

Inducción de embriogénesis somática en *Psidium guajava* L. a partir de embriones cigóticos¹

Induction of somatic embryogenesis in *Psidium guajava* L. starting at the zygotic embryo stage

J. A. Vilchez P², N. R. Albany V³, R. Gómez Kosky⁴, L. Garcia⁴

Resumen

Con el propósito de inducir la embriogénesis somática (ES) en el guayabo (*Psidium guajava* L.) se estudiaron tres dosis (1, 5 y 10 mg L⁻¹) de ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4-D), la etapa de desarrollo del embrión cigótico inmaduro (EC) en la cual se indujo la ES y el porcentaje de EC en cada etapa de desarrollo: globular (G), corazón (C), torpedo (T) y cotiledonal (CT), en frutos de guayabo (3,2; 3,4; 3,5 cm de ancho y 3,6; 3,7; 3,8; 3,9; 4 cm de largo) para determinar el grado de asociación existente entre el tamaño de fruto y el porcentaje de EC en etapas de T y CT, mediante un análisis de contingencia. Las variables evaluadas fueron: porcentaje de formación de callo con estructuras embriogénicas (%FCEE), número de embriones somáticos (E) por explante embriogénico (NES) y porcentaje de EC etapa G, C, T y CT que formaban E. El NES fue evaluado mediante la prueba de varianza simple y el test de Tukey; las variables expresadas en porcentajes fueron analizadas estadísticamente a través de la prueba de comparación de proporciones complementado con el test exacto de Fisher's. Con 1,0 mg L⁻¹ de 2,4-D fue posible inducir la ES (15,15% FCEE) de forma indirecta y de baja frecuencia a partir de EC en etapas de desarrollo T (12%) y CT (7,7%), observándose el mayor porcentaje de EC en dichos estado en frutos inmaduros de 25 - 35 días después de la antétesis, cuyo largo y ancho estuvo alrededor de los 4,0 y 3,5 cm, respectivamente.

Palabras clave: Cultivo *in vitro*, embriogénesis somática, embrión cigótico, fruta tropical, guayabo, Myrtaceae.

Recibido el 14-2-2002 ● Aceptado el 26-6-2002

1 Investigación financiada por la Fundación Gran Mariscal de Ayacucho. Programa Beca-Crédito.

2 La Universidad del Zulia. Facultad Experimental de Ciencias, Departamento de Biología, Bloque A-1, 3^{er} piso Laboratorio de Biotecnología Vegetal (BIOVELUZ). Apartado 10488. Maracaibo (4002), Edo. Zulia. E-mail: jvilchez@cantv.net

3 La Universidad del Zulia. Facultad de Agronomía, Departamento de Química. Apartado 526. Maracaibo (4005), Edo. Zulia. E-mail: nilca_albany@cantv.net

4 Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas (UCLV). Carretera a Camajuní Km. 5 ½ Santa Clara, Villa Clara, Cuba CP 54830. E-mail: legarcia@uclv.edu.cu

Abstract

For the purpose of inducing somatic embryogenesis (SE) in guava (*Psidium guajava* L.), three dosages were studied (1, 5 and 10 mg L⁻¹) of acid 2,4 diclorofenoxiacético (2,4-D), in the immature zygotic embryo (ZE) stage of development in which the SE was induced and the percentage of ZE in each development stage: globular (G), heart (H), torpedo (T) and cotyledonal (CT), were studied in guava fruits (3,2; 3,4; 3,5 cm wide and 3,6; 3,7; 3,8; 3,9; 4 cm long) to determine the degree of T and CT association between the fruit size and the percentage of ZE in stage of T and CT, by means of a contingency analysis. The variables evaluated were: percentage of callus formation with embryogenic structures (%CFES), number of somatic embryos (E), embryogenic explant (NE) and percentage of ZE stage G, H, T and CT that E formed. NE was evaluated by means of the test of simple variance and the Tukey test; the variables expressed in percentages were analyzed statistically through the comparison of proportions test supplemented with the Fisher's exact test. With 1,0 mg L⁻¹ of 2,4-D it was possible to induce the SE (15,15% CFES) in an indirect way and in a low frequency starting from ZE in development state T (12%) and CT (7,7%). The largest percentage of ZE was observed in this state in immature fruits of 25 - 35 days after the anthesis, the length and width of which was around 4,0 and 3,5 cm, respectively.

