mg.l⁻¹ de 6-bencilaminopurina (6-BAP), 10 mg.l⁻¹ de Biobras-6 (análogo de brasinoesteriode) y 20 g.l⁻¹ de sacarosa. Como control se usó medio de cultivo semisólido (2.5 g.l⁻¹ Gellan Gum, Spectrum®) de igual composición al utilizado en los SIT. Se evaluaron estadísticamente las variables porcentaje de germinación y peso fresco. Después de diez semanas de cultivo los mayores valores del porcentaje de germinación (91.04%) y peso fresco (1.22 g) se obtuvieron en los SIT, siendo estos estadísticamente diferentes a los obtenidos en medio semisólido (9.79 % y 1.03 g, respectivamente).

Palabras clave: embriogénesis somática, guayabo, planta *in vitro*, regeneración, RITA®

ABSTRACT

Somatic embryo germination of *Psidium guajava* L. cv. Cuban Red Dwarf EEA 18-40 in temporary immersion systems (TIS), in which somatic embryos were cultured in the heart-torpedo stage in MS medium at mayor half strength salt and supplemented with: 0.25 mg.l⁻¹ of 6-bencilaminopurine (6-BAP), 10 mg.l⁻¹ of Biobras-6 (analogous of brasinoesteriode) and 20 g.l⁻¹ of sucrose. As control was used solid cultivation medium (2.5 g.l⁻¹ Gellan gum, Spectrum®) of same composition to the one used in the TIS. The variables germination percentage and fresh weight were evaluated statistically. After ten weeks of cultivation the largest values in germination percentage (91.04%) and fresh weight (1.22 g) were obtained in the TIS, being statistically different to those obtained in solid medium (9.79% and 1.03 g, respectively).

Key words: *in vitro* plant, guayaba, regeneration, RITA®, somatic embryogenesis

INTRODUCCIÓN

Dentro de las 150 especies de *Psidium* que existen, *Psidium guajava* L., es la que mayores perspectivas desde el punto de vista económico presenta. Las dificultades encontradas en la aplicación de técnicas convencionales de propagación, han generado considerar otras formas posibles de propagación vegetativa y mejoramiento en el guayabo (Pontikis, 1996). Se ha estudiado la embriogénesis somática como herramienta en el mejoramiento genético y para la propagación de árboles *plus* producto del mismo (Vilchez *et al.*, En imprenta).

Se ha señalado la germinación de los embriones somáticos como una de las etapas más críticas dentro de la embriogénesis somática (Merkle, 1995). Los sistemas de inmersión temporal (SIT) se han empleado en muchos protocolos de embriogénesis somática en la germinación de los

embriones somáticos de muchas especies (Etienne *et al.*, 1999; Gómez *et al.*, 2000). En esta investigación se estudió la germinación de embriones somáticos de guayabo en SIT.

MATERIALES Y METODOS

Se utilizaron embriones somáticos de *Psidium guajava* L. cv. Enana Roja Cubana EEA 18-40, obtenidos a partir de embriones cigóticos inmaduros en etapa de torpedo y cotiledonal, iniciados en medio de cultivo MS (Murashige y Skoog, 1962) al 50% de las sales mayores y suplementado con: 400 mg.l⁻¹ de L-glutamina, 100 mg.l⁻¹ de ácido ascórbico, 60 g.l⁻¹ de sacarosa y 1 mg.l⁻¹ de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D); posteriormente fueron subcultivados a intervalos de tres semanas en igual medio de cultivo de inducción.

El sistema de inmersión temporal utilizado fue la unidad RITA® (CIRAD, Francia) cuyo

funcionamiento y características fueron descritas por Etienne *et al.* (1999).

La frecuencia de inmersión fue de un minuto cada 12 horas. Cada unidad RITA® contenía 200 ml de medio de cultivo líquido MS al 50% de las sales mayores y suplementado con: 0.25 mg.l⁻¹ de 6-BAP, 10 mg.l⁻¹ de Biobras-6 (análogo de brasinoesteriode) y 20 g.l⁻¹ de sacarosa. La densidad de inóculo fue 800 mg de peso fresco de embriones somáticos en etapa corazón-torpedo por unidad RITA®. Se utilizaron dos réplicas para los sistemas de inmersión temporal.