Key words: *In vitro* culture, somatic embryogenesis, zygotic embryo, tropical fruit, guava, Myrtaceae.

Introducción

El guayabo (*Psidium guajava* L.) es uno de cincuenta árboles frutales más conocidos del trópico y subtrópico y representa uno de los frutales de mayores perspectivas de explotación debido a las características nutricionales y organolépticas de su fruto, la posibilidad de uso en el campo industrial y de la medicina verde, su adaptabilidad a diferentes condiciones edafoclimáticas y la gran aceptación y demanda en los mercados internacionales (24).

Para el año 2000 se contaba con un área cosechada a nivel mundial de 3.541.587 ha, una producción de 95.127.187 tm y un rendimiento 268

600 tm ha⁻¹ (comunicación personal de FAO-Cuba), siendo cultivado en más de 15 países en todo el mundo, a nivel del trópico y subtrópico incluyendo algunas áreas del mediterráneo (24, 22, 21).

Los principales países productores han implementado programas de mejoramiento genético y nuevas formas de propagación, como la propagación *in vitro* con miras a multiplicar plantas con características agronómicas deseadas (7,14,17) debido a que esta especie tiene un alto grado de heterocigocidad y un prolongado ciclo juvenil, lo cual requiere un número variado de generaciones para

lograr una pequeña ganancia genética (12) y a los pobres resultados obtenidos mediante la propagación asexual. Sin embargo existen guayabos de gran valor genético, que pueden ser aprovechados por medio de la selección en campo y la multiplicación *in vitro* (15, 16).

La embriogénesis somática constituye una alternativa como herramienta en el mejoramiento genético y propagación del guayabo. En muchos sistemas experimentales, desarrollados para especies recalcitrantes, el establecimiento de un eficiente protocolo de embriogénesis somática se basa en el uso de material juvenil como fuente de explante (4,6). Se ha señalado que el bajo número de plantas en campo por cultivo

embriogénico y la poca habilidad del tejido maduro para iniciar cultivos embriogénicos, son las mayores limitaciones de la embriogénesis somática en especies leñosas (8). Para lograr el éxito en la embriogénesis somática, el explante debe ser obtenido de plantas altamente vigorosas. Además órganos o tejidos inmaduros son más morfológicamente manejables *in vitro*, que órganos o tejidos maduros (20).

Los objetivos de este estudio fueron establecer la dosis de ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4-D) y la etapa de desarrollo del embrión cigótico inmaduro en la cual se lograra inducir la embriogénesis somática, así como la relación entre la etapa de desarrollo del embrión cigótico inmaduro y las dimensiones de los frutos de *P. guajava*.

Materiales y métodos

La presente investigación se llevó a cabo en el laboratorio del Banco de Germoplasma del Instituto de Biotecnología de las Plantas (IBP), adscrito a la Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas de Santa Clara, Cuba; durante el período comprendido entre mayo de 1999 y febrero del 2001.

Frutos inmaduros de guayaba cv. Enana Roja Cubana EEA 18-40 de 25 a 35 días después de la antésis con un diámetro de 3,5 a 3,8 cm fueron lavados con agua y detergente, seguidamente desinfectados con una solución de NaClO al 3% y 2 gotas de Tween 80 por cada 100 ml de solución, durante 30 min. en constante agitación. Posteriormente, bajo condiciones asépticas, los frutos fueron

enjuagados tres veces con agua destilada estéril y divididos en cuatro secciones, de las cuales se separó la masa de semillas del endocarpio y de cada semilla se extrajo el saco embrionario (figura 1a). Mediante el uso del estereoscopio los embriones cigóticos inmaduros fueron disectados del saco embrionario, variando su longitud de 0,18 a 1,3 mm y su etapa de desarrollo desde globular a cotiledonal (figura 1b). Seguidamente los embriones cigóticos inmaduros intactos (explantes) fueron cultivados en tubos de ensayo que contenían medio de cultivo constituido por las sales MS (9) a la mitad de los macronutrientes y suplementado con: 400 mg L⁻¹ de L-glutamina, 100 mg L⁻¹ de ácido ascórbico, 60 g L⁻¹ de sacarosa,

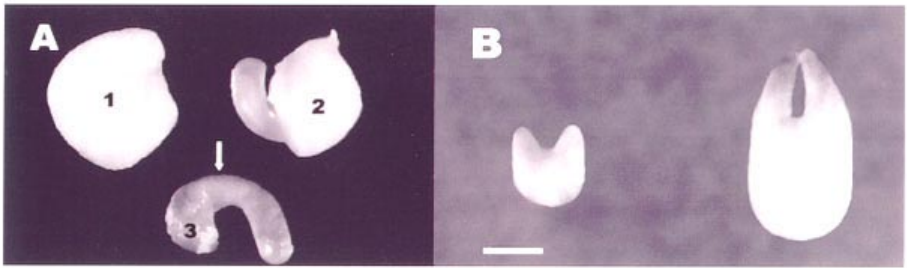


Figura 1. Preparación del explante para la inducción de la embriogénesis somática en *Psidium guajava* L. A. Rescate de embrión cigótico inmaduro: 1. semilla de 25-35 días después de la fertilización, 2. vista de semilla y saco embrionario y 3. saco embrionario, la flecha indica la ubicación de un embrión cigótico dentro del saco embrionario. B. Embriones cigóticos en etapa corazón y torpedo, la línea blanca equivale a 0,2 mm.

solidificado con $2,5 \text{ g L}^{-1}$ de Gellan gum (Spectrum®), bajo oscuridad constante a $27 \pm 2^\circ\text{C}$.

Para la inducción de los embriones somáticos se evaluaron tres dosis ($1, 5$ y 10 mg L^{-1}) 2,4-D. Se sembraron en cada tratamiento 20 embriones cigóticos de cada etapa de desarrollo; cada réplica la constituyó un tubo de cultivo con 2 embriones cigóticos. Se realizaron observaciones cada cuatro semanas y el experimento fue evaluado a las 10 semanas de cultivo. Las variables evaluadas fueron: porcentaje de formación de callo con estructuras embriogénicas (%FCEE), número de embriones somáticos por explante embriogénico (NES) y porcentaje de embriones cigóticos en etapa globular, corazón, torpedo y cotiledonal que formaban embriones somáticos. La variable NES fue transformada a través de la raíz cuadrada de $X+0,5$, debido a la presencia de valores ceros (0). Todas las variables expresadas en porcentajes

que fueron analizadas estadísticamente a través de la prueba de comparación de proporciones complementado con el test exacto de Fisher's y el NES mediante la prueba de varianza simple y el test de rangos múltiples de Tukey. Para el procesamiento estadístico se empleó el software analítico Statistix versión 1.0 y Statgraphic plus versión 2.0 para ambiente Windows de Microsoft®.

También se planteó determinar el tamaño del fruto de guayaba en el cual era posible obtener el mayor número de embriones cigóticos inmaduros en etapa de torpedo y cotiledonal. Para lo cual se tomaron 25 frutos inmaduros de guayaba entre 25 a 35 días después de la antesis, de color verde intenso y de consistencia dura; cuyo tamaño varió de 3,6 - 4,0 cm de largo y 3,2-3,5 cm de ancho.

Los frutos seleccionados fueron divididos longitudinalmente en cuatro secciones, para separar 25 semillas al azar, de las cuales se aislaron los embriones cigóticos y se clasificaron

según su etapa de desarrollo. Se determinó el grado de asociación que existía entre el porcentaje de embriones cigóticos en etapa de torpedo y cotiledonal

con los tamaños de fruto de 3,2; 3,4; 3,5 cm de ancho y 3,6; 3,7; 3,8; 3,9; 4 cm largo mediante un análisis de contingencia.