Como control del proceso se emplearon frascos de cultivo de 250 ml de capacidad con 30 ml de medio de cultivo semisólido (2.5 g.l⁻¹ de Gellan Gum, Spectrum®) de similar composición que el empleado en las unidades RITA®, distribuyéndose en forma equitativa en diez frascos de cultivo, inóculo de igual cantidad y características a los utilizados en los RITA®.

El experimento se realizó en una cámara de cultivo de luz solar con fotoperíodo según la época del año (noviembre-enero) y una densidad de flujo de

fotones fotosintéticos (DFFF) superior a 60 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ y temperatura de 25 ± 2.0 °C. Después de diez semanas de cultivo se evaluaron las variables, porcentaje de embriones germinados y peso fresco. El porcentaje de germinación se analizó estadísticamente mediante la prueba de comparación de proporciones, complementada con el test exacto de Fisher's y el peso fresco a través de un análisis de varianza simple y el test de rangos múltiples de Tukey.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tanto en los SIT como en el medio de cultivo semisólido las primeras señales de la germinación de los embriones somáticos ocurrieron alrededor de los diez días después de ser colocados en el medio de germinación, cuando los embriones cambiaron de color blanco a verde brillante. La tabla 1, muestra los resultados de la comparación de la germinación de los embriones somáticos en SIT y en medio de cultivo semisólido. Los análisis estadísticos señalan diferencias significativas para las variables porcentaje de germinación y peso fresco.

Tabla 1. Comparación de los porcentajes de germinación y peso fresco de los embriones somáticos de *Psidium guajava* L., en sistemas de inmersión temporal (SIT) y en medio de cultivo semisólido.

	% de Germinación*	Peso Fresco (g)**
SIT	91.04 a	1.22 \pm 0.15 a
Semisólido	81,79 b	1.03 \pm 0.09 b
M.G. \pm E.E.	87.95 \pm 0.23*(¹ / _{n_i} + ¹ / _{n_j}) ^{1/2}	1.09 \pm 0.13

*Letras distintas difieren estadísticamente para $p < 0.05$ según la prueba de comparación de proporciones complementado con el test exacto de Fisher's.

**Letras distintas difieren estadísticamente para $p < 0.05$ según la prueba de rangos múltiples de Tukey

Los mayores valores de porcentaje de germinación y peso fresco se obtuvieron al germinar los embriones somáticos en SIT; siendo superior al reportado en un sistema similar por Etienne *et al.* (1999), pero en *Coffea arabica* (60%). Los embriones somáticos germinados en los SIT fueron morfológicamente iguales a los germinados en medio de cultivo semisólido (Fig. 1a y b), observándose germinación parcial con desarrollo del brote de algunos embriones somáticos en ambos sistemas de germinación.

A través de la caracterización visual y por la respuesta morfogénica observada, los embriones no presentaron ningún rasgo de hiperhidricidad (Fig. 1c), aspecto también señalado por Cabasson *et al.* (1997), en embriones de *Citrus deliciosa* y Escalona (1999), en brotes de *Ananas comosus* multiplicados en SIT.

Las diferencias observadas entre la germinación de los embriones somáticos en SIT y en medio de cultivo semisólido, pueden ser explicadas por el limitado contacto de los embriones somáticos con el medio de cultivo en los SIT, el cual está reducido a una delgada capa de medio de cultivo que se adhiere a los embriones somáticos por cohesión y se renueva en cada inmersión, al igual que la atmósfera gaseosa del vaso de cultivo, permitiendo el aprovechamiento de los nutrientes e intercambio gaseoso más eficiente (Teisson y Alvard, 1995; Cabasson *et al.*, 1997). Lo cual no ocurre en el medio semisólido, donde el contacto con el medio de cultivo es permanente y el intercambio gaseoso es limitado. Grapin *et al.* (1994), señalaron que la calidad de la atmósfera gaseosa influye en el proceso de diferenciación, donde las bajas concentraciones de oxígeno reducen el número de embriones somáticos por explante.