Resultados y discusión

Después de dos semanas de cultivo se observó la presencia de un callo compacto, seco y de color marrón brillante con estructuras embriogénicas en embriones cultivados con 1 mg L⁻¹ de 2,4-D, mientras que con concentraciones más altas del regulador de crecimiento este comportamiento se apreció a las tres semanas de cultivo. Sin embargo después de la octava semana de cultivo se observó un necrosamiento, lo cual disminuyó considerablemente el potencial embriogénico de los mismos. A pesar de este comportamiento, el desarrollo de los embriones somáticos formados con anterioridad en los callos no fue afectado.

La presencia de embriones somáticos en etapa globular fue observada después de la sexta semana de cultivo (figura 2), principalmente en callos originados de la región apical (cotiledones) de los embriones cigóticos en etapa de torpedo y cotiledonal.

Las concentraciones de 2,4-D fueron capaces de inducir la embriogénesis somática en *P. guajava*, variando el %FCEE y NES en los tratamientos evaluados. Las pruebas estadísticas arrojaron diferencias para %FCEE. El mayor %FCEE (15,15%) se obtuvo con la concentración más baja de 2,4-D (1,0 mg L⁻¹). A medida que se incrementó la concentración del 2,4-D la frecuencia de inducción y el

número de embriones somáticos disminuyó (figura 3).

Este comportamiento pudiera ser causado por una inhibición del proceso de la embriogénesis somática, debido a una excesiva concentración del 2,4-D, lo cual ha sido señalado en otras especies; tales como, *Arachis sp.* y *Cydonia oblonga* (1, 5, 3). Se han asociado las altas concentraciones de 2,4-D con la variabilidad en *Hordeum*; además ha sido reportado como agente mutagénico (11). Razón por la cual, es recomendable utilizar la mínima concentración de 2,4-D necesaria para inducir el proceso de la embriogénesis somática.

Los porcentajes de inducción de embriones somáticos obtenidos son superiores a los obtenidos en otras Mirtáceas (4 %) (10).

La embriogénesis somática observada en *P. guajava* se caracterizó por ser de tipo indirecta y de baja frecuencia. Además el desarrollo de los embriones somáticos fue de forma asincrónica y se pudo observar una completa similitud entre las etapas de desarrollo de los embriones somáticos con los cigóticos, comportamiento que también ha sido reportado para *Myrtus communis*, *Eucalyptus dunnii* y *Feijoa sellowiana* (2, 19, 10, 3).

Las etapas de desarrollo del embrión cigótico globular y corazón mostraron incompetencia para la

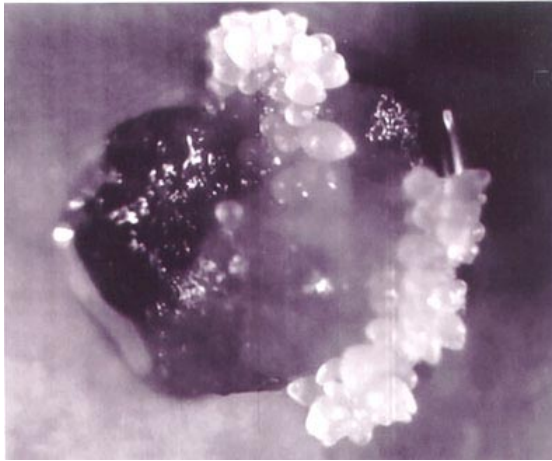


Figura 2. Embriones somáticos originados de la región cotiledonal de un embrión cigótico en etapa de torpedo a las seis semanas de cultivo.

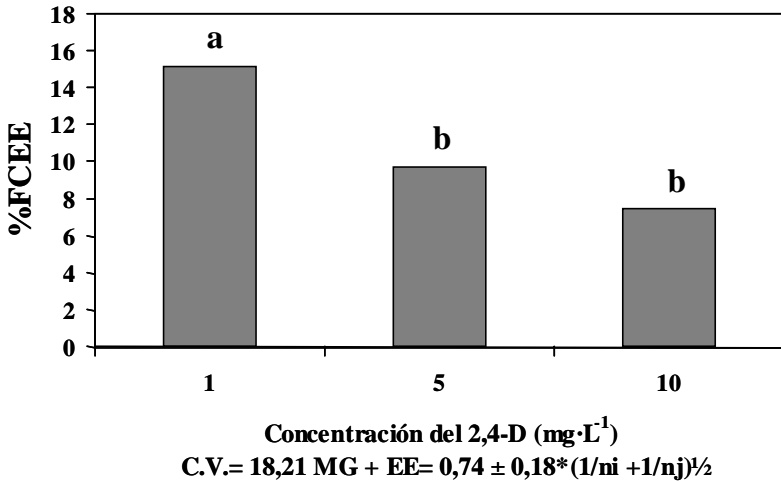


Figura 3. Influencia de la concentración de 2,4-D sobre el porcentaje de callo con estructuras embriogénicas (%FCEE). Letras distintas de un mismo parámetro difieren estadísticamente para $p < 0,05$ según la prueba de comparación de proporciones complementada con el test exacto de Fisher's.

embriogénesis somática (cuadro 1). La longitud de los embriones cigóticos en etapa torpedo y cotiledonal que indujeron la embriogénesis somática estuvo entre los rangos de 0,48-0,6 y 0,8-1,2 mm respectivamente.

Aunque la embriogénesis somática en especies leñosas no está limitada al uso de embriones cigóticos inmaduros como explantes, éstos han mostrado un alto potencial para este tipo de morfogénesis (23, 2). La etapa de desarrollo del embrión cigótico también es un factor determinante para la inducción de la embriogénesis somática en *P. guajava* lo cual quedó demostrado en la presente investigación pues sólo los embriones cigóticos en etapa de torpedo y cotiledonal, llegaron a formar embriones somáticos. Este comportamiento es similar al obtenido en *Feijoa sellowiana* Berg (2) y *Myrtus communis* L. (3), especies en las cuales la mayor frecuencia de inducción de embriogénesis somática se obtuvo en embriones cigóticos en etapa

cotiledonal. Se ha señalado que las células de los tejidos del embrión cigótico son más divergentes en este tipo de explante por lo que es necesario una mayor reprogramación previa en algunas etapas de desarrollo para activar los caminos de la embriogénesis somática (13).

En cuanto al tamaño del fruto de guayabo en el cual era posible obtener el mayor número de embriones cigóticos inmaduros en etapa de torpedo y cotiledonal, el análisis de contingencia determinó que existe una relación altamente significativa (para la prueba de Chi²) entre el ancho y el largo del fruto con la etapa embrionaria de los embriones cigóticos. A medida que los frutos eran de mayores dimensiones fue posible observar un mayor número de embriones en etapa torpedo y cotiledonal, lo cual se corroboró con el coeficiente de contingencia para ambas medidas que señala una correlación fuerte entre éstas y la etapa de desarrollo embrionario (0,89 para el ancho y 0,91

Cuadro 1. Influencia de la etapa de desarrollo del embrión cigótico sobre el porcentaje de formación callos con embriones somáticos

Etapa de desarrollo del embrión cigótico	Porcentaje de callo con embriones somáticos
Globular	0,0% b
Corazón	0,0% b
Torpedo	12,0% a
Cotiledonal	7,7% a
M.G. ± E.E. = 4,93 ± 0,18 X (1/n _i + 1/n _j) ^{1/2}	

Las letras distintas difieren estadísticamente para $p < 0,05$ según prueba de comparación de proporciones complementado con el test exacto de Fisher's. M.G. = Media general; E.E. = Error estándar.

para el largo) indicando que el tamaño del fruto influye positivamente sobre la etapa de desarrollo de los embriones cigóticos.