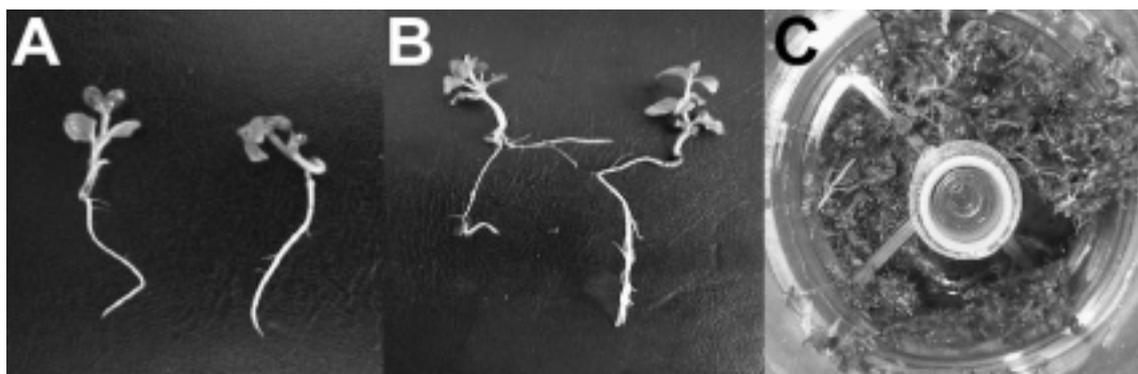


Figura 1. Aspectos morfológicos de la germinación de los embriones somáticos de *Psidium guajava* L. A: germinación de embriones somáticos en RITA®. B: germinación de embriones somáticos en medio de cultivo semisólido. C: Vista del interior del RITA®

CONCLUSIONES

Con la utilización de los sistemas de inmersión temporal fue posible obtener una mayor eficiencia en la germinación de los embriones somáticos de *Psidium guajava* cv. Enana Roja Cubana EEA 18-40, siendo las plantas obtenidas de características morfológicas normales sin rasgos de hiperhidricidad.

REFERENCIAS

Cabasson, C, Alvard A, Dambier D, Ollitraul P y Teisson C (1997) Improvement of *Citrus* somatic embryos development by temporary immersion. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 50:33-37

Escalona, M, (1999) Propagación de la piña (*Ananas comosus* (L.) Merr.) en sistemas de inmersión temporal. (Resumen). Tesis de doctorado. Centro de Bioplasmas, Ciego de Avila, Cuba. 26 p

Etienne-Barry, D, Bertrand B, Vasquez N y Etienne H (1999) Direct sowing of *Coffea arabica* somatic embryos mass-produced in a bioreactor and regeneration of plants. *Plant Cell Reports* 19:111-117

Gómez, R, Gilliard T, Barranco LA y Reyes M (2000) Embriogénesis somática en medios líquidos. Maduración y

aumento de la germinación en el cultivar híbrido FHIA-18. *Infomusa* (9)1:12-16

Grabin, A, Ferrière M, Etienne H y Carron M (1994) Effect of hypoxia on induction and development of somatic embryos in *Hevea brasiliensis*. En: Teisson, C, (Ed) *In vitro* culture of tropical plants, pp. 23-25. CIRAD

Merkle, SA, Parrot WA y Flinn (1995) Morphogenic aspects of somatic embryogenesis En: Thorpe, TA, (Ed) *In vitro* embryogenesis in plants. pp 155-203. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht

Murashige, T y Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15:473-497

Pontikis, CA (1996) *Psidium guajava* L. (Guava) En: Bajaj YDS. (Ed) *Biotechnology in agriculture and forestry*, Vol 35 trees IV. pp 309-319. Springer-Verlag. Heidelberg Berlin

Teisson C, y Alvard D (1995) A new concept of plant *in vitro* cultivation liquid medium: Temporary Immersion. En: Terezi, M, Cella R y Falavigna A (Eds) *Current Issues in Plant Molecular and Cellular Biology*, pp. 105-109. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht

Vilchez, J, Albany N, Gómez R (2001) Somatic embryogenesis induction in guava (*Psidium guajava* L.) *Plant Cell Tissue and Organ Culture* (En imprenta)