También se calculó el coeficiente de Cramer's V, el cual indica el grado de influencia del ancho y el largo sobre la etapa de desarrollo de los embriones cigóticos. Este coeficiente no dio diferencias entre el ancho y el largo en relación con la etapa de desarrollo, por lo que cualquiera de las dimensiones pueden ser admitidas a la hora de la cosecha de los frutos inmaduros, para posteriormente realizar la inducción de la embriogénesis somática.

Los cuadros 2 y 3 muestran los resultados del análisis de contingencia, observándose que con frutos de alrededor de 3,5 cm de ancho se logró

obtener un mayor porcentaje de embriones cigóticos en etapa torpedo y cotiledonal, mientras que para el largo se obtuvo alrededor de los 4 cm de longitud.

Durante los primeros 45 días después de la antesis, los frutos de guayabo se encuentran en el período I o de rápido crecimiento (18), por lo que es lógico señalar que es durante este período donde existe la mayor posibilidad de hallar frutos inmaduros con mayor cantidad de embriones cigóticos que no llegan a la etapa de desarrollo de embrión maduro, ya que después de los 45 días se inicia el proceso de maduración de la semilla que se extiende hasta los 65 días después de la antesis (18).

Cuadro 2. Análisis de Contingencia para la relación del ancho de los frutos inmaduros de *Psidium guajava* L. con el porcentaje de embriones cigóticos en etapa globular, corazón, torpedo y cotiledonal.

Ancho (cm)	Globular (%)	Corazón (%)	Torpedo (%)	Cotiledonal (%)
3,2	42,5	37,5	17,5	2,5
3,4	10,0	45,0	35,0	10,0
3,5	8,33	13,3	53,33	25,0

$\text{Chi}^2 = 122,59$. El valor de Chi^2 es significativo para $p > 0,01$.

Coef. de Contingencia = 0,89

Coef. de Cramer's V = 0,55 ns

Cuadro 3. Análisis de Contingencia para la relación del largo de los frutos inmaduros de *Psidium guajava* L. con el porcentaje de embriones cigóticos en etapa globular, corazón, torpedo y cotiledonal.

Largo (cm)	Globular (%)	Corazón (%)	Torpedo (%)	Cotiledonal (%)
3,6	25,0	35,0	35,0	5,0
3,7	25,0	35,0	35,0	5,0
3,8	15,0	30,0	30,0	25,0
3,9	10,67	21,0	4,07	27,6
4	10,0	5,0	10,0	75,0

Chi² = 147,26. El valor de Chi² es significativo para p>0,01.

Coef. de Contingencia = 0,91

Coef. de Cramer's V = 0,55

Conclusión

Con 1,0 mg L⁻¹ de 2,4-D fue posible inducir la embriogénesis somática de forma indirecta y de baja frecuencia a partir de embriones cigóticos en estado de desarrollo torpedo y cotiledonal, observándose el

mayor porcentaje de embriones cigóticos en estado torpedo y cotiledonal en frutos inmaduros de 25-35 días después de la antesis, cuyo largo y ancho estén alrededor de los 4,0 y 3,5 cm, respectivamente.

Literatura citada

- Baker, C. y H. Wetzstein. 1994. Influence of auxin type and concentration on peanut somatic embryogenesis. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 36:273-277.
- Canhoto, J. y G. Cruz. 1996. Histodifferentiation of somatic embryos in cotyledons of pineapple guava *Feijoa sellowiana* Berg. *Protoplasma* 191:34-45.
- Canhoto, J., M. Lopes y G. Cruz. 1999. Somatic embryogenesis and plant regeneration in myrtle *Myrtus communis* L. *Plant Cell, Tiss. Org. Cult.* 57:13-21.
- Carman, J. 1990. Embryogenic cells in plant tissue cultures: occurrence and behavior. *In Vitro Cell Dev. Biol.* 26:746-753.
- D'Osorio, C., S. Morini y G. Bellocchi. 1998. Effect of light quality on somatic embryogenesis of quince leaves. *Plant Cell, Tiss. Org. Cult.* 33:91-98.
- Karunaratne, S., C Gamage y A Koor. 1991. Leaf maturity, a critical factor in embryogenesis. *J. Plant Physiol* 139:27-31.
- León de Sierralta, S., L. Arenas y Z. Vilorio. 1997. Efecto de la exposición solar de las plantas donantes en la iniciación del cultivo *in vitro* de guayabo. *Psidium guajava* L. *Rev. Fac. Agron. LUZ.* 14:47-53.
- Merkle, S. 1995. Strategies for dealing with limitations of somatic embryogenesis in hardwood trees. *Plant Tissue Culture and Biotechnology* 1(3): 112-120.

9. Murashige, T. y F. Skoog . 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15:473-497.
10. Parra, R. y J. Amo-Marco. 1998. Secondary somatic embryogenesis and plant regeneration in myrtle *Myrtus communis* L. *Plant Cell Reports* 18:325-330.
11. Pérez, J., 1998. Variación somaclonal. p 105-120. En: Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología. Pérez J. (Ed). Instituto de Biotecnología de las Plantas. 1^{era} edición Universidad Central de las Villas. Santa Clara, Cuba.
12. Pontikis, C. 1996. *Psidium guajava* L. Guava. p. 309-319. En: Bajaj Y. (Ed). *Biotechnology in agriculture and forestry*. Vol. 35 trees IV.
13. Raemaker, E., E. Jacobsen y R. Visser . 1995. Secondary somatic embryogenesis and applications in plant breeding. *Euphytica* 81:93-107.
14. Ramírez, M. .1998. Tratamientos a plantas madres para el establecimiento *in vitro* del guayabo *Psidium guajava* L. Trabajo de grado para optar al título de MSc. en Fruticultura. La Universidad del Zulia. Fac. de Agronomía. Maracaibo, Venezuela. 132 p.
15. Ramírez, M. y E. Salazar .1998. Cultivo *in vitro* de embriones inmaduros del guayabo *Psidium guajava* L. *Rev. Fac. Agron. (LUZ)* 15:211-221.
16. Ramírez, M. y E. Salazar .1998. Método de desinfección y efecto de citoquininas en el cultivo *in vitro* de segmentos de hojas de *Psidium guajava* L. *Rev. Fac. Agron. (LUZ)* 15:162-173.
17. Ramírez, M., S. León de Sierralta y A. Urdaneta. 1999. Evaluación de desinfectantes superficiales en el establecimiento *in vitro* de *Psidium guajava* L. y *Psidium friedrichstalianum* Berg .Nierdz. *Rev. Fac. Agron. (LUZ)* 16:243-255.
18. Rathore, D. 1976. Effect of seasons on the growth and chemical composition of guava *Psidium guajava* L. fruits. *J. Hort. Sci.* 51:41-47.
19. Termignoni, R., W. Po-Jen y Ch. Yeh-Hu . 1996. Somatic embryo induction in *Eucalyptus dunnii*. *Plant Cell, Tiss. Org. Cult.* 45:129-132.
20. Tisserat, B. 1991. Embryogenesis, organogenesis and plant regeneration. p. 79-105. En: *Plant cell culture, a practical approach*. Dixon R. A. Ed. IRL Press Limited.
21. Tona, L. K. Kambu, K. Mesia, K. Cimanga, S. Apers, T. Bruyne, L. Pieters, A.J. Vlietinck y T. de Bruyne. 1999. Biological screening of traditional preparations from some medicinal plants used as antidiarrhoeal in Kinshasa, Congo. *Phytomedicine* 6(1): 59-66.
22. Tona, L. K. Kambu, N. Ngimbi, K. Cimanga y A.J. Vlietinck. 1998. Antiamoebic and phytochemical screening of some Congolese medicinal plants. *J. Ethnopharmacology* 61(1): 57-65.
23. Williams, E. y G. Maheswaran. 1986. Somatic embryogenesis: factors influencing coordinated behavior of cells as an embryogenic group. *Ann. Bot.* 57:443-462.
24. Yadava, UL. 1996. Guava (*Psidium guajava* L.): an exotic tree fruit with potential in the southeastern United States. *HortScience* 31 (5): 789-794